



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

ANA CRISTINA DE SOUZA BEZERRA

**IDENTIFICAÇÃO DO PROVÍRUS DEFECTIVO E
CLASSIFICAÇÃO DA SEQUÊNCIA TAX DO HTLV- 1 EM
PACIENTES COM PARAPARESIA ESPÁSTICA TROPICAL/
MIELOPATIA (PET/MAH) E DOADORES DE SANGUE**

RECIFE, 2011

ANA CRISTINA DE SOUZA BEZERRA

**IDENTIFICAÇÃO DO PROVÍRUS DEFECTIVO E
CLASSIFICAÇÃO DA SEQUÊNCIA TAX DO HTLV- 1 EM
PACIENTES COM PARAPARESIA ESPÁSTICA TROPICAL/
MIELOPATIA (PET/MAH) E DOADORES DE SANGUE**

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

Co-orientador: Dr. Divaldo de Almeida Sampaio

Tese apresentada a 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

RECIFE, 2011

Souza, Andréa Carla Mendonça de
Formulação láctea à base de abóbora suplementada
com inulina: efeitos nutricionais e na morfologia intestinal
de ratos / Andréa Carla Mendonça de Souza. – Recife :
O Autor, 2011.
79 folhas; Il., fig.; 31 cm.

Orientador: Nonete Barbosa Guerra.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de
Pernambuco. CCS. Nutrição, 2011.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Alimento de transição. 2. Carotenóides. 3.
Suplementação. 4. Perfil lipídico. I. Guerra, Nonete
Barbosa. I. Título.

		UFPE
613.2	CDD (20.ed.)	CCS2011-19



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

REITOR

Amaro Henrique Pessoa Lins

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

José Thadeu Pinheiro

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

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

Heloísa Ramos Lacerda de Melo

CORPO DOCENTE

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 de Fátima Pessoa Militão de Albuquerque

Maria do Amparo Andrade

Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

Marli Tenório Cordeiro

Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Vera Magalhães da Silveira

Valdênia Maria Oliveira de Souza

Vlaúdia Maria Assis Costa



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 DA DOUTORANDA

ANA CRISTINA DE SOUZA BEZERRA

No dia 02 de março de 2011, às 08h00, no Auditório do Depto. de Enfermagem do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CCS/UFPE), os Membros Doutores: a **Dra. Marli Tenório Cordeiro** (Presidente da Banca - SES/PE-LACEN), a **Profª. Dra. Terezinha Tenório da Silva** (UFPE), a **Profª. Dra. Ana Cecília Cavalcanti de Albuquerque** (ASCES), o **Prof. Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza** (UFRPE) e a **Profª. Dra. Paula Loureiro** (UPE), componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, arguíram a doutoranda **ANA CRISTINA DE SOUZA BEZERRA** sobre a sua Tese intitulada “IDENTIFICAÇÃO DO PROVÍRUS DEFECTIVO E CLASSIFICAÇÃO DA SEQUÊNCIA TAX DO HTLV- I EM PACIENTES COM PARAPARESIA ESPÁSTICA TROPICAL/ MIELOPATIA (PET/MAH) E DOADORES DE SANGUE”, 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 da doutoranda, as seguintes menções foram publicamente fornecidas.

Drª. Marli Tenório Cordeiro

Aprovada

Profª. Dra. Terezinha Tenório da Silva

Aprovado

Profª. Dra. Ana Cecília Cavalcanti de Albuquerque

Aprovada

Prof. Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza

Aprovado

Profª. Dra. Paula Loureiro

Aprovada

Marli Tenório Cordeiro

Drª. Marli Tenório Cordeiro

Terezinha Tenório da Silva

Profª. Dra. Terezinha Tenório da Silva

Ana Cecília Cavalcanti de Albuquerque

Profª. Dra. Ana Cecília Cavalcanti de Albuquerque

Paulo Roberto Eleutério de Souza

Prof. Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza

Paula Loureiro

Profª. Dra. Paula Loureiro

Ao meu pai, José Julimá Bezerra (*in memoriam*) e minha mãe, Josélia Joselene de Souza Bezerra, as duas grandes referências em minha vida.

A minha família, Charles, companheiro e amigo, meus filhos, Gabriela, Luisa e Rafael, razão maior de minha vida, agradeço pela compreensão nos momentos em que estive ausente, enquanto me dedicava a este trabalho.

Àqueles que tiveram uma grande participação em minha formação pessoal, e que tenho uma profunda gratidão Claudio e Adelaide Mota.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela conclusão de mais uma etapa em minha vida.

À Profa. Maria Rosângela C. D. Coêlho, pela orientação desse trabalho, confiança desde o primeiro momento, atenção e apoio em todos os momentos no desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Divaldo A. Sampaio, pelo grande apoio ao laboratório de Biologia Molecular da Fundação Hemope, pelo incentivo e parcerias com as pesquisas nessa área da hemoterapia.

À Dra. Paula Loureiro, pelo apoio desde o início das pesquisas, pela grande contribuição e incentivo.

Ao Prof. Paulo Souza, pelo apoio, por ter me recebido no laboratório Genoma da UFRPE e tê-lo colocado a disposição para a realização dos testes moleculares e sua relevante participação no desenvolvimento da metodologia desse trabalho.

À Coordenadora, Vice-Coordenadora, Professores e Funcionários do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical pelos ensinamentos e apoio.

Ao Prof. Dr. Ricardo Ximenes pela ajuda, sempre que lhe foi solicitada, o que foi de grande importância para a descrição da metodologia dessa pesquisa.

Aos alunos Ana Clara Gurgel, aluna de iniciação científica, Laís Rodrigues e Pedro Ítalo (estagiários), pela ajuda e participação no processo de continuidade dos trabalhos no laboratório de Biologia Molecular.

.Aos colegas do laboratório da sorologia do Hemope Lucília Lopes e Betânia A. Pinto pelo apoio e companheirismo e especialmente Bergman Cisneiros, pela grande ajuda na execução de parte das técnicas de biologia molecular.

Ao Biomédico Emanuel Borges que iniciou comigo no laboratório de Biologia Molecular como aluno de iniciação científica, pelo empenho e dedicação.

Aos gestores da área de Hemoterapia do Hemope, que me concederam dispensa das minhas atividades para me dedicar à realização deste trabalho, e consentimento de utilização do laboratório de Biologia Molecular.

A todos os profissionais, do Serviço de Neurologia do Hospital da Restauração, especialmente à Dra. Lúcia Brito, chefe do serviço, pela cooperação e parceria nesta pesquisa.

À chefe do Laboratório do PROCAPE, Dra. Cleide Freire, e a todos os colegas do laboratório pela compreensão e ajuda nessa jornada.

Aos colegas do setor Virologia do LIKA, em especial a Jéfferson Almeida pela sua disponibilidade em ajudar nas correções desse trabalho e pelo apoio recebido.

À FACEPE, pela concessão de bolsa e financiamento para a realização da pesquisa.

Por fim, agradeço a todos os pacientes que aceitaram participar desta pesquisa, a qual não poderia ter sido realizada sem vocês.

Os homens lutam, mas é Deus quem dá a vitória.

Provérbios: 21

RESUMO

O vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1) é um retrovírus humano que está associado à leucemia/linfoma de células T do adulto (LLTA) e a uma síndrome neurológica denominada paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1 (PET/MAH). Fatores como a genética, o sistema imune do hospedeiro, a presença de deleções ou variações em determinadas regiões do genoma do vírus podem influenciar as etapas que levam ao desencadeamento das doenças associadas ao HTLV-1. O vírus pode apresentar-se na forma defectiva, isto é, exibindo deleção em alguma região do seu genoma. Dois subgrupos A e B da sequência *tax* do HTLV-1 foram descritos baseados em quatro mutações em regiões específicas desta sequência. Adicionalmente, foi identificada uma associação entre a presença do subgrupo A com o desenvolvimento de PET/MAH. Os objetivos deste trabalho foram verificar a presença de provírus defectivo pela detecção das sequências *env-tax*, *tax* e *5'LTR* do HTLV-1 em pacientes com PET/MAH e portadores do HTLV-1 assintomáticos (PHA), classificar os subgrupos da sequência *tax*, quantificar a carga proviral e verificar a associação destes marcadores com a presença da PET/MAH. Participaram do estudo 247 indivíduos, desses, 52 pacientes com PET/MAH atendidos no Serviço de Neurologia do Hospital da Restauração e três grupos de doadores de sangue da Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE), sendo 72 indivíduos PHA, 100 doadores soronegativos e 23 doadores com sorologia indeterminada para o HTLV-1/2. O período da coleta foi de março de 2008 a outubro de 2009. Todas as amostras foram submetidas ao ELISA, *Western Blotting*, PCR para a detecção das sequências *env-tax*, *tax*, *5'LTR* e a PCR-*restriction fragment length polymorphism* (PCR-RFLP) para classificação dos subgrupos da sequência *tax*. Houve maior frequência do sexo feminino no grupo PET/MAH, quando comparado ao grupo PHA ($p=0,000$). A média de idade e da densidade ótica do ELISA para HTLV-1/2 foram superiores no grupo PET/MAH ($p=0,000$). Para os pacientes com PET/MAH, 04 mostraram ausência para a sequência *5'LTR*. Para os PHA, 11 indivíduos do grupo mostraram ausência para a sequência *5'LTR*, três ausência para a sequência *env-tax* e sete indivíduos do grupo PHA não possuíam a sequência *tax*. Dos 247, 49 pacientes com PET/MAH e 38 PHA apresentaram vírus classificados como subgrupo *tax* A, exceto dois doadores de sangue que possuíam o subgrupo *tax* B, embora não tenha sido encontrada a associação dos subgrupos da sequência *tax* com a presença de PET/MAH ($p=0,108$). A quantificação da carga proviral foi realizada em 21 pacientes do grupo PET/MAH e 15 doadores de sangue do grupo PHA, em razão da contagem de linfócitos inferior a 1×10^6 células/ml nas demais amostras analisadas. A mediana de carga proviral foi estatisticamente mais elevada no grupo PET/MAH ($p=0,001$). Em

conclusão, identificou-se o provírus defeutivo em pacientes com PET/MAH e em indivíduos do grupo PHA, demonstrou-se associação entre a presença da seqüência *tax* e a PET/MAH, mas não houve associação desta síndrome com os subgrupos desta seqüência em nossa casuística e uma maior carga proviral foi detectada em pacientes no grupo PET/MAH.

Palavra-chaves: Vírus linfotrópico de células T humanas 1, vírus defeutivo, Paraparesia Espástica Tropical/ Mielopatia Associada ao HTLV-1.

ABSTRACT

The Lymphotropic virus of human T-cells type 1 (HTLV-1) is a human retrovirus associated to adult leukemia/lymphoma T-cells (ATLL) and to a neurological syndrome called myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). A number of host genetic and immunological factors, as well as deletions or changes in certain genetic regions of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1), can influence phases that trigger the development of HTLV-1-associated diseases. The virus can introduce itself as a defective provirus that exhibits deletions in some regions of its genome. Two subgroups A and B of the tax sequence of HTLV-1 were described based on four mutations in specific regions of this sequence. Additionally, it was identified an association between the presence of subgroup A with the development of HAM/TSP. The objectives of this study were to verify the presence of defective provirus by detecting the sequences env-tax, tax and 5'LTR of HTLV-1 in HAM/TSP patients and HTLV-1 asymptomatic carriers (HAC); to classify the subgroups of tax sequence, and to quantify the proviral load and the association of these markers to the presence of HAM/TSP. Participated in this study 52 HAM/TSP patients during the period March 2008 to October 2009, attended by the Neurological Outpatient Clinic at the Hospital Restauração, in Pernambuco, Brazil and three groups of blood donors from the Foundation of Hematology and Hemotherapy of Pernambuco (HEMOPE Foundation): 72 PHA individuals, 100 seronegative donors and 23 donors with indeterminate serology for HTLV-1/2. All participants were submitted to ELISA tests, Western Blot, PCR for the detection of sequences env-tax, tax, 5'LTR and restriction fragment length polymorfism (RFLP) for classification of subgroups of tax sequence. There was a higher frequency of females in the HAM/TSP group compared to HAC group ($p = 0.000$). The average age and the optical density of ELISA for HTLV-1/2 was higher in HAM/TSP group ($p = 0.000$). The 5'LTR sequence was absent in 4 patients with HAM/TSP and 11 individuals of HAC group. Moreover, the env-tax sequence could not be detected in 3 of the HAM/TSP patients and the tax sequence could not be detected in 7 individuals of HAC group. All participants had viruses classified as subgroup tax A, but two blood donors had the subgroup tax B, although no association was found among subgroups of tax sequence in the presence of HAM/TSP ($p = 0.108$). Quantification of proviral load was performed in 21 patients of HAM/TSP group and in 15 blood donors from the HAC group, due to lymphocyte count inferior to 1×10^6 cells/ml. The median proviral load was statistically higher in the HAM/TSP group ($p = 0.001$). In conclusion, it were identified the defective proviruses in HAM/TSP patients and individuals of HAC group; it was demonstrated an association between the presence of tax sequence and HAM/TSP. However, in

this study it was not found an association between this syndrome and this sequence's subgroups although a higher proviral load was detected in HAM/TSP patients.

Keywords: *Human T-cell lymphotropic virus type 1, defective provirus, HTLV type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura morfológica do HTLV.	25
Figura 2. Organização genômica do HTLV.	26
Figura 3. Ciclo de replicação viral.	28
Figura 4. <i>Flower cells</i> : linfócitos com alterações nucleares.	34
Figura 5. Fitas de Western Blot para HTLV-1.	43
Figura 6. Razão de prevalência (por 1.000 doações) da triagem para HTLV-1/2 por ensaio sorológico enzimático (EIA) em doadores de sangue de capitais de 26 estados brasileiros e do Distrito Federal.	50

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabelas

Tabela 1. Prevalência da infecção em vários países do mundo.	29
Tabela 2. Distribuição dos subtipos genéticos do HTLV em diversas regiões brasileiras.	32
Tabela 3. Manifestações clínicas da infecção pelo HTLV-1	40
Tabela 4. Estudos de soroprevalência do HTLV-1/2 no Brasil de 1986–1999.	48
Tabela 5. Estudos de soroprevalência para HTLV-1 no período de 1994 a 1998 na Região Metropolitana do Recife.	53
Tabela 6. Referências para o cálculo da amostra.	61

Quadros

Quadro 1. Critérios diagnósticos para PET/MAH estabelecidos pela OMS.	60
Quadro 2. Primers utilizados nos testes de PCR.	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CD – Cluster of differentiation

DNA – Ácido desoxirribonucléico

ELISA – Ensaio imunoenzimático

EBV – Vírus Epstein Barr

FACEPE – Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco

HBV – Vírus da hepatite B

HCV – Vírus da hepatite C

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

HEMOPE – Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco

hnRNP-A1 – Riboproteína nuclear-A1 heterogênea

HTLV-1 – Vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 1

IL-2 – Interleucina 2

INF- γ – Interferon γ

IMIP – Instituto Materno Infantil de Pernambuco

LACEN – Laboratório Central de Saúde Pública

LLTA – Leucemia/linfoma de células T do adulto

LTR – Terminações longas repetidas

NAT – Teste do ácido nucléico

ORF – Fase de leitura aberta

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

TNF α – Fator de necrose tumoral α

TR – Transcriptase reversa

WB – Western Blot

SUMÁRIO

1.0 Apresentação.....	18
2.0 Revisão de literatura	
2.1 Histórico.....	23
2.2 Estrutura genômica e ciclo replicativo do HTLV-1.....	24
2.3 Aspectos epidemiológicos.....	28
2.4 Classificação filogenética.....	30
2.5 Doenças associadas ao HTLV-1	
2.5.1 Doença hematológica.....	32
2.5.2 Paraparesia espástica tropical ou mielopatia (PET/MAH) associada ao HTLV-1.....	35
2.5.3 Doenças autoimunes e complicações de doenças infecciosas.....	39
2.6 Diagnóstico sorológico e molecular da infecção pelo HTLV-1	
2.6.1 Testes Sorológicos.....	41
2.6.2 Testes Moleculares.....	43
2.7 Mutações nas doenças associadas ao HTLV-1.....	44
2.8 Soroprevalência e epidemiologia molecular do HTLV- 1 no Brasil.....	47
3.0 Objetivos	
3.1 Objetivo geral.....	55
3.2 Objetivos específicos.....	55
3.3 Objetivo secundário.....	55
4.0 Hipótese.....	56
5.0 Metodologia	
5.1 Desenho do estudo.....	59
5.2 População do estudo.....	59
5.3 Definição do tamanho amostral.....	61
5.4 Definição das variáveis e coleta de dados	
5.4.1- Variável dependente.....	61
5.4.2- Variáveis independentes.....	62
5.5 Coleta das amostras sangüíneas.....	63
5.6 Processamento das amostras sangüíneas.....	63

5.7 Sorologia para HTLV-1/2.....	63
5.8 Separação dos linfócitos.....	64
5.9 Extração do DNA dos linfócitos.....	64
5.10 Procedimento da PCR “in house”	
5.11 PCR utilizadas para a análise do provirus defectivo.....	65
5.11.1 Nested – PCR para a seqüência env-tax - HTLV-1.....	65
5.11.2 Nested – PCR para a seqüência env-tax - HTLV-2.....	66
5.11.3 PCR para identificação da seqüência tax.....	67
5.11.4 PCR para identificação da seqüência 5’LTR.....	67
5.12 Determinação dos subgrupos A e B da seqüência tax.....	68
5.13 Quantificação do HTLV-1 nas amostras.....	68
5.14 Curva-padrão para a PCR em tempo real.....	69
5.15 Quantificação do gene da albumina nas amostras.....	69
5.16 Análise dos dados.....	71
5.17 Limitações metodológicas do estudo.....	71
5.18 Aspectos éticos.....	72
6.0 Resultados.....	73
6.1 Versão em português do artigo I.....	75
6.2 Versão em inglês do artigo I.....	95
6.3 Versão em português do artigo II.....	116
6.4 Versão em inglês do artigo II.....	130
7.0 Conclusões.....	144
8.0 Considerações finais.....	146
9.0 Referências.....	148
Apêndices	
A. Termo de consentimento livre e esclarecido.....	163
B. Questionário.....	164
Anexos	
A. Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação HEMOPE..	166
B. Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital da Restauração.....	167
C. Instrução aos autores – Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.....	168
D. Guidelines for Authors – Intervirology.....	174

1.0 APRESENTAÇÃO

O vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1) está associado a três doenças: a leucemia/linfoma de células T do adulto (LLTA), a paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1 (PET/MAH) e a uveíte. Muito se têm estudado sobre os fatores que podem levar ao desenvolvimento dessas doenças, já que entre os infectados apenas de 1 a 5% desenvolvem PET/MAH ou a LLTA.

Estudos moleculares realizados em populações de diversas partes do mundo tentam esclarecer as mutações do vírus que possam estar ligados aos mecanismos das doenças associadas. No entanto, ainda não se chegou a um total esclarecimento sobre esses processos, existindo ainda muitas lacunas. Pernambuco, foi caracterizado pelos estudos já realizados, como um Estado endêmico para o HTLV-1.

Iniciei os estudos com HTLV-1 em 1993 ao ingressar no mestrado pela Fundação Oswaldo Cruz. O tema para desenvolver a pesquisa foi sugerido pela assessoria de pesquisa da Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (Fundação HEMOPE), em virtude de estudos anteriores realizados de forma independente por hemocentros de todo o país apresentarem um percentual elevado de doadores de sangue com sorologia positiva para HTLV-1, principalmente em alguns estados da região Nordeste, como Pernambuco e Salvador. Por isso, a portaria nº 173 publicada pelo Ministério da Saúde em 1993 tornava obrigatória a triagem sororológica para HTLV em doadores de sangue em todos os hemocentros.

Naquele mesmo ano foi implantado em todos os hemocentros da rede pública do País o teste para HTLV-1 e 2.

Durante o mestrado (1993-1995) tive a oportunidade de trabalhar com biologia molecular, tanto cursando disciplinas na Fiocruz como em treinamentos

realizados no Instituto de Medicina Tropical e Fundação Pró-Sangue, na cidade de São Paulo. Após a conclusão do mestrado, retornei ao laboratório de sorologia do HEMOPE onde continuei as pesquisas com HTLV-1, iniciei orientando alunos de iniciação científica, realizando uma pesquisa bem direcionada para a nossa rotina, como realizando uma investigação sobre os kits de diagnósticos sorológicos para HTLV-1 e 2. Naquele momento, os kits disponíveis no mercado eram de primeira geração, surgindo posteriormente os de 2ª e 3ª geração.

Durante os anos de 1997 a 1999 junto com profissionais de todo o Brasil, elaboramos cadernos e vídeos sobre HTLV, para o programa do Ministério da Saúde (MS) denominado de TELELAB. Este se destinava aos hemocentros e Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACEN) do país. Diante de minha vivência com o tema o meu objetivo maior era montar o laboratório de biologia molecular para doadores de sangue, onde poderíamos desenvolver novas pesquisas, não só com HTLV, mas com outros vírus transmissíveis pelo sangue, além de dar suporte a outras áreas do hemocentro como o controle de qualidade.

Em 2001, o Ministério da Saúde publicou a portaria nº 262 em 05 de fevereiro de 2002, para a implantação do teste do ácido nucléico (NAT) em todos os hemocentros do país, com isso criamos o laboratório de biologia molecular com recursos do Ministério da Saúde. Embora a implantação do NAT não tenha ocorrido naquele período, iniciamos os testes moleculares para doadores com sorologia positiva ou inconclusiva para HTLV-1 e 2, como também para o vírus da hepatite C (HCV).

Ressaltamos o apoio de outras áreas do HEMOPE ao laboratório de biologia molecular de doadores, como a Assessoria de Pesquisa e Ensino e os profissionais da hemoterapia, que muito incentivaram o crescimento do laboratório. Com esse

trabalho em conjunto, o laboratório tem contribuído tanto na formação de estudantes de graduação e pós-graduação como em conhecimentos gerados pelas pesquisas realizadas.

Dando continuidade às pesquisas, sentimos a necessidade de conhecer o perfil molecular do doador soropositivo para o HTLV-1, surgindo assim a idéia do presente estudo. Inicialmente investigamos o provírus defeitivo em doadores com resultados sorológicos negativos ou inconclusivos, por meio do estudo de três seqüências do vírus (*env*, *tax* e *5'LTR*).

Por outro lado, para responder a tantos questionamentos em relação ao desenvolvimento das doenças associadas ao HTLV-1, incluímos na pesquisa um grupo de pacientes com a PET/MAH, atendidos no ambulatório de Neurologia do Hospital da Restauração.

A pesquisa foi financiada pela Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e contou com bolsistas de iniciação científica. Os resultados da pesquisa estão apresentados na forma de dois artigos, submetidos a Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (qualis B1) e ao Intervirology (qualis B1).

2.0 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Histórico

O vírus linfotrópico de células T do tipo 1 (HTLV-1) foi descoberto no Japão por Takatsuki, que publicou em 1977 as características clínicas e hematológicas de 16 pacientes portadores de um tipo de leucemia de células T (UCHIAMA et al., 1977). Nos Estados Unidos, Poiesz et al. (1980) relataram a descoberta de um retrovírus humano, entretanto, constatou-se ser o mesmo vírus, pois foi isolado a partir de pacientes com as mesmas características clínicas encontradas por Takatsuki (1977). Portanto, o HTLV-1 é considerado o agente etiológico da leucemia de células T do adulto (LLTA) (HINUMA et al., 1981; YOSHIDA et al., 1982).

O HTLV-1 também foi associado a uma desordem neurológica denominada paraparesia espástica tropical (PET), quando Gessain e Igata (1985), encontraram anticorpos do HTLV-1 nesses pacientes. Mais tarde, Osame et al (1989), descobriram a presença do anticorpo HTLV-1 em pacientes japoneses que eram portadores da paraparesia espástica. Esses pesquisadores sugeriram outro termo, mielopatia associada ao HTLV-1 (MAH). No entanto, Araújo e Silva (2006) mostraram que a abrangência dos sintomas neurológicos da infecção pelo HTLV-1 é bem mais amplo que a determinação do termo PET/MAH, demonstrando que existe um complexo neurológico associado ao HTLV-1.

Outras doenças têm sido descritas envolvendo a presença desse vírus, bem como: dermatite infecciosa; manifestações oftalmológicas; alveolite; polimiosite (WATANABE, 1997). O HTLV-2 foi descrito em 1982 em um paciente com a leucemia de células T cabeludas, no entanto, não foi confirmado o seu papel como agente etiológico desta doença (KALYANARAMAN et al., 1982). Essa infecção vem sendo associada a alterações neurológicas semelhante ao PET/MAH. BISSWAS et al. (2009) mostraram que 153 portadores do HTLV-1 e 388 portadores

do HTLV-2 tinham anormalidades predominantemente motoras, sugerindo que tanto o HTLV-1 como o HTLV-2 estão implicados em manifestações neurológicas sem, contudo, desenvolverem o quadro clínico da PET/MAH. No entanto não existe uma associação clara do HTLV-2 com patologias (LOPES; PROIETTI, 2008).

A co-infecção do HTLV-2 com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) em usuários de drogas parece aumentar, tanto a carga viral, como o desenvolvimento de manifestações neurológicas do HTLV-2 (POSADA-VERGARA et al., 2006).

Os outros tipos de HTLV (3 e 4) já foram isolados na África Central, no entanto, até o momento não existe associação desses vírus com doenças (CALATTINI et al., 2005; SWITZER et al., 2009).

2.2 Estrutura genômica e ciclo replicativo do HTLV-1

O HTLV-1 é um vírus complexo, que pertence à família *Retroviridae*, a subfamília *Oncovirinae* e ao gênero *Retrovírus*. Possui envelope e apresenta 100 a 140 nm de diâmetro, sendo constituído de um core onde se encontra o nucleocapsídeo com duas cópias de ácido ribonucléico (RNA) de fita simples com polaridade positiva, as enzimas transcriptase reversa, integrase e protease (SERPA, 1994). A figura 1 representa a estrutura do HTLV-1.

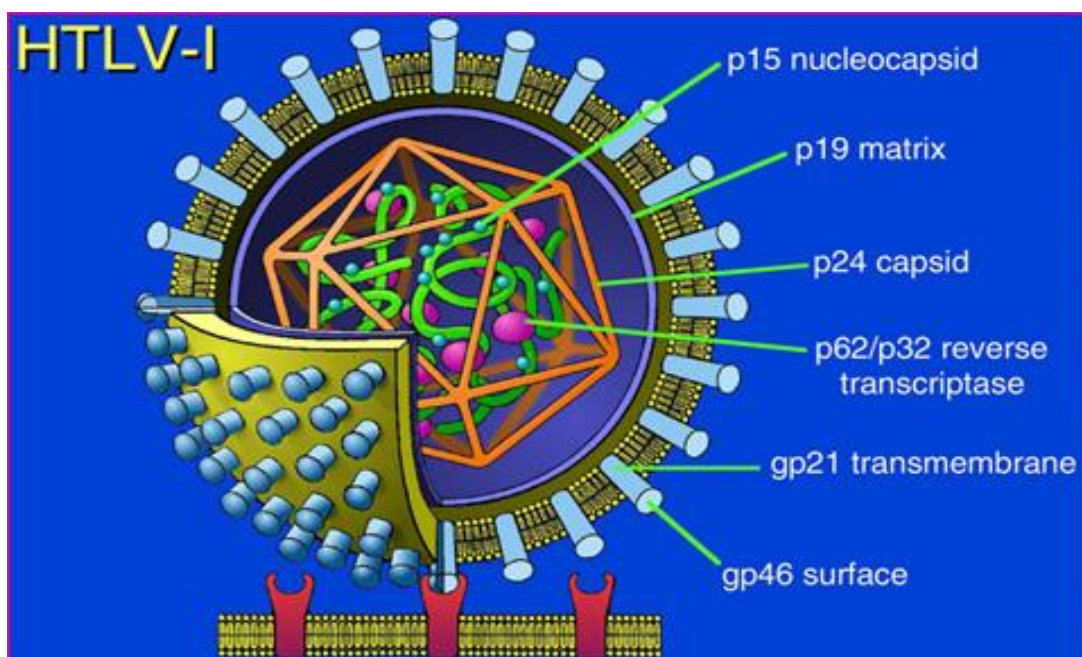


Figura 1. Estrutura morfológica do HTLV.

Fonte: <http://www.upch.edu.pe/Tropicales/capacita/2009/HTLV- HTLV1%20cartoon.jpg>

O genoma está envolvido pela proteína associada ao nucleocapsídeo, p15, ao capsídeo, p24, e a matrix, p19. O genoma do HTLV-1 é composto de três regiões que são traduzidas *gag*, *pol* e *env*, e outra conhecida como região X, que não é encontrada em outros retrovírus e codifica 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 (SEIKI et al., 1982; CANN; IRVIN, 1990). A figura 2 mostra a organização gênômica do HTLV.

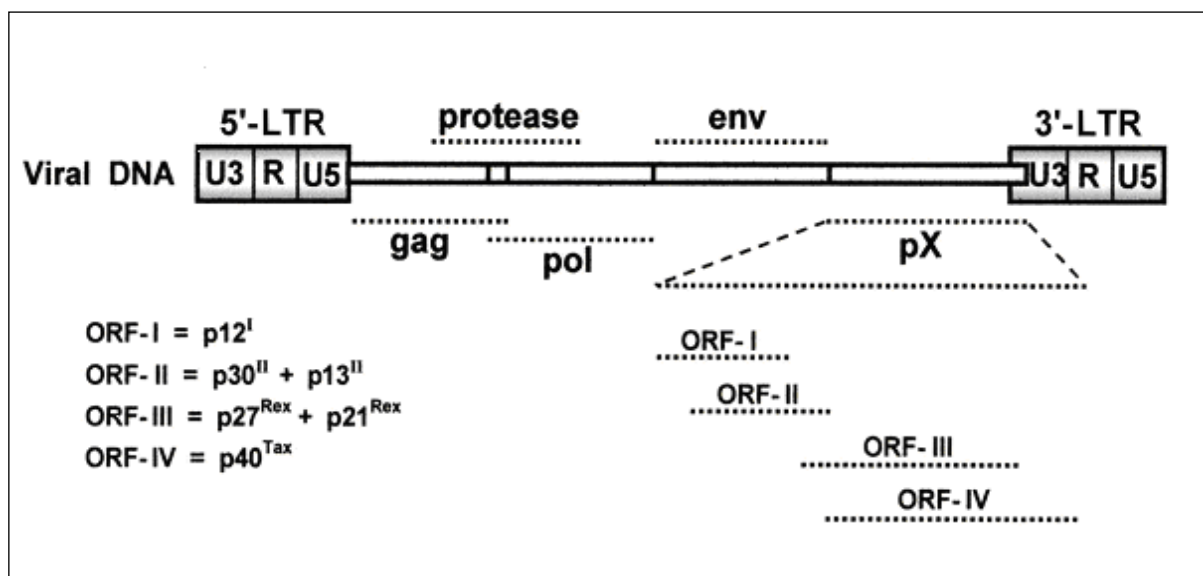


Figura 2. Organização genômica do HTLV.

Fonte: www.bioscience.org/2004/v9/af/1401/jpg (adaptado pela autora).

Os retrovírus se distinguem dos demais vírus RNA de fita positiva por codificarem uma enzima que polimeriza ácido desoxirribonucléico (DNA) a partir de uma fita de RNA, a transcriptase reversa (TR). A adsorção na célula é feita através da integração da proteína de superfície gp46 e como receptor celular tem sido sugerida a molécula de superfície e transportador da glicose GLUT-1 (ROMANOS et al, 2008).

Após a entrada do vírus acontece a liberação do genoma viral no citoplasma celular. O RNA é transcrito em DNA de fita dupla pela TR. Após a síntese da fita dupla de DNA, esta é transportada para o núcleo e inserida no DNA da célula pela integrase viral. O provírus integrado com 9,03 Kb para o HTLV-1 e 8,93Kb para o HTLV-2, codifica proteínas estruturais, enzimas e proteínas regulatórias.

- As proteínas codificadas pelos genes estruturais *gag* e *env* são proteínas altamente imunogênicas. O gene *gag* codifica a p53, uma precursora e as proteínas p19, p24, p15, p28 são produtos

intermediários. A p19 compreende a proteína da matriz (MA), p24 do capsídeo (CA) e a p15, do nucleocapsídeo (NC).

- **O gene *env*** codifica uma glicoproteína precursora, a gp61 e as intermediárias, gp46 que é encontrada na superfície e a gp21 que é uma proteína transmembrana.
- A região *pol* codifica a enzima TR e a integrase (IN).
- **A região X** codifica as proteínas regulatórias. Nessa região o RNA mensageiro (RNAm) contém fases aberta de leitura (ORFs), a tax (p40) proteína transativadora do segmento e de genes da célula eucariótica infectada e rex (p21 e p27) responsável pela expressão do RNAm de todos os genes estruturais, são codificadas pelas ORFs III e IV (SEIKI et al., 1982; CANN; IRVIN, 1990).

A maturação do vírus é uma etapa necessária para a formação da partícula infecciosa, onde ocorre a proteólise das proteínas do capsídeo, obtendo-se dessa forma a partícula madura, que pode infectar novas células. Essas etapas são visualizadas na figura 3.

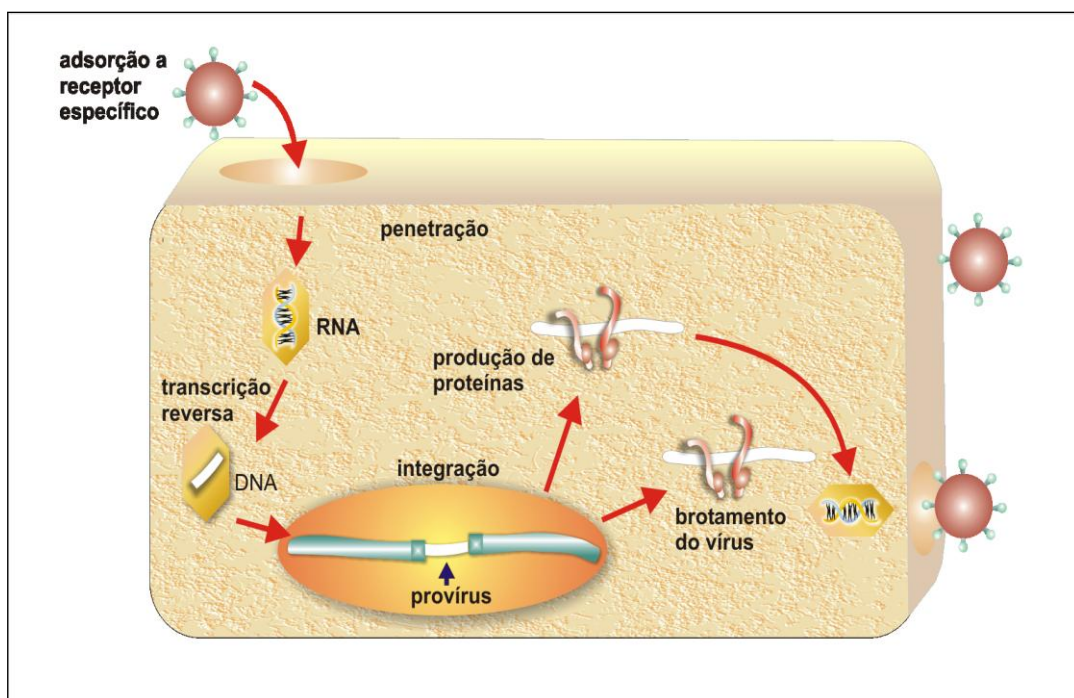


Figura 3. Ciclo de replicação viral.

Fonte: Bezerra et al., 1998.

2.3 Aspectos epidemiológicos

A infecção por HTLV-1 é endêmica em várias regiões do mundo, no sudeste do Japão, onde as taxas de prevalência são altas, de 6 a 37%. Ilhas e países do Caribe, incluindo a Jamaica e Trinidad, mostram uma prevalência em torno de 6%. Países da África equatorial, apresentam prevalência entre 1 a 10%. Focos endêmicos foram evidenciados em outras regiões, como Sudeste dos Estados Unidos, países da América Central e da América do Sul. A tabela 1 mostra a

prevalência da infecção em diversas regiões do mundo (FERREIRA et al. 1997; LOPES et al., 2008)

Tabela 1. Prevalência da infecção por HTLV-1 em vários países do mundo.

Região	Países	Prevalência (%)
África	Camarões, Costa do Marfim, Gabão, Quênia, Tanzânia e Zaire	1-10
Caribe	Barbados, Guadalupe, Haiti, Jamaica, Martinica, Tobago	1-7
Japão	Kysushu, Okinawa	1-30
América do Norte	Canadá, Estados Unidos	<0,1
Ilhas do Pacífico	Austrália, Malásia, Taiwan, Vietnã	1,7-14
Europa	Espanha, França, Itália, Reino Unido	~0,1
América do Sul e América Central	Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Honduras, Paraguai, Peru, Uruguai, Venezuela	0,3-10

Fonte: LOPES et al. (2008).

A transmissão do vírus é feita através de duas vias, a vertical e a horizontal. A vertical de mãe infectada para o filho, sendo o aleitamento materno de duração prolongada a principal forma da transmissão vertical. É rara a contaminação transplacentária ou contaminação na hora do parto (LOPES et al, 2008).

A transmissão horizontal ocorre por via sexual e por via parenteral. A parenteral ocorre através da transfusão de produtos sanguíneos celulares contaminados ou objetos contaminados de sangue (LOPES et al, 2008).

Dados sobre a epidemiologia transfusional mostram a diminuição da prevalência do HTLV-1 no Japão após o início do teste de triagem nos serviços de

hemoterapia (KAMIHIRA et al. 1987). Kamihira et al. (1987) mostraram uma diminuição no índice de infecção por HTLV-1, de 53,6% antes da triagem laboratorial dos doadores, para 0,9% após a introdução da triagem.

Nos Estados Unidos, 43% das doações não eram detectadas para o HTLV-2, porém, após a inclusão dos testes recombinantes para HTLV-1 e 2, esse índice diminuiu para uma média de 3 a 4% (CATALAN-SOARES; PROIETTI 2006).

Na via sexual, a transmissão é mais efetiva do homem para a mulher, e em um período de longa duração de exposição ao agente infeccioso. Estima-se que o número de pessoas infectadas no mundo seja de 15 a 20 milhões, essa taxa varia de acordo com a área geográfica e as características sociodemográficas da população em estudo (LOPES et al., 2008).

2.4 Classificação filogenética

Estudos realizados nas principais regiões endêmicas para o HTLV-1 atribuíram uma classificação filogenética, com base na análise da região LTR, dividindo-o em três grupos: O cosmopolita (HTLV-1a), que tem distribuição mundial, e compreende quatro sub-grupos: A ou transcontinental, distribuído no mundo inteiro, B ou Japonês, encontrado no Peru, Chile, Brasil e Colômbia e uma maior prevalência no Japão; C encontrado no oeste da África e Caribe; D no norte da África e E, encontrado em negros do Peru (GASMI et al., 1994; VIDAL et al., 1994; MIURA et al., 1994; VAN DOOREN et al., 1998).

Nas Américas são encontrados os sub-grupos A e C. Um segundo subtipo (HTLV-1b) foi isolado em populações da África Central, um terceiro subtipo (HTLV-1c) isolado da Melanésia, encontrado em Papua-Nova Guiné e em aborígenes da

Austrália. Um quarto isolado (HTLV-1d) foi encontrado em pigmeus de Camarões e de um indivíduo no Gabão (YAMASHITA et al., 1996; MATHIEUX et al., 1997). Wolfe et al. (2005), relataram mais três subtipos, HTLV-1e, 1f e 1g isolados no Congo, Gabão e um subtipo diferente na África Central, respectivamente.

Quanto ao HTLV-2, isolados no Norte da América e Europa, determinaram a existência de dois subtipos em relação à região LTR, o HTLV-2a e HTLV-2b (VALLINOTO et al., 2002). No Brasil, em população de índios da Amazônia, surgiu um subtipo que é uma variante filogenética do subtipo 2a, mas genotipicamente igual ao subtipo 2b, foi denominado de subtipo 2c. (EIRAKU et al.,1996). Vandame et al. (1998), isolaram um novo subtipo, completamente diferente do subtipo a, denominou-se de HTLV-2d.

No Brasil, os subgrupos encontrados são 2c e 2b. O subgrupo 2c inclui índios da região amazônica, doadores de sangue e usuários de drogas endovenosas. Um estudo feito em Ribeirão Preto, SP, mostrou uma positividade para o subgrupo 2c em 12 de 24 amostras e uma como 1ª (RENNER et al., 2006). Em Porto Alegre foi encontrado subtipo 2b em doadores de sangue, que segregaram com cepas HTLV-2d de índios americanos e cinco destes isolados com cepas brasileiras (KLEINE et al., 2009). A classificação filogenética no Brasil é apresentada no quadro 1 abaixo.

Tabela 2. Distribuição dos subtipos genéticos do HTLV em diversas regiões brasileiras.

Estado	HTLV-1 Indígena	HTLV-1 Urbana	HTLV-2 Indígena	HTLV-2 Urbana
Pará	Não encontrado	1aA	2c	2c
Bahia	Não encontrado	1aA	Não encontrado	2c
São Paulo	Não encontrado	1aA	Não encontrado	2c/2a
Rio de Janeiro	Não encontrado	1aA	Não encontrado	2c
Rio Grande do Sul	Não encontrado	1aA	Não encontrado	2b
Minas Gerais	ND	ND	Não encontrado	2c
Porto Alegre			2c/2b	

Fonte: Carneiro-Proietti (2006), com adaptações; ND: não demonstrado.

2.5 Doenças associadas ao HTLV-1

2.5.1 Doença hematológica

Das doenças associadas ao HTLV-1, a leucemia/linfoma de células T do adulto (LLTA) foi a primeira a ser estudada e relacionada aos retrovírus. Foi primeiramente descrita no Japão (UCHIYAMA, 1977) e logo em seguida no Caribe (BLATTNER, 1982). Foi descrita também em outras áreas como em países da América do Sul: Brasil (POMBO DE OLIVEIRA et al., 1995), Colômbia (RODRIGUEZ et al., 1994), Argentina (GIOSEFFI et al., 1995) e Peru (BLANK et al., 1996). Pequenas séries de casos incluem o Oeste da Índia, África (GIBBS et al., 1987;

FOUCHARD et al., 1998). A LLTA é muito rara na Europa e Estados Unidos (RATNER; POIESZ, 1988). O desenvolvimento desta malignidade segue um longo período de anos até décadas de infecção latente crônica pelo HTLV-1. O risco acumulativo do desenvolvimento da LLTA é de aproximadamente 4% (OSHIMA et al., 1998).

A doença possui quatro apresentações clínicas distintas: indolente, (*smoldering*), crônica, aguda e linfomatosa. A forma aguda compromete cerca de 55 a 75% de todas os casos de LLTA (YAMAGUCHI et al., 1990).

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

A forma clássica da LLTA está quase invariavelmente associada com linfadenopatia. A esplenomegalia é a próxima manifestação mais comum, podendo aparecer ou não manifestações cutâneas. Ocasionalmente esses pacientes podem apresentar rash difuso com esfoliações e eritrodermia. Envolvimento pulmonar, intestinal e do sistema nervoso central são variavelmente citados (SHUH; BEILKE, 2005). A hipercalcemia é encontrada em cerca de 30 a 60% dos pacientes com LLTA (YAMAGUCHI et al., 1990).

A forma crônica e indolente são menos frequentes. Pombo de Oliveira et al., (1999), descreveram 195 casos de LLTA, onde 60% dos pacientes foram acometidos pelo tipo agudo da doença, 22% apresentaram linfoma, 10% apresentaram a forma crônica e apenas 8% a forma indolente. Nas formas da doença crônica e indolente, parece existir uma integração monoclonal do HTLV-1, dessa forma, muitos dos indivíduos desenvolverão a forma aguda da leucemia.

Anemia e trombocitopenia não são predominantes no início da doença. Já a contagem dos leucócitos encontra-se ocasionalmente dentro da normalidade. No entanto, pode chegar a variar até $500.000/\text{mm}^3$. A morfologia dos linfócitos pode ser o primeiro sinal para o diagnóstico da LLTA, essas células podem aparecer com anormalidades nucleares significantes, como o núcleo multilobulado denominado de *flower cells* (figura 4) (SHUH; BEILKE, 2005).

Na maioria dos pacientes, as células da LLTA exibem um fenótipo de células T CD4 maduras. Expressam CD2, CD5, CD25, CD45RO, CD29, receptor $\alpha\beta$ de células -T e HLA -DR. Alguns marcadores com o CD7 e CD26 com o CD52 podem estar ausentes em alguns pacientes. Alguns são imprescindíveis na análise fenotípica como: CD3, CD4, CD8 e o CD25 (UCHIYAMA et al., 1977).

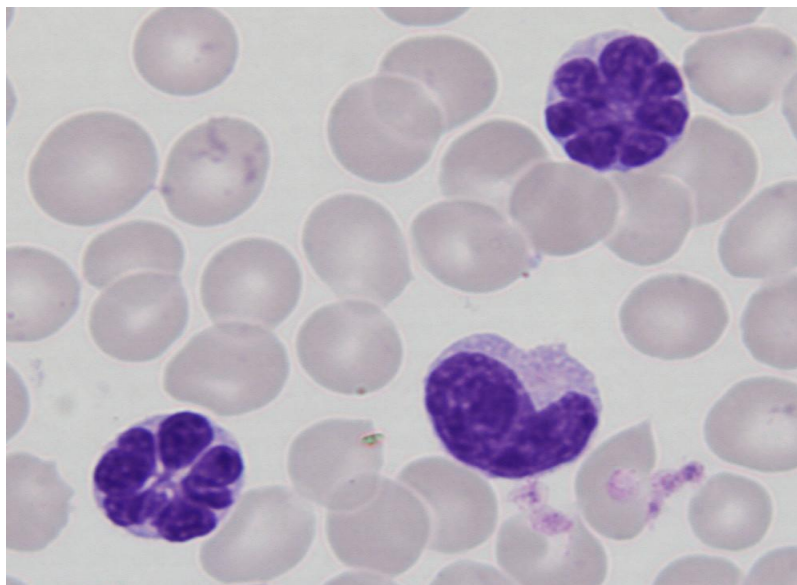


Figura 4. *Flower cells*: linfócitos com alterações nucleares.

Fonte: www.retorvirology.com/content/2/1/27

A integração do provírus defectivo nas células da LLTA é observada em um terço dos pacientes portadores da leucemia e está associada ao prognóstico e o subtipo clínico da doença (GOSH et al., 1994). 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).

A LLTA avança rapidamente com complicações pulmonares, infecções oportunistas e a sepse é a principal causa de morte (SHUH;BEILKE, 2005).

De acordo com Tsukasaki (2009), duas medidas são consideradas importantes para prevenção da LLTA, a primeira é a prevenção da infecção, como a realização do teste de triagem para o HTLV-1 e 2 em doadores de sangue, já adotada no Japão e em outros países que são considerados endêmicos como o Brasil e a segunda é a indicação de não amamentar para mulheres que são portadoras do vírus.

2.5.2 Paraparesia espástica tropical ou mielopatia (PET/MAH) associada ao HTLV-1

A PET/MAH é mais conhecida como uma mielopatia progressiva crônica que se caracteriza por paraparesia espástica, disfunção de esfíncter e brando distúrbio sensorial nas extremidades inferiores. De acordo com SAITO (2010), mais de 3.000 casos de PET/MAH têm sido relatados em áreas endêmicas. Casos esporádicos têm sido descritos em regiões consideradas não endêmicas como os Estados Unidos e países da Europa.

O risco de desenvolver a PET/MAH é variável nos diferentes grupos étnicos, variando entre 0.25% a 4%. (PROIETTI et al. 2005). Os achados patológicos do material de biópsia revelam o comprometimento da medula torácica. A desmielinização, a degeneração axonal e a gliose estão associados a uma infiltração linfocitária paranquimal e perivascular (IWASAKI et al., 1990; IZUMO et al., 2000).

Existem três hipóteses para explicar a patogênese da PET/MAH: da citotoxicidade direta, autoimunidade e o dano circundante. A primeira hipótese diz respeito à passagem de linfócitos pela barreira hemato-encefálica, e ao encontrar a célula infectada proporciona a morte dessas células pela liberação de citocinas. A segunda sugere uma resposta autoimune, onde células gliais que funcionam como antígenos próprios são similares a antígenos virais. Os antígenos virais promovem uma resposta imune que reage cruzadamente com antígenos próprios resultando em dano para o hospedeiro (ARAUJO; SILVA 2006).

Anticorpos contra a proteína *tax* reagem contra uma proteína neural intracelular chamada riboproteína nuclear-A1 heterogênea (hnRNP-A1). Os anticorpos podem atravessar a barreira hemato-encefálica em estados de inflamação, sendo uma característica da PET/MAH a inflamação perivascular (ARAUJO; SILVA 2006). Na terceira teoria, as células CD4+ e CD8+ específicas, atravessariam a barreira hemato-encefálica, se encontrariam no sistema nervoso central e haveria a liberação de citocinas as quais seriam as responsáveis pela destruição das células da glia (IJICHI et al.,1993; ARAUJO; SILVA et al., 2006).

A primeira teoria ainda não foi demonstrada *in vivo*, mas as outras duas teorias podem desenvolver um papel na patogênese da PET/MAH (ARAUJO; SILVA 2006).

Garcia-Vallejo et al. (2005) detectaram a presença de autoanticorpos em soro de pacientes com PET/MAH contra proteínas de astrócitos humanos cultivadas in vitro e proteína de cérebro humano normal. Essas proteínas apresentam semelhança molecular com proteínas gag e tax do HTLV-1 em pacientes com PET/MAH. Esses experimentos mostraram fortes evidências que o processo de desmielinização que ocorre durante a doença pode ser mediado por limitação molecular entre o domínio de algumas proteínas virais e alvos celulares normais (GARCIA-VALLEJO et al. 2005).

A resposta imune humoral é detectável tanto nos pacientes com PET/MAH como nos assintomáticos. Sendo descrito que nos pacientes os títulos de anticorpos são mais elevados que nos assintomáticos. Da mesma forma, a carga viral tem sido mostrada ter uma relação com a doença (KIRA et al., 1992).

No Brasil, Montanheiro et al (2005), mostraram os valores de carga viral em 44 pacientes com PET/MAH e 55 assintomáticos. Variando nos assintomáticos de 5 a 4.756 de cópias/ml, com média de 271 cópias e, nos pacientes variou de 5 a 5.360 cópias/ml, com a média de 679 cópias.

Um estudo realizado com 28 crianças portadoras de dermatite infecciosa associada ao HTLV-1 comparou os resultados de carga viral dos pacientes com PET/MAH com os assintomáticos. A média de cópias encontrada nos pacientes com dermatite foi de 160.480 cópias/ 10^6 células, enquanto a carga viral dos portadores assintomáticos apresentava uma média de 25.337 cópias/ 10^6 células. Nenhuma diferença estatística foi encontrada entre os pacientes com a dermatite infecciosa e os portadores de PET/MAH, no entanto, foi evidenciada a importância da carga viral no risco do desenvolvimento dessas doenças (PRIMO et al., 2009).

Os pacientes com PET/MAH apresentam um percentual de células regulatórias (Foxp3+) CD4+ e CD25+ menor que os portadores assintomáticos e os indivíduos saudáveis, no entanto existe uma tendência das células Foxp3+ na população CD4+ ser mais alta nos pacientes com PET/MAH. Sugerindo dessa forma que um aumento das células Foxp3 negativas na população CD4+ é um dos fatores determinantes da imunidade mediada por células controlar a infecção pelo HTLV-1 (SAITO, 2010).

A resposta das células T auxiliares CD4+ tem uma importância central em direcionar células B e células CD8+. O fenótipo células T auxiliares Th1 específicas predomina nos dois grupos, tanto nos pacientes com PET/MAH quanto nos assintomáticos, havendo uma frequência mais alta de interferon γ (INF- γ), fator de necrose tumoral α (TNF α) e produção de interleucina 2 (IL-2) nos portadores da doença do que nos assintomáticos. O papel da CD4+ em iniciar e causar a PET/MAH consiste também com as observações da imunogenética, com a associação do HLA DRB1 * 0101 e a susceptibilidade para a PET/MAH (HARASHIMA et al. 2005).

Relatos indicam que os linfócitos T citotóxicos CD8+ específicos são amplamente ativados e tem como alvo a tax, proteína transativadora viral. As células dendríticas são células processadoras de antígenos e podem exercer um papel crítico na regulação da resposta imune adaptativa (SAITO, 2010).

2.5.3 Doenças autoimunes e complicações de doenças infecciosas

Um amplo espectro de síndrões 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 (KAWAI et al., 1992; SOWA, 1992; BEILKE et al., 1996).

O HTLV-1 tem sido associado com doenças pulmonares. Recentemente, Teruya et al. (2008), mostraram evidências do envolvimento da *tax* no desenvolvimento de tais doenças através da produção de citocinas inflamatórias pela célula T que podem contribuir nas características clínicas da doença.

Manifestações reumáticas e ou autoimunes como doença de “Grave”; Síndrome de Sjogren; polimiosite e artrite têm sido descritas em muitos relatos de séries de casos. Evidências sugerem que a expressão de genes restritos pelas células apresentadoras de antígenos como o gene *px*, desencadeiam uma forte resposta através da ativação dos linfócitos CD4+ e CD8+. (SHUH; BEILKE 2005).

O gene *px* codifica dentre outras proteínas, a p40 *tax*. Essa proteína dentre outras funções regula a expressão de vários genes que produzem substâncias envolvidas no processo inflamatório (SHUH; BEILKEI, 2005). Em uma pesquisa feita com 202 pacientes com artrite reumatóide (AR) e 200 pessoas saudáveis, foi investigada a presença de alguns vírus, como o vírus da hepatite B (HBV), o vírus da hepatite C (HCV), Epstein Bar (EBV), HTLV-1, citomegalovírus (CMV) e o vírus herpes simples (HSV). Foi demonstrado que a frequência de anticorpo total para HBV, HTLV-1 e CMV foi igual nas duas populações. No entanto, IgM para HSV, CMV e HBV foram mais frequentes em pacientes com AR que nas pessoas

saudáveis (KURBANOL;MAMEDOV, 2009). A tabela 2 resume as manifestações clínicas associadas a infecção do HTLV-1.

Tabela 3. Manifestações clínicas da infecção pelo HTLV-1.

Malignas	Manifestações nerológicas	Desordens autoimunes	Doenças infeciosas
LLTA aguda	PET/MAH	Polimiosite	Infecções oportunistas em pacientes com LLTA
LLTA crônica		Artrites	Pneumonites por citomegalovírus
LLTA smoldering		Uveítes	Herpes zoster disseminada
LC-T não-smoldering		Tireoidites	Pneumonia por <i>P. carinii</i>
		Síndrome de Sjogren	Aspergilose, criptococose, tuberculose
		Pneumonites	Dermatite infecciosa em criança <i>Strongiloides stercoralis</i>

Fonte: Adaptado de MAUREEN SHUH (2005).

O HTLV-1 também pode, junto com outros retrovírus, servir como cofator para o avanço da doença. A coinfeção do HTLV-1 é bem frequente com o HIV e essa interação dos dois vírus ainda deixa alguns questionamentos, tais como se existe uma maior probabilidade desses indivíduos coinfectados desenvolverem a PET ou Leucemia, ou se essa interação acelera a progressão da AIDS (SHUH; BEILKE 2005).

2.6 Diagnóstico sorológico e molecular da infecção pelo HTLV-1

2.6.1 Testes Sorológicos

O diagnóstico laboratorial da infecção pelo HTLV-1 é feito através da detecção sorológica de anticorpos específicos para componentes antigênicos das diferentes porções do vírus (core e envelope). Inicialmente, os testes imunoenzimáticos utilizados tinham como princípio básico um lisado de células cultivadas e infectadas com o HTLV-1, o que proporcionava um grande percentual de reações falso-positivas, além da baixa sensibilidade para o HTLV-2. No entanto, os testes passaram a ser produzidos com antígenos recombinantes e peptídeos sintéticos que passaram a ter de 70 a 95% de sensibilidade, diminuindo o número de resultados falso-positivos (FERREIRA-JUNIOR et al. 2007).

Existem os testes de aglutinação que se caracterizam pela utilização de partículas de gelatina e/ou de látex sensibilizadas com antígenos virais. Possuem uma alta sensibilidade, no entanto, assim como o ensaio imunoenzimático (ELISA), produzem muitas reações falso-negativas. (FERREIRA-JUNIOR et al. 2007).

Contudo, o imunodiagnóstico do HTLV-1 depende da confirmação de outro teste, o Western Blotting (WB). Este é um teste confirmatório e discriminatório usado para a confirmação da infecção pelo HTLV. Isso se deve ao fato da incorporação de proteínas recombinantes como a GD21 proteína transmembranária e as gpR46-1 e a gpR46-2 do envelope (RUDOLPH et al., 1993; KLEINMAN et al., 1994.)

O teste de WB, usado como confirmatório, também tem um determinado percentual de resultados indeterminados, chegando a representar 0,2% em áreas não endêmicas e até 50% em áreas endêmicas. Alguns relatos têm demonstrado

que alguns resultados indeterminados são positivos por testes moleculares (TEIXEIRA et al., 2003; BERINI et al., 2007; COSTA et al., 2009). Os testes de WB estão representados na figura 5.

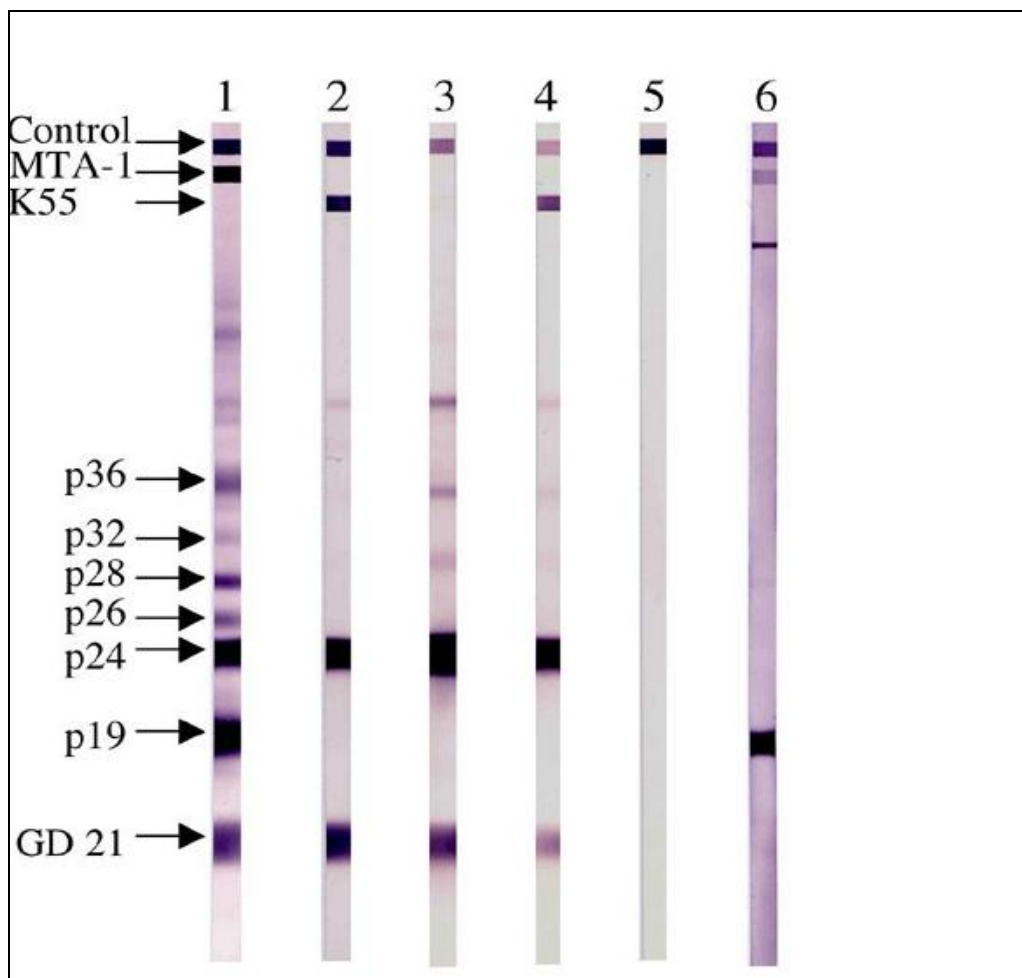


Figura 5. Fitas de Western Blot para HTLV-1. Fonte: www.retrovirology.com/content/2/1/30.

Legenda: 1- Proteínas que caracterizam uma amostra positiva para HTLV-1; 2- Proteínas que caracterizam uma amostra positiva; para HTLV-2; 3- Perfil de uma amostra indeterminada; 4 e 6- Amostras positivas para HTLV-2; 5 – Amostra negativa.

Araújo et al (2009), relataram que estudos feitos na Argentina e Brasil sobre testes sorológicos para o diagnóstico do HTLV-1 e 2, demonstram a necessidade do uso de dois testes de triagem usando como confirmatório um teste da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Eles acreditam que usando esse algoritmo como

estratégia reduzirá os resultados falsos-positivos proporcionando uma maior segurança na triagem de banco de sangue como no diagnóstico final da infecção pelo HTLV-1 e 2.

2.6.2 Testes Moleculares

Os testes moleculares para detecção do HTLV-1 são realizados a partir do provírus integrado ao genoma humano, que ocorre após a infecção viral. Assim, a técnica molecular mais adequada é a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Essa 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. O produto da reação pode ser analisado após eletroforese em gel de agarose.

As regiões mais usadas para diagnosticar e estudar a presença do HTLV-1 e HTLV-2 são *env*, *tax* e *pol* (HENNI et al.,1990; HENEINE et al.,1992). Heneine et al. (1992) verificaram a sensibilidade e especificidade das regiões *tax* e *pol* usando amostras de diferentes regiões dos Estados Unidos e Índios Guaymi, do Panamá. Fizeram comparações usando outros “primers” de regiões diferentes, obtendo resultados compatíveis.

Outra técnica de PCR denominada PCR em tempo real foi desenvolvida utilizando sondas luminescentes ou corantes que se ligam ,à fita dupla de DNA, e através da leitura da absorbância, ou densidade ótica dessas sondas, é possível visualizar o processo de amplificação à medida que o evento acontece. Essa técnica permite detectar o agente viral e quantificar o número de cópias presentes na amostra (MACKAY et al., 2002).

Os testes moleculares tornaram-se uma ferramenta muito importante tanto no diagnóstico, como na elucidação de determinantes genéticos que possam estar ligados aos mecanismos das doenças associadas. Estudos realizados em diversas populações de várias partes do mundo tentam esclarecer esses eventos (MALONEY et al., 2004; MURPHY et al., 2004; OKAYAMA et al., 2004; CASSEB et al., 2006;).

Existem outras utilizações importantes para a PCR no diagnóstico, como definir amostras que se encontram com resultados sorológicos indeterminados; tipar e subtipar o HTLV e investigar a transmissão mãe-filho do HTLV-1 precocemente (TEIXEIRA SANTOS et al., 2003; TAMEGÃO-LOPES et al., 2006; SOUZA, 2006).

2.7 Mutações nas doenças associadas ao HTLV-1

Para o desenvolvimento das doenças associadas uma série de fatores como a genética e o sistema imune do hospedeiro, como também deleções ou variações em determinadas regiões dos genes virais como a região *px*, influenciam nas etapas que podem levar ao início das doenças (MIYAZAKI et al., 2007).

Alguns trabalhos relatam variações em pacientes com LLTA onde ocorre deleção das regiões como *gag* e *env*, embora a região *px* que codifica as proteínas *tax* e *rex* permaneça intacta. Esse tipo de deleção caracteriza um vírus defectivo (TAMIYA et al., 1996; HILL et al., 1999; FURUKAWA et al., 2000).

O HTLV-1 defectivo é um provírus que não tem o seu genoma completo, alguma região ou regiões sofreram deleções (TAKENOUCHI et al. 2010). KORBER et al. (1991) mostraram que 6 de 19 (32%) pacientes com LLTA, apresentaram a terminação 5' do genoma viral deletado. Em um estudo feito em pacientes com subtipos de LLTA (leucemia aguda, crônica e indolente), foram detectados dois vírus

defectivos. Um deles com as regiões 5'LTR e 3'LTR mantidas, mas faltavam as seqüências internas, GAG e POL. O segundo apresentava deleção na 5'LTR, ficando o provírus apenas com a 3'LTR na seqüência viral (TAMIYA et al., 1996). A freqüência maior do vírus defeectivo é observado em formas agressivas da leucemia, os resultados obtidos mostram que 38% dos pacientes que tinham a leucemia aguda, (21/54) eram portadores do último tipo de deleção, na região 5'LTR e que esse mesmo tipo de deleção ocorre em uma freqüência menor 18% (9/50) nas formas crônicas, demonstrando a correlação entre o vírus defeectivo e os subtipos clínicos da LLTA (TAMIYA et al., 1996) .

De acordo com Tamiya et al. (1996) isto se deve às instabilidades genéticas e ao fato de que essas células que portam o provírus inserido são selecionadas por escaparem da vigilância imunológica, levando ao processo da leucemogênese.

Em 1994, Kira et al. (1994), identificaram a seqüência do HTLV-1 em tecido do sistema nervoso central de três pacientes com PET/MAH e um paciente com esclerose múltipla. Os autores relataram heterogeneidade no genoma do HTLV-1 nos três casos, mostrando um genoma defeectivo em determinada posição das seqüências *tax* e *rex*, além de uma inserção, criando uma nova ORF de 33 aminoácidos na seqüência *tax*. Contudo, essas alterações não estavam presentes no portador soropositivo que apresentava outras alterações neurológicas não característica da PET/MAH. Concluindo, portanto, que uma mutação derivada de uma deleção ou inserção de nucleotídeos, a menor alteração que apareça comumente encontrada no PET/MAH, pode ter alguma relação com o desenvolvimento da doença.

Ramires et al. (2003) apresentaram dados de 32 pacientes portadores da PET/MAH com sorologia positiva para HTLV-1 e 40 pacientes com PET/MAH mas

com a sorologia negativa. O provírus completo foi encontrado em 100 % dos casos de PET/MAH com sorologia positiva, já naqueles com sorologia negativa para o HTLV-1 o vírus defectivo foi detectado em 42,5% (17/40), ou seja, estavam presentes a região tax e env/tax e ausentes outras regiões do vírus.

A tax (p40) é proteína regulatória codificada na região px, que 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).

A tax afeta a função de várias proteínas regulatórias interagindo diretamente com outras proteínas dentro da célula, proporcionando uma série de eventos: replicação descontrolada; inibição da reparação do DNA; além de impedir o ciclo de repouso celular e a apoptose (AZRAN et al., 2004).

Têm sido descritos dois subtipos de HTLV-1, de acordo com substituições encontradas em posições específicas da sequência tax, denominada tax A e tax B. O subtipo tax A é mais encontrado em pacientes com PET/HAM do que em portadores assintomáticos, como mostrou Furukawa et al. (2000), estando presente em 15,5% (30/192) dos pacientes com PET/MAH e em 7% (14/200) dos portadores assintomáticos. Essa mutação representa substituições de nucleotídeos e mudança na sequência de aminoácidos nas posições 7279 e 8082.

2.8 Soroprevalência e epidemiologia molecular do HTLV- 1 no Brasil

No Brasil, o marco inicial das pesquisas sobre HTLV-1 ocorreu em 1986 quando foi realizado um estudo com 96 japoneses e seus descendentes, todos procedentes da cidade de Okinawa, no Japão que viviam no estado do Mato Grosso (KITAGAWA et al., 1986). A soroprevalência encontrada foi de 10% mostrando a disseminação do HTLV-1 através da migração dos japoneses procedentes de áreas endêmicas daquele país.

Em 1989, Cortes et al. encontraram uma prevalência de 1% a 13% para o HTLV-1 em indivíduos pertencentes a grupos de risco como: homossexuais, bissexuais, prostitutas e portadores de doenças sexualmente transmissíveis. Ainda neste estudo foram incluídos hemofílicos e doadores de sangue, procedentes das regiões metropolitanas do Rio de Janeiro, São Paulo e duas cidades da zona rural do Estado de Minas Gerais. Assim, ficou demonstrado que a infecção por HTLV-1 era endêmica no Brasil .

Catalan-Soares et al. (2001), apresentaram a prevalência encontrada de 1986 a 1999 em diversas regiões brasileiras em grupos de risco para este retrovírus como também em doadores de sangue e portadores de doenças associadas ao HTLV-1/2, esses dados estão descritos na tabela 3.

Tabela 4. Estudos de soroprevalência do HTLV-1/2 no Brasil de 1986–1999.

Grupo estudado (local do estudo)	N	HTLV-1/2 (%)	Fonte
Imigrantes japoneses	147	10 (6,8)	Kitagawa <i>et al.</i> 1986
De Okinawa	96	10 (10,4)	
De outras partes	51	0 (0,0)	
Doadores de sangue (RJ)	2.138	9 (0,4)	Lee <i>et al.</i> 1989
Pacientes em risco para retrovirose	548	20 (3,6)	Cortes <i>et al.</i> 1989
Hemofílicos (RJ, SP e MG)	ND	(13,0)	
Pacientes com doenças malignas (RJ)	215	8 (3,7)	Andrade-Serpa <i>et al.</i> 1989
Índios	137	43 (31,5)	Nakauchi <i>et al.</i> 1990
Pacientes com câncer (Belém, PA)	43	10 (23,3)	
Pacientes com distúrbios neurológicos (SP)	150	46 (30,7)	Franca <i>et al.</i> 1990
Pacientes com ATL (RJ)	14	11 (78,6)	Pombo de Oliveira <i>et al.</i> 1990
Pacientes com mielopatia não-traumática, não-tumoral (Salvador, BA)	43	9 (20,9)	Meireles <i>et al.</i> 1992
Índios de treze tribos (AM, PA, MT)	624	109 (17,5)	Maloney <i>et al.</i> 1992
Doadores de sangue (SP)	17.063	30 (0,2)	Ferreira Jr. <i>et al.</i> 1994
Gestantes (Belo Horizonte, MG)	1.500	17 (1,1)	Andrade <i>et al.</i> 1995
Pacientes com mielopatia de etiologia desconhecida (BA)	62	17 (27,4)	Andrade-Filho <i>et al.</i> 1996
Doadores de sangue			Galvão-Castro <i>et al.</i> 1997
Manaus	1.200	1 (0,08)	
Recife	1.200	4 (0,33)	
Salvador	1.040	14 (1,35)	
Rio de Janeiro	1.200	4 (0,33)	
Florianópolis	1.200	1 (0,08)	
Pacientes com doença linfoproliferativa	152	44 (28,9)	Farias de Carvalho <i>et al.</i> 1997
Doadores de sangue	ND	(0,4)	
	ND	(0,1)*	
Politransfundidos	351	36 (10,3)	
Familiares de infectados pelo HTLV-1/2	109	30 (27,5)	
Índios Kaiapós (filhos de mães positivas p/ HTLV-2)	141	59 (41,8)*	Novoa <i>et al.</i> 1997
Doadores	ND	(0,5 a 1,8)	Pombo de Oliveira <i>et al.</i> 1997
Politransfundidos	ND	(9,0 a 12,0)	

Tabela 4. (cont.)

Co-infectados com HIV (locais variados)	ND	(6,3)	
Usuários de drogas endovenosas (Salvador, BA)	217	55 (25,3) 21 (9,7)*	Dourado <i>et al.</i> 1997
Doadores de sangue (Natal, RN)	47.078	28 (0,1)	Cavalcanti Jr. <i>et al.</i> 1997
Doadores de sangue (Belo Horizonte, MG)	95.823	58 (0,1)	Fundação Hemominas, 1998 Serviço de estatística
Hemofílicos (Belo Horizonte, MG)	226	11 (4,9)	Carneiro Proietti <i>et al.</i> 1998
Pacientes com:	33	0 (0,0)	Lorenzetti <i>et al.</i> ; 1999
Lúpus eritematoso sistêmico	69	4 (5,8)	
Artrite reumatóide (Porto Alegre, RS)			
Gestantes (Salvador, BA)	6.754	53 (0,8)	Bittencourt <i>et al.</i> 1999
Pacientes com:		67 (20,8)	
Doença neurológica crônica	322	52 (50,0)	Gomes <i>et al.</i> 1999
Mielopatia crônica	104		

Fonte: Catalan-Soares et al (2001).

* = HTLV-2; ND = informação não disponível

Todos estes trabalhos justificaram a portaria de nº1376 (19/11/1993, D.O.U. nº 229) do Ministério da Saúde, obrigando todos os serviços de hemoterapia a realizarem testes sorológicos de triagem para o HTLV-1. Desde o ano de 1993, a testagem sistemática nos doadores vem demonstrando variações de soroprevalência entre os diversos estados do Brasil.

Galvão-Castro (1997) mostrou índices que variavam de 0,08% em Santa Catarina a 1,35% no Estado da Bahia. Catalan-Soares et al. (2005) publicaram um estudo com 6.218.619 doadores dos 26 estados brasileiros entre 1995 a 2000, onde o Nordeste aparece com um dos índices mais altos de positividade, em primeiro lugar a Bahia, com a prevalência de 0,94% e Pernambuco em segundo, com 0,75% para o HTLV-1.

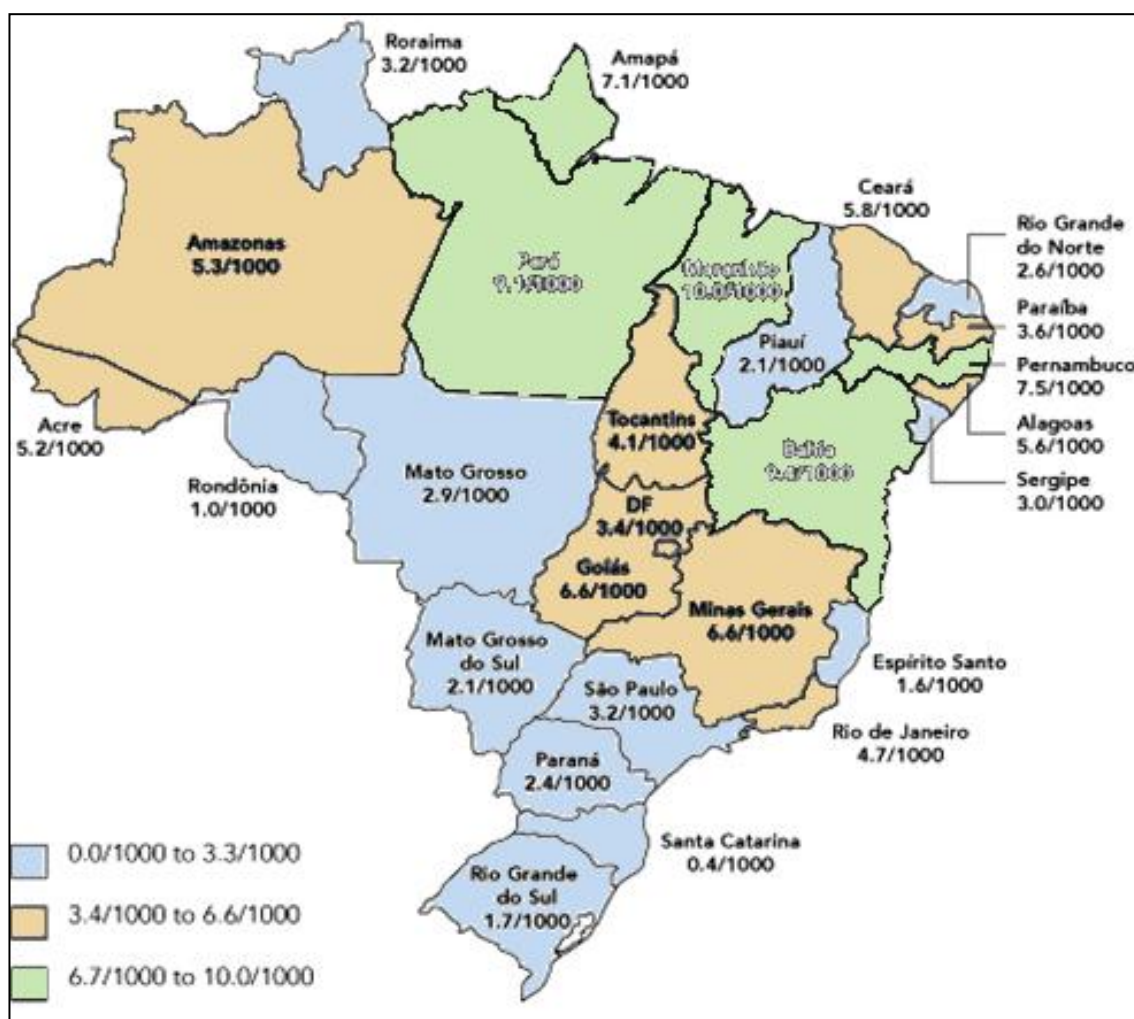


Figura 6. Razão de prevalência (por 1.000 doações) da triagem para HTLV-1/2 por ensaio sorológico enzimático (EIA) em doadores de sangue de capitais de 26 estados brasileiros e do Distrito Federal.

Fonte: Catalan-Soares et al. (2005).

A epidemiologia molecular do HTLV-1 no Brasil mostra que o subtipo cosmoplita e o subgrupo transcontinental predominam em populações indígenas, pacientes portadores de LLTA e a PET/MAH (POMBO-de-OLIVEIRA et al., 2001; SEGURADO et al., 2002; LAURENTINO et al., 2005; SOUZA et al., 2006)

Muitos trabalhos mostraram a confirmação da infecção para HTLV-1 e HTLV-2 por técnicas moleculares. Estudos de subtipagem em populações

indígenas, assim como outros estudos envolvendo a carga viral de pacientes e portadores assintomáticos apresentaram resultados concordantes com o que é descrito na literatura mundial, em que a carga viral apresenta-se maior em pacientes com PET/MAH que em portadores assintomáticos (MONTAHEIRO et al., 2005; SILVA et al., 2007; LOUREIRO, 2009)

Em Pernambuco, pesquisas pioneiras referentes à infecção pelo HTLV-1 tiveram início em 1990, com o diagnóstico de uma LLTA (FLORÊNCIO et al., 1990). Loureiro et al. (1994) efetuaram um estudo piloto em 700 doadores de sangue que mostrou uma soroprevalência de 0,8% para HTLV-1. Além destes indivíduos foram incluídos neste estudo pacientes de grupo de risco para a infecção pelo HTLV-1 tais como hemofílicos, pacientes portadores de anemias hereditárias e pacientes com leucemias e linfomas. Linhares et al. (1995), em um trabalho de soroprevalência de anticorpos para HTLV-I em indivíduos com filariose, encontraram concomitância das infecções em 2,9% dos indivíduos estudados. Loureiro (2009) achou uma frequência de 6,7% em 60 pacientes portadores do HTLV-1 e *Strongyloides stercoralis*.

Na tentativa de se conhecer qual o nível de transmissão por via vertical da infecção por HTLV-1 foi realizado um trabalho de testagem sorológica em 1.000 gestantes atendidas de forma prospectiva em uma clínica de atendimento pré-natal do Instituto Materno Infantil de Pernambuco (IMIP). A triagem sorológica inicial foi realizada através do ELISA e confirmados por WB demonstraram uma soroprevalência de 0,5% (5/1000) (LOUREIRO et al., 1995).

A relação entre HTLV-1 e outras doenças transmissíveis pelo sangue como sífilis e doença de Chagas, foram avaliadas em 408 indivíduos infectados pelo HTLV-1 e 2, selecionados pela triagem sorológica do banco de sangue. Nesses indivíduos não foi detectado nenhuma evidência da doença de Chagas, no entanto, 12 indivíduos apresentaram testes sorológicos positivos para sífilis. Uma análise estatística realizada entre o grupo coinfectado sífilis/HTLV-1 e os doadores de sangue HTLV negativos não demonstraram associação da sífilis com a infecção pelo HTLV-1 (LOUREIRO, 2009). A Tabela 4 mostra a soroprevalência para HTLV-1/2 encontrada na região metropolitana do Recife entre 1994 e 1998.

Esses dados mostram a alta positividade da infecção pelo HTLV-1 em diversos grupos estudados, ressaltando os grupos mais vulneráveis à transfusão sanguínea como os hemofílicos (16,6%), os portadores de doença renal crônica (6,6%), portadores de anemias (11,2%), doenças hematológicas (11,7%) (LOUREIRO et al., 1994). Pacientes atendidos em ambulatório e com doenças sexualmente transmissíveis, mostraram um percentual de infecção de 4,2% e 4,7% respectivamente (BEZERRA et al., 1997).

Tabela 5. Estudos de soroprevalência para HTLV-1 no período de 1994 a 1998 na Região Metropolitana do Recife.

Grupo Região	N	HTLV	Fonte
Metropolitana do Recife			
Doadores de sangue	700	6 (0,8%)	Loureiro et al (1994)
Hemofílicos	54	9 (16,6%)	
Linfoproliferativas	84	7 (8,7%)	
Anemias hereditárias	62	7 (11,2%)	
LMA	27	2 (7,4%)	
PTI	35	2 (2,8%)	
Linfoma não-Hodgkin	17	2 (11,7%)	
Aplasia medular	13	2 (16,6%)	
LMC	18	2 (16,6%)	
Doadores de sangue	5939	0,3%	Bezerra et al (1996)
Politransfundidos	54	18,5%	
Hemodiálise	112	6,6%	
Doença hematológica	69	11,7%	
Pacientes ambulatoriais	215	4,2%	
Pacientes com DST	63	4,7%	Bezerra et al (1998)
Co-infectados HIV/HTLV	462	8 (1,73%)	
Recife			
Pacientes com anemia falciforme	155	12 (8%)	Torres et al (1998)

Fonte: Loureiro, 2009.

3.0 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Verificar a presença do provírus defectivo e classificar a sequência *tax* do HTLV-1 em portadores assintomáticos e pacientes com PET.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar o provírus defectivo pesquisando as seqüências *env*, *tax* e *5'LTR* do HTLV-1 em portadores assintomáticos e pacientes com PET/MAH.
- Verificar a presença do provírus defectivo pela detecção das seqüências *env*, *tax* e *5'LTR* do HTLV-1 em doadores de sangue com sorologia negativa e indeterminada para o vírus.
- Determinar a freqüência de provírus defectivo em portadores assintomáticos e pacientes com PET/MAH.
- Avaliar a associação entre a presença do provirus defectivo e a PET/MAH.
- Classificar a seqüência *tax*, identificando os subgrupos A ou B em portadores assintomáticos e pacientes com PET/MAH.
- Avaliar a associação dos subgrupos da seqüência *tax* com a presença da PET/MAH.
- Quantificar a carga proviral do HTLV-1 em portadores assintomáticos e pacientes com PET/MAH e estimar estatisticamente a sua significância

4.0 HIPÓTESE

O provírus defectivo e os subgrupos da seqüência *tax* do HTLV-1 podem estar associados à presença de PET/MAH.

5.0 METODOLOGIA

5.1 Desenho do estudo

O estudo tem estrutura de caso-controle, atendendo aos objetivos de investigar se o provírus defectivo e a mutação na seqüência tax estão associados ao risco de desenvolver PET/MAH.

5.2 População de estudo

Participaram do estudo 52 pacientes com PET/MAH atendidos no Ambulatório de Neurologia do Hospital da Restauração e 72 doadores de sangue procedentes do Hemope no período de março de 2008 a outubro de 2009.

Foram analisados três grupos de doadores:

- 1- sendo o primeiro, 72 doadores com resultados positivos e confirmados para a infecção para o HTLV-1
- 2- o segundo, 100 doadores com resultados sorológicos negativos selecionados aleatoriamente entre aqueles que apresentaram outros marcadores virais negativos além do HTLV-1/2, como HIV, HCV e HBsAg como também doadores de retorno.
- 3- O terceiro, 23 doadores com resultado indeterminado pelo teste de Western Blot.

Os doadores de retorno são aqueles que retornaram ao Hemope para uma nova coleta após uma sorologia positiva ou indeterminada para HTLV-1. Para serem incluídos no estudo, estes doadores deveriam apresentar uma nova sorologia negativa confirmada por PCR para as seqüências env e tax do HTLV-1.

Casos: 52 Pacientes com PET/MAH que apresentavam as características da doença de acordo com os critérios estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS), descritos no quadro 1.

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), poliomiosite, 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 cerebrospinal (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.

Quadro 1. Critérios diagnósticos para PET/MAH estabelecidos pela OMS.

Fonte: Castro-Costa et al. (2006), adaptado por Loureiro (2009).

Controles: Fizeram parte desse grupo 72 doadores de sangue portadores do HTLV-1 positivos no ELISA e confirmados pelo western blotting, mas com a infecção assintomática.

5.3 Definição do tamanho amostral

O tamanho da amostra para comparar a taxa de presença de vírus defeectivo para o grupo de pacientes com PET/MAH e um grupo controle (doador positivo para HTLV-1 assintomáticos) foi de 51 para cada grupo. Os artigos utilizados para o cálculo da amostra estão descritos na tabela 4. Aproximadamente 24,66% dos casos e 1,42% dos controles têm presença de vírus defeectivo. Considerando 95% de chance de detectar diferença a um nível de significância de 5%.

Tabela 6. Referências para o cálculo da amostra.

GRUPOS	Positivos para o vírus defeectivo	Negativos para o vírus defeectivo	Referência
Pacientes com PET/MAH	17	55	E. Ramirez et al. (2003)
Portadores assintomáticos	3	205	Takenouchi H., et al. (2010)

Fonte: Elaborado pela autora.

5.4 Definição das variáveis e coleta de dados

5.4.1- Variável dependente:

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.

5.4.2- 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. Variável quantitativa discreta.
- Densidade ótica do ELISA para HTLV-1/2: definida pela absorbância da amostra no ELISA para anti- HTLV-1/2 lida no espectrofotômetro. Variável quantitativa discreta.
- Presença da sequência *5'LTR*: definida pela detecção da sequência LTR do HTLV por PCR. Variável nominal dicotômica categorizada como presente ou ausente.
- Presença da sequência *tax*: definida pela detecção da sequência *tax* do HTLV por PCR. Variável nominal dicotômica categorizada como presente ou ausente.
- Presença da sequência *env-tax*: definida pela detecção da sequência *env-tax* do HTLV por PCR. Variável nominal dicotômica categorizada como presente ou ausente.
- Tipo do provirus: definida pela detecção das sequências *5'LTR*, *tax* e *env-tax* do HTLV-1 por PCR. Variável nominal dicotômica categorizada como vírus completo, em caso da presença das três sequências e vírus defeectivo, em caso da ausência de uma dessas sequências.
- Carga proviral do HTLV: definida pela quantificação do número de cópias do DNA do HTLV-1. Variável quantitativa discreta, quantificada em unidades de 10^6 células/ ml de sangue.

5.5 Coleta das amostras sangüíneas

Os indivíduos dos dois grupos foram submetidos à coleta de sangue em dois tubos de 05 ml, sendo um deles sem anticoagulante para a realização do teste ELISA para anti-HTLV-1/2 e o outro com o anticoagulante EDTA para a os testes moleculares.

5.6 Processamento das amostras sangüíneas

As amostras sangüíneas para a sorologia foram centrifugadas para obtenção do soro, que foi transferido para microtubos tipo eppendorf e armazenado a -20°C até a realização dos testes.

Nas amostras coletadas com EDTA, o sangue foi processado até 48 horas após a coleta, ficando em temperatura ambiente para uma posterior extração de DNA genômico, onde se encontra o provírus inserido no DNA de linfócitos.

5.7 Sorologia para HTLV-1/2

A pesquisa de anticorpos para o HTLV-1/2 em doadores e pacientes com PET/MAH foi feita utilizando-se o kit HTLV-1/HTLV-2 ab capture system (ORTHO), um teste imunoenzimático qualitativo executado de acordo com as instruções do fabricante.

5.8 Separação dos linfócitos

Todas as amostras coletadas com EDTA foram submetidas a um processo para separação dos linfócitos. O procedimento foi feito em um tubo falcon de 15 ml e consistiu na diluição de uma alíquota de 4 ml de sangue total em 3ml de *sepcell* (LGC Biotecnologia), um reagente comercial para isolamento de linfócitos. Após centrifugação por trinta minutos 1.700 rpm, a fase que continha os linfócitos foi transferida para um novo tubo falcon utilizando-se uma pipeta pasteur descartável.

Em seguida, procedeu-se a “lavagem” dessas células com 8 ml de meio RPMI (LGC Biotecnologia) específico para cultura celular por centrifugação a 1.200 rpm por três minutos. O sobrenadante foi descartado utilizando-se uma pipeta pasteur descartável, deixando-se 2ml de meio no tubo, onde as células foram ressuspensas e uma alíquota foi retirada para realizar a contagem de linfócitos em contador automático (ELX 300, Roche). Em seguida ajustou-se a suspensão para 1×10^6 células/ml.

5.9 Extração do DNA dos linfócitos

A extração de DNA dos linfócitos, previamente separados, foi realizada com o GFX Genomic Blood DNA Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech), executado de acordo com as instruções do fabricante.

5.10 Procedimento da PCR “in house”

A Reação em Cadeia da Polimerase é um método de diagnóstico *in vitro* de amplificação de seqüências curtas e específicas de DNA, muito rapidamente e de modo exponencial. Foi descrita pela primeira vez por Mullis et al. (1986). Todos os *primers* descritos nos procedimentos estão no quadro 5.

5.11 PCR utilizadas para a análise do provirus defeectivo

5.11.1 Nested – PCR para a seqüência *env-tax* - HTLV-1

1ª PCR: A reação foi padronizada para um volume final de 20 µl contendo 2 µl de DNA extraído, 2 mM de cada dNTP, o tampão da enzima 1X (200 mM Tris-HCl pH 8,4 e 500mM KCl), 1,5 mM MgCl₂, 2,5U *Taq* DNA Polimerase. Os *primers* internos utilizados foram **SK44** e **SK110** a 10pmol. A reação foi processada em termociclador (Flexigene 2.0, Techne) por 7min a 95°C, seguida de 35 ciclos de 95°C por 1min, 55°C por 1min e 30s 72°C por 2min e extensão final de 10min a 72°C.

2ª PCR: Foi usado na segunda reação dois microlitros do produto amplificado (diluído 1:10 com água destilada *Ultrapure* Invitrogen®) da primeira reação, para um volume final de 20µl. Os primers internos usados foram **SK248** e **SK249** a 10pmol. A reação foi processada no termociclador (Flexigene 2.0, Techne) por 5 minutos a 94°C, seguida de 30 ciclos de 94°C por 1min, 58°C por 1min, 72°C por 2min e extensão final de 10min a 72°C. Foi feita uma diluição de 8µl do produto amplificado com 2µl do tampão de amostra, o Blue Green loading dye (LGC Biotecnologia),

sendo posteriormente aplicado em gel de agarose a 1,8%, contendo brometo de etídio somente quando utilizado o azul de bromofenol.

Terminada a corrida eletroforética, os fragmentos de DNA foram visualizados no Gel-Pro® Imager CoolSNAP – MediaCybernetics sob fonte de luz UV. Quando observado um fragmento de 466 pb correspondente à sequência *env-tax* do HTLV 1, era feita a diferenciação do HTLV -2. Quando não era evidenciado nenhuma banda, logo a amostra era negativa para HTLV- 1, sendo então realizado a NESTED-PCR para o HTLV 2 de acordo com Lee et al., (2004).

5.11.2 Nested – PCR para a sequência *env-tax* - HTLV-2

A reação para o HTLV-2 foi padronizada para um volume final de 20 µl contendo 2 µl de DNA extraído, 2 mM de cada dNTP, 10 pmol de cada um dos dois *primers* externos, tampão de PCR 1X (200 mM Tris-HCl pH 8,4 e 500mM KCl), 1,5 mM MgCl₂, DMSO puro 1M e 2,5U *Taq* DNA Polimerase. O programa de amplificação foi de 7 minutos a 95°C, seguido de 35 ciclos de 95°C por 1min, 55°C por 1min e 30s, 72°C por 2min e extensão a 72°C por 10min. Dois microlitros do produto amplificado (diluído 1:10 com água destilada *Ultrapure* Invitrogen®) nesta reação, foram usados na segunda reação para o HTLV-2, mantendo a mesma mistura (“*mix*”) com volume final de 20µl e as temperaturas da primeira PCR.

Os *primers* externos usados foram **ET 401** e **SK 44**. Já os *primers* internos utilizados foram **ET 403** e **ET 404**. A visualização dos fragmentos de DNA foi realizada da mesma forma que aquela aplicada para o HTLV-1. Terminada a corrida eletroforética, fragmentos de DNA foram visualizados no Gel-Pro® Imager

CoolSNAP – MediaCybernetics sob fonte de luz UV. Caso observado um fragmento de 829 pb a amostra foi considerada positiva para HTLV -2 (LEE et al., 2004).

5.11.3 PCR para identificação da seqüência tax

É uma região genérica para HTLV-1/2, utilizando o par de primers **SK 43** e **SK 44**, ambos correspondem a seqüência tax do vírus, com 159 Pb, comum ao HTLV -1 e ao HTLV -2 (HENEINE, 1992).

A reação foi padronizada para um volume final de 25 µl contendo 3,5 µl de DNA extraído, 2mM de cada dNTP, 10 pmol de cada primer, Tampão de PCR 1X (200 mM Tris-HCl pH 8,4 e 500mM KCl), 1,5 mM $MgCl_2$, 2,5U/µl *Taq* DNA Polimerase. A reação foi processada no termociclador (Flexigene 2.0, Techne) por 15min a 95°C, seguida de 35 ciclos de 94°C por 20s, 58°C por 20s, 72 °C por 20s e extensão por 10min a 72°C..

Ao término da ciclagem, o produto de amplificação foi aplicado, juntamente com uma solução corante (azul de bromofenol), em um gel de agarose 2% em tampão TEB 1X contendo brometo de etídio ou “blue green loading dye”(LGC). Terminada a corrida eletroforética, o gel foi visualizado no mesmo transluminador em fonte de luz UV. Resultado positivo: presença de um fragmento de 152pb.

5.11.4 PCR para identificação da seqüência 5’LTR

Foi utilizado o protocolo de Ramires et al. (2003) com as seguintes adaptações na ciclagem no termociclador (Flexigene 2.0, Techne): 94°C por 5min,

seguida de 35 ciclos de 94°C por 60s, 60°C por 75s, 72°C por 95s e extensão de 72°C por 8min. O produto gerado foi de 401pb.

5.12 Determinação dos subgrupos A e B da seqüência *tax*

A classificação da seqüência *tax* foi realizada por PCR-RFLP, *restriction fragment length polymorfism* (RFLP) de acordo com o protocolo de Furukawa et al. (2000). Os *primers* utilizados foram PX01-; PX02+; PX13+ e PX13-. A digestão do produto da Nested PCR foi realizada com a enzima de restrição *AccII*. Esses fragmentos foram separados em um gel de agarose a 2%.

5.13 Quantificação do HTLV-1 nas amostras

O sistema utilizado foi o de SYBR Green, esse sistema emite grande quantidade de sinal fluorescente ao intercalar com o DNA dupla-fita. Neste sistema não é necessário a síntese de sonda fluorescente.

A quantificação da carga viral foi realizada segundo o protocolo de ARRUDA et al. (2008), utilizando o kit SYBR Green Master Mix (LGC Biotecnologia).

As amostras submetidas à quantificação foram amplificadas em duplicata, utilizando-se os seguintes *primers* SK110-pol: 5´– CCC TAC AAT CCA ACC AGC TCA G – 3´ e SK111-pol: 5´– GTG GTG AAG CTG CCA TCG GGT TTT – 3´.

5.14 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).

5.15 Quantificação do gene da albumina nas amostras

Todas as amostras foram amplificadas em duplicata, utilizando-se os seguintes *primers* : Alb-S: 5' – GCT GTC ATC TCT TGT GGG CTG T – 3' e Alb-AS: 5' – AAA CTC ATG GGA GCT GCT GGT T – 3'.

A mistura da reação usada nas duas reações utilizou 2 µL do DNA, 10 µM de cada *primer* e SYBR® Green Master Mix, em um total de 25 µL de reação. Tanto o HTLV-1 quanto a albumina seguiram o seguinte protocolo de amplificação: 2min a 50°C, 10min a 95°C; 15s a 95°C e 1min a 65°C (45 ciclos) e foram amplificados paralelamente no Rotor Gene 3000 (Corbett Life Science), no Laboratório de Virologia do LIKA/UFPE.

A quantificação da carga proviral de HTLV-1 foi calculada segundo 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,

Média do número de cópias de HTLV-1
 $\frac{\text{Células Monucleares da albumina}}{\text{Células Monucleares da albumina}} \times 2 \times 10^6 = \text{número de cópias / } 10^6 \text{ células PBMC } 10^6$

Primers	Descrição	Posição	Genes
PX01 +	5'TCGAAACAGCCCTGCAGATA-3'	7257-7276	<i>tax</i>
PX02 -	5' TGAGCTTATGATTTGTCTTCA-3'	8447-8467	<i>tax</i>
PX13+-	5' TTCCGTTCCACTCAACCCTC-3'	8001-8020	<i>tax</i>
PX13-	5' AGACGTCAGAGCCTTAGTCT-3	8374-8393	<i>tax</i>
LTR1-	5 'ACCATGAGCCCCAAATATCCC-3'	10-30	<i>LTR</i>
LTR6-	5' GCGTGGATGGCGGCCTCAAGGTA-3'	409-288	<i>LTR</i>
SK110	5' CCCTACAATCCAACCAGCTCAG	4757-4778	<i>pol</i>
SK43	5' CGGATACCCAGTCTACGTGT	7358 – 7377	<i>tax</i>
SK44	5' GAGCCGATAACGCGTCCATCG	7516– 7496	<i>tax</i>
SK248	5' CTAGTCGACGTCCCAGGATATGAC C - 3'	5669 – 5693	<i>env-tax</i>
SK249	5' CAGACCGCCACCGGTACCGCTCGG C – 3'	6137 – 6113	<i>env-tax</i>
ET 401	5' CTC CTA TTC TGG GAA CAA GGG GGT TT - 3'	6317– 6342	<i>env-tax</i>
HTLV-2			
ET 403	5' GGC TGG GGA CTA AAC TGG GAT CCT GG - 3'	6442– 6467	<i>env- tax</i>
HTLV-2			
ET 404	5' CCA AAC ACG TAG ACG GGG GAT CC – 3'	7249- 7271	<i>env-tax</i>
HTLV-2			
Alb-S	5' – GCT GTC ATC TCT TGT GGG CTG T – 3'		<i>albumina</i>
Alb-AS	5' – AAA CTC ATG GGA GCT GCT GGT T – 3'		<i>albumina</i>

Quadro 2. Primers utilizados nos testes de PCR.

Fonte: Elaborado pela autora.

5.16 Análise dos dados

Foi calculado o qui-quadrado de Pearson (χ^2) e o teste Exato de Fisher no programa SPSS v.15, para analisar a relação de independência entre a presença de PET/MAH e as variáveis qualitativas: gênero, presença da sequência *tax*, presença da sequência *env-tax*, presença da sequência *5'LTR* e tipo do provírus. Usou-se o teste t para a comparação das médias de densidade óptica (D.O) do ELISA e idade, nos dois grupos (paciente com PET/MAH e portador do HTLV-1 assintomático) e o teste Mann-Whitney para comparação das medianas da carga proviral nos grupos estudados, sendo considerado como resultado estatisticamente significativo um $p < 0,05$.

5.17 Limitações metodológicas do estudo

Procurou-se reduzir o viés de seleção por não haver distinção de casos incidentes e prevalentes, considerando-se todos pacientes atendidos no Serviço de Neurologia do Hospital da Restauração habilitados a participar do estudo.

A recusa do paciente em participar da pesquisa representa perda, também é um viés de seleção e pode interferir nos resultados finais. Buscamos minimizar este viés através de conversa com o paciente utilizando termos de fácil compreensão para explicar os objetivos do estudo.

Erros cometidos na dosagem carga viral do HTLV-1, identificação da sequências virais analisadas e subtipagem da sequência *tax* podem acontecer por causa de problemas na execução dos testes e ocasionam viés de classificação.

Procurou-se reduzir este viés aplicando técnicas laboratoriais já padronizadas e validadas.

5.18 Aspectos Éticos

O projeto da pesquisa foi submetido aos Comitês de Ética em Pesquisa do Hospital da Restauração e Fundação HEMOPE sob os registros nº 0029.0.102.000-07 e 033/06 respectivamente. Todos os participantes do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

6.0 RESULTADOS

Os resultados da tese serão apresentados em forma de artigos intitulados:

Artigo I – Identificação do provírus defectivo em portadores assintomáticos e pacientes com Paraparesia Espástica Tropical/ Mielopatia Associada ao HTLV-1.

Este artigo será submetido a Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (qualis B1).

Artigo II - Classificação da seqüência tax do vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1) em portadores assintomáticos e pacientes com paraparesia espástica tropical / mielopatia associada ao HTLV-1.

Este artigo será submetido ao Intervirology (qualis B1).

6.1 VERSÃO EM PORTUGUÊS DO ARTIGO I

Identificação do provírus defectivo

Identificação do provírus defectivo em portadores assintomáticos e pacientes com Paraparesia Espástica Tropical/ Mielopatia Associada ao HTLV-1

Ana Cristina de Souza Bezerra¹, Paulo Roberto Eleutério de Souza², Temístocles Ítalo de Santana², Leandro Souza de Melo², Jéfferson Luis de Almeida Silva³, Niedja Maristoni de Oliveira Barreto Queiroz¹, Maria Lúcia Brito⁴, Divaldo Almeida Sampaio¹, Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho^{3,5}.

1. Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (Fundação HEMOPE), Recife, Pernambuco, Brasil.
2. Laboratório Genoma, Centro, Universidade Federal de Pernambuco (URFPE), Recife, Pernambuco, Brasil.
3. Setor de Virologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Recife, Pernambuco, Brasil.
4. Departamento de neurologia do Hospital da Restauração.
5. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brasil.

Autor para correspondência:

Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

Rua Manuel Lubambo, 118

50850-040 Afogados Recife, PE, Brasil.

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

Fiananciamento: FACEPE

RESUMO

Uma série de fatores genéticos e do sistema imune do hospedeiro, bem como deleções ou variações em determinadas regiões dos genes do HTLV-1, influenciam nas etapas que podem levar ao início das doenças associadas a este vírus. Os objetivos desse trabalho foram pesquisar a existência do provírus defeutivo nos pacientes com Paraparesia Espástica Tropical/ Mielopatia Associada ao HTLV-1 (PET/MAH), como também em portadores do HTLV-1 assintomáticos (PHA) e, verificar sua associação com a PET/MAH. Foram estudados 52 pacientes com PET/MAH e três grupos de doadores de sangue, sendo 72 indivíduos PHA, 100 doadores soronegativos e 23 doadores com sorologia indeterminada para o HTLV-1, no período de março de 2008 a outubro de 2009. Todos os participantes foram submetidos a PCR para a detecção das seqüências 5'LTR, *env-tax* e *tax* do HTLV-1. A seqüência 5'LTR esteve ausente em quatro pacientes com PET/MAH e 11 indivíduos do grupo PHA. Por outro lado, três pacientes com PET/MAH não apresentaram a seqüência *env-tax* e sete indivíduos do grupo PHA não possuíam a seqüência *tax*. Identificou-se o provírus defeutivo em 4 pacientes com PET/MAH e 18 indivíduos do grupo PHA, além de ser demonstrada a associação entre a presença da seqüência *tax* e a PET/MAH.

Palavras-chaves: Vírus linfotrópico de células T humanas 1, vírus defeutivo, Paraparesia Espástica Tropical/ Mielopatia Associada ao HTLV-1.

INTRODUÇÃO

O vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1) é um retrovírus humano que está associado à leucemia/linfoma de células T do Adulto (LLTA), a uma síndrome neurológica denominada de Paraparesia Espástica Tropical/ Mielopatia Associada ao HTLV-1 (PET/MAH) (Gessain et al. 1985; Osame et al. 1989) e também à doenças como a uveíte, artropatias, polimiosite (Beilke et al. 1996; Mochizuki et al. 1994; Nischioka et al. 1989), síndrome de Sjögren's (Mariett et al. 1995) e dermatite infecciosa (LaGrenade et al.1990).

Uma série de fatores como a genética e o sistema imune do hospedeiro, assim como a presença de deleções ou variações em determinadas regiões do vírus podem influenciar as etapas que levam ao desencadeamento das doenças associadas ao HTLV-1 (Miyazaki et al. 2007).

O HTLV-1 pode apresentar-se como provírus defeutivo, isto é exibindo deleção em alguma região do seu genoma. Existem relatos sobre dois tipos de vírus defeitivos com variações genéticas na região *LTR*, apenas o tipo 2 é associado com a forma mais agressiva da LLTA (Tamiya et al. 1996). Kira et al. (1994), encontraram mutações na sequência *px* em amostra de tecido do sistema nervoso central (SNC) de pacientes com PET/MAH, e que essas mutações podem contribuir para a patogênese da doença. Suzuki et al. (1996) demonstraram a presença de mutações nos genes *tax* e *rex* da região *px*, em células sanguíneas e tecido do SNC de pacientes com PET/MAH.

No Brasil, De Castro e Costa et al. (1995), no Ceará, não identificaram deleções da região *pol* e nos genes *tax* e *rex* em pacientes com PET/MAH e sorologia negativa para HTLV-1. Em Pernambuco tais deleções não foram investigadas em pacientes com PET/MAH. Portanto, nossos objetivos foram pesquisar a existência do provírus

defectivo nos pacientes com PET/MAH, como também em portadores do HTLV-1 assintomáticos (PHA) e, verificar sua associação com a PET/MAH.

MATERIAL E MÉTODO

Seleção de população e local de estudo

Fizeram parte do estudo quatro grupos distintos de indivíduos no período de março de 2008 a outubro de 2009:

- Grupo PET/MAH - 52 pacientes com diagnóstico clínico de PET/MAH, sendo 49 com sorologia positiva e confirmada por Western Blotting para HTLV-1/2 e 3 pacientes soronegativos, atendidos no Serviço de Neurologia do Hospital da Restauração localizado em Recife/PE.
- Grupo de portadores do HTLV-1 assintomáticos (PHA) - 72 doadores de sangue com sorologia positiva e confirmada por Western Blotting para HTLV-1/2,
- Grupo de doadores soronegativos - 100 doadores de sangue negativos para anti-HTLV-1/2, anti-HIV, anti-HCV e HBsAg por ELISA.
- Grupo de doadores com sorologia indeterminada – 23 doadores de sangue com ELISA positivo ou indeterminado para HTLV-1/2 e que apresentaram resultado indeterminado no Western Blotting.

Os doadores de sangue foram provenientes da Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (Fundação HEMOPE) localizada em Recife-PE.

Testes sorológicos

A pesquisa do anticorpo contra o HTLV-1/2 foi realizada em doadores de sangue e portadores de PET/MAH por ELISA comercial (HTLV-1/HTLV-2 ab capture system, Ortho) e o teste confirmatório por Western Blotting comercial (WB HTLV 2.4, Genelabs Diagnosis). Todos os testes foram realizados de acordo com as instruções dos fabricantes.

Coleta das amostras sanguíneas e extração do DNA genômico de linfócitos

Para a realização dos testes moleculares os linfócitos foram separados do sangue total coletado em tubo com EDTA utilizando o *Sepcell* (LGC Biotecnologia) conforme instruções do fabricante. A extração de DNA dos linfócitos isolados foi executada com o GFX Genomic Blood DNA Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech).

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) in house

Seqüência 5'LTR

Foi utilizado o protocolo de Ramires et al. (2003) com as seguintes adaptações na ciclagem no termociclador (Flexigene 2.0, Techne): 94°C por 5min, seguida de 35 ciclos de 94°C por 60s, 60°C por 75s, 72°C por 95s e extensão de 72°C por 8min. O produto gerado foi de 399pb. As seqüência dos primers utilizadas estão descritas no Quadro 1.

Seqüência env-tax

A reação foi padronizada para um volume final de 20 µl contendo 2 µl de DNA extraído, 2 mM de dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, and dTTP), tampão da enzima taq 1X (200 mM Tris-HCl pH 8,4 e 500mM KCl), 1,5 mM MgCl₂ e 2,5 U/µl *Taq* DNA Polimerase. Os primers internos utilizados foram **SK44 e SK110** a 1,0 pmol. A reação foi processada em termociclador (Flexigene 2.0, Techne) por 7min a 95°C, seguida de 35 ciclos de 95°C por 1min, 55°C por 1min e 30s 72°C por 2min e extensão final de 10min a 72°C.

Para a segunda PCR, foram utilizadas as mesmas condições com dois microlitros do produto amplificado da reação anterior (diluído 1:10 com água destilada *Ultrapure* Invitrogen), para um volume final de 20µl. Os primers internos usados foram **SK248 e SK249** a 1,0 pmol. A reação foi processada no termociclador (Flexigene 2.0, Techne) por 5 minutos a 94°C, seguida de 30 ciclos de 94°C por 1min, 58°C por 1min, 72°C por 2min e extensão final de 10min a 72°C. O produto gerado foi de 468pb.

Seqüência tax

Foi utilizado o protocolo de Heneine et al. (1992), com adaptações para um volume final de 25 µl contendo 3,5 µl de DNA extraído, 2mM de dNTP (dATP, dGTP, dCTP, and dTTP), primers **SK43 e SK44** a 10pmol, tampão da enzima taq 1X (200 mM Tris-HCl pH 8,4 e 500mM KCl), 1,5 mM MgCl₂ e 2,5U/µl *Taq* DNA Polimerase. A reação foi processada no termociclador (Flexigene 2.0, Techne) por 15min a 95°C, seguida de 35 ciclos de 94°C por 20s, 58°C por 20s, 72 °C por 20s e extensão por 10min a 72°C. O produto gerado foi de 152pb.

<i>Primers</i>	<i>Descrição</i>	<i>Posição</i>	<i>Genes</i>	<i>Tamnhho do fagmento</i>
LTR1	5'-ACCATGAGCCCCAAATATCCC-3'	10-30	5' <i>LTR</i>	399
LTR6	5'-GCGTGGATGGCGGCCTCAAGGTA-3'	409-288	5' <i>LTR</i>	399
SK110	5'-CCCTACAATCCAACCAGCTCAG-3'	4757-4778	<i>pol</i>	----
SK43	5'-CGGATACCCAGTCTACGTGT-3'	7358 – 7377	<i>tax</i>	152
SK44	5'-GAGCCGATAACGCGTCCATCG-3'	7516– 7496	<i>tax</i>	152
SK248	5'-CTAGTCGACGTCCCAGGATATGACC-3'	5669 – 5693	<i>env-tax</i>	468
SK249	5'-CAGACCGCCACCGGTACCGCTCGGC-3'	6137 – 6113	<i>env-tax</i>	468

Quadro 1. Sequência dos primers utilizados para pesquisa das sequências 5' *LTR*, *env-tax* e *tax*.

Visualização dos produtos da PCR

A corrida eletroforética foi realizada em gel de agarose a 1,8% e os produtos visualizados em um fotodocumentador Gel-Pro® Imager CoolSNAP (MediaCybernetics) sob fonte de luz ultravioleta.

Análise estatística

Foi calculado o qui-quadrado de Pearson (χ^2) e o teste Exato de Fisher no programa SPSS v.15 para análise a relação de independência entre a presença de PET/MAH, gênero e as seqüências analisadas. O test T de Student foi utilizado para analisar a relação das médias de idade e densidade ótica do ELISA para HTLV-1/2 entre os grupos PET/MAH e PHA. Foi considerado como resultado estatisticamente significativo um $p < 0,05$ para todos os testes avaliados.

Ética

O estudo foi submetido aos Comitês de Ética em Pesquisa do Hospital da Restauração e Fundação HEMOPE sob os registros nº 0029.0.102.000-07 e 033/06 respectivamente. Todos os participantes do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

RESULTADOS

Houve maior frequência do sexo feminino no grupo PET/MAH, quando comparado ao grupo PHA ($p=0000$). A média de idade e da densidade ótica do ELISA para HTLV-1/2 foram superiores no grupo PET/MAH (tabela 01).

Tabela 1. Distribuição da média de idade e densidade ótica do ELISA para HTLV-1/2 nos grupos PET/MAH e de portadores do HTLV-1 assintomáticos (PHA).

	PET/MAH	PHA	T de Student	p
	Média±DP	Média±DP		
Idade	51,9±11,39	39,72±10,68	t = 6,09	0,000
Densidade ótica do ELISA para HTLV-1/2	3,694±0,92	2,93±1,25	t = 3,90	0,000

Entre os pacientes com ELISA e Western Blotting positivos do grupo PET/MAH, quatro mostraram ausência apenas da sequência 5'LTR e os demais possuíam todas as seqüências analisadas. Os três pacientes com ELISA e Western Blotting negativos pertencentes ao mesmo grupo apresentaram todas as seqüências avaliadas (tabela 02).

O HTLV-1 foi identificado em todos os indivíduos do grupo PHA. Em 11 deles houve ausência da sequência 5'*LTR*, em três *env-tax* estava ausente e sete não apresentaram a sequências *tax* (tabela 02).

Nos grupos de doadores de sangue de sorologia negativa e/ou indeterminada não foram identificadas nenhuma das sequências estudadas.

Foi considerado provírus completo aquele que possuía as três sequências analisadas e, provírus defectivo aquele que apresentou deleção em pelo menos uma destas sequências. Nesse grupo, 3 pacientes com a PET/MAH, tiveram a sorologia negativa para HTLV-1 e 2.

Foi detectada uma associação entre a presença da sequência *tax* e a PET/MAH, assim como uma associação entre a presença do provírus completo com esta síndrome neurológica (tabela 2).

Tabela 2. Distribuição das variáveis nos grupos PET/MAH e de portadores do HTLV-1 assintomáticos (PHA).

Variáveis	PET		PHA		χ^2	p
	No	%	No	%		
Gênero						
Feminino	40	63,49	23	36,51	22,67	0,000
Masculino	12	19,67	49	80,33		
Seqüência 5'LTR						
Presente	48	44,04	61	55,96	0,998	0,318
Ausente	4	26,67	11	73,33		
Seqüência env-tax						
Presente	52	42,98	69	57,02		0,264 ^b
Ausente	0	0,00	3	100		
Seqüência tax						
Presente	52	44,44	65	55,56		0,041 ^b
Ausente	0	0,00	7	100		
Tipo do provírus						
Completo	48	47,06	54	52,94	5,068	0,024
Defectivo	4	18,18	18	81,82		

Freq.^a: Frequência. ^b: Teste Exato de Fisher.

DISCUSSÃO

A distribuição por sexo e idade da população estudada reflete o perfil já descrito.

A PET/MAH é uma doença desmielinizante crônica e progressiva que afeta entre 1 a 5% dos indivíduos infectados pelo HTLV na quarta década de vida (Vernant et al. 1987;

Kaplan et al. 1990). Pacientes do sexo feminino tendem a ser mais acometidos, pois a eficácia da transmissão sexual do vírus é maior do homem para a mulher do que o inverso (Kajiyama et al. 1986).

A resposta imune da infecção pelo HTLV-1 em pacientes com PET/MAH apresentam alterações em diversos parâmetros imunológicos. Dentre os mais relevantes estão os elevados níveis de anticorpos nos pacientes com PET/MAH em relação aos indivíduos PHA, indicando que existe uma expressão persistente de proteínas do HTLV-1 e uma resposta imune humoral aumentada nestes pacientes (Saito, 2010). Isto pode ser verificado na população estudada, onde a densidade ótica medida no ELISA foi significativamente mais elevada no grupo PET/MAH.

O provírus defectivo do HTLV-1 tem sido estudado em pacientes com LLTA, com desordens neurológicas como a PET/MAH e também em indivíduos infectados pelo vírus, mas que não desenvolvem doença, considerados portadores assintomáticos (Korbber et al. 1991; Tamiya et al. 1996; Hill et al. 1999; Morozov et al. 2000; Miazaki et al. 2007).

Mostramos a existência do provírus defectivo tanto no grupo PET/MAH quanto no grupo PHA, dados corroborados por Ramires et al. (2003). Nos pacientes com PET/MAH confirmamos a infecção viral através da amplificação de produtos das seqüências *5'LTR*, *tax* e *env-tax*, demonstrando assim a associação do provírus completo com a doença.

Pacientes com PET/MAH soronegativos para HTLV-1/2 podem apresentar amplificação para diversas regiões do vírus. Assim como nosso estudo, Ramires et al. (1998) mostraram a amplificação da seqüência *tax* em 10 pacientes com PET/MAH e sorologia negativa. Posteriormente, estes mesmos autores encontraram 17 pacientes com amplificação apenas para a seqüência *tax* e ausência das seqüências *5'LTR*, *pol*, *px*

e *env*. Por outro lado, De Castro e Costa et al. (1995) relatam que não houve amplificação para os genes *tax*, *rex* e *pol* em 12 pacientes com PET/MAH soronegativos para o vírus.

A soronegatividade nestes casos poderia estar relacionada com uma baixa carga viral (Ramires et al. 2002) ou pela presença de proteínas quiméricas, isto é, proteínas transcritas de genes com deleções internas no genoma do provírus defeutivo (Morozov et al. 2000). Apesar da imunoreatividade destas proteínas ainda é questionado se sua expressão produz respostas imunes anormais no hospedeiro, contribuindo para características autoimunes da PET/MAH (Morozov et al. 2000). Assim, nos casos de pacientes com PET/MAH com sorologia negativa poderia haver a produção de proteínas quiméricas que desencadeariam uma resposta não específica, interferindo na detecção de anticorpos contra o HTLV1/2 nos testes sorológicos e exacerbação da doença.

A sequência *LTR* é essencial na integração do DNA proviral ao DNA cromossômico do hospedeiro como também na regulação transcricional do genoma do HTLV (GREEN; CHEN 2001). A proteína *tax* é mediadora da ativação de fatores celulares que se ligam a *LTR* para que ocorra a transcrição viral (Maeda et al. 2008). Em nossa casuística foi baixo o número de pacientes do grupo PET/MAH que apresentaram ausência da sequência 5' *LTR*. Entretanto, trabalhos relatam ausência desta sequência em casos de LLTA (Miyazaki et al. 2007) com três subtipos do provírus HTLV-1: completo, defeutivo tipo 1 sem as sequências internas (tais como *gag*, *pol*, ou região *env*) e defeutivo tipo 2 sem a 5' *LTR* além de sequências internas.

A associação encontrada entre a presença da sequência *tax* e a PET/MAH corrobora os achados de Ramirez et al. (2003), mas ao oposto do que ocorre na LLTA (Azran et al., 2004), sua função não está definida no desenvolvimento desta síndrome neurológica (Shuh, Beilke, 2005; Saito, 2010).

Sugerimos um maior acompanhamento dos indivíduos do grupo PHA que possuem deleções para as três seqüências avaliadas, principalmente nos casos de ausência de 5' *LTR*, uma vez que existe a possibilidade de desenvolvimento do processo leucemogênico (Tamiya et al. 1996; Miyazaki et al. 2007).

Zucker-Franklin et al. (1998) ao avaliarem doadores saudáveis nos Estados Unidos detectaram 8,6% de positividade para o anticorpo anti-p40 e presença da seqüência *tax*, além de sorologia negativa para anticorpos para outras proteínas virais. Os autores cogitaram tratar-se de um subtipo viral e questionou-se se a presença da seqüência *tax* teria significado clínico. No entanto, não detectamos nenhuma das três seqüências analisadas no grupo de doadores com sorologia negativa para o HTLV-1/2. Um estudo com doadores de sangue saudáveis, residentes em área de baixa prevalência também não encontrou positividade para seqüência TAX do vírus (Dezutti et al. 2003).

No grupo de doadores com resultados indeterminados não foi identificada a presença de nenhuma das seqüências analisadas, embora a população estudada seja residente de área endêmica para o HTLV-1 (Lopes; Proietti 2008). Resultados semelhantes foram relatados por Morozov et al. (2002). Por outro lado, ressaltamos que Costa; Segurado (2009) mostraram a presença da seqüência *tax* em 9,2% e ambas as seqüências *tax* e *pol* em 4,6% de indivíduos com resultados sorológicos indeterminados em São Paulo. A proteína *tax* é importante por ter dentre outras funções, regular a expressão de vários genes que produzem substância envolvidas nos processos inflamatórios (SAITO 2010). Teruya et al. (2008), mostraram evidências do envolvimento da *tax* no desenvolvimento de doenças inflamatórias como a PET/MAH. Dessa forma esclarece-se a importância da presença da seqüência *tax* nesses pacientes.

Concluimos que existe o provirus defectivo em pacientes com PET/MAH e indivíduos do grupo PHA, além ter sido demonstrada a associação entre a presença da sequência *tax* e a PET/MAH.

REFERÊNCIAS

- Azran I, Schavinsky-Khrapunsky Y, Aboud M 2004. Role of Tax protein in human T-cell leukemia virus type-I leukemogenicity. *Retrovirology* 13;1:20.
- Beilke MA, Traina-Dorge V, England JD, Blanchard JL 1996. Polymyositis, arthritis, and uveitis in a macaque experimentally infected with human lymphotropic virus type I. *Arthritis Rheum* 39(4): 610-615.
- Costa JMP, Segurado AC 2009. Molecular evidence of human T-cell lymphotropic virus types 1 and 2 (HTLV-1 and HTLV-2) infections in HTLV seroindeterminate individuals from São Paulo, Brazil. *J Clin Virol* 44(3): 185-189.
- Costa CM, Goubau P, Liu HF, Vandamme AM, da Cunha FM, Santos TJ, Desmyter J, Carton H 1995. HTLV-negative and HTLV type I-positive tropical spastic paraparesis in Northeastern Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 11(2): 315-318.
- Dezzutti CS, Guenther PC, Daniel S, Utz U, Cabrera T, Marshall JH, Bianco C, Lal RB, Cowan EP 2003. Detection of human T-lymphotropic virus (HTLV) *tax* sequences in New York City blood donors seronegative for HTLV types 1 and 2. *Clin Diagn Lab Immunol* 10(4): 715-717.
- 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 Infect Dis* 182: 1343-1349.

Gessain A, Barin F, Vernant JC, Gout O, Maurs L, Calender A, de Thé G 1985. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet* 326(8452): 407-410.

Green PL, Chen I 2001. Human T-cell leukemia virus types 1 and 2. In *Fields Virology Second volume. Fourth Edition*. Philadelphia, Ed. Lippincott Williams & Wilkins, p. 1941-1969.

Heneine W, Khabbaz RF, Lal RB, Kaplan JE 1992. Sensitive and specific polymerase chain reaction assays for diagnosis of human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) and HTLV-II infection in HTLV-I/II seropositive individuals. *J Clin Microbiol* 30(6): 1605-1607.

Hill SA, Shuh M, Derse D 1999. Comparisons of defective HTLV-I proviruses predict the mode of origin and coding potential of internally deleted genomes. *Virology* 263(2): 273-281.

Kajiyama W, Kashiwagi S, Gibs WN, Ikematsu H, Hayashi J, Nomura H, Okochi K 1986. Intrafamilial transmission of adult T- cell leukemia virus. *J Infect Dis* 154: 851-857.

Kaplan JE, Osame M, Kubota H, Igata A, Nishitani H, Maeda Y, Khabbaz RF, Janssen RS 1990. The risk of development of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis among persons infected with HTLV-I. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 3: 1096-1101.

Kira J, Koyanagi Y, Yamada T, Itoyama Y, Tateishi J, Akizuki S, Kishikawa M, Baba E, Nakamura M, Suzuki J, Nakamura T, Nakamura N, Yamamoto N, Goto I 1994. Sequence heterogeneity of HTLV-I proviral DNA in the central nervous system of patients with HTLV-I-associated myelopathy. *Ann Neurol* 36(2): 149-156.

Korber B, Okayama A, Donnelly R, Tachibana N, Essex M 1991. Polymerase chain reaction analysis of defective human T-cell leukemia virus type I proviral genomes in leukemic cells of patients with adult T-cell leukemia. *J Virol* 65(10): 5471-5476.

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

Lopes MSN, Proietti ABFC 2008. HTLV-1/2 transfusional e hemovigilância: a contribuição dos estudos de look-back. *Rev bras hematol hemoter* 30(3): 229-240.

Maeda N, Fan H, Yoshikai Y 2008. Oncogenesis by retroviruses: old and new paradigms. *Rev Med Virol* 18: 387-405.

Mariett X, Agbalika F, Daniel M, Bisson M, LaGrange P, Brouet J, Morinet F 1993. Detection of lymphotropic virus type I infection *tax* gene in salivary gland epithelium from two patients with Sjogren Syndrome. *Arthritis Rheum* 36: 1423-1428.

Miyazaki M, Yasunaga J, Taniguchi Y, Tamiya S, Nakahata T, Matsuoka M 2007. Preferential selection of human T-cell leukemia virus type 1 provirus lacking the 5' long terminal repeat during oncogenesis. *J Virol* 81(11): 5714-5723.

Mochizuki M, Watanabe T, Yamaguchi K, Takatsuki K, Yoshimura K, Shirao M, Nakashima S, Mori S, Araki S, Miyata N 1992. HTLV-I uveitis: a distinct clinical entity caused by HTLV-I. *Jpn J Cancer Res* 83(3): 236-239.

Morozov VA, Lagaye S, Taylor GP, Matutes E, Weiss RA 2000. Chimeric matrix proteins encoded by defective provirus with large internal deletions in human T-cell leukemia virus type 1-infected humans. *J Virol* 74(9): 3933-3940.

Morozov VA, Ellerbrok H, Fleischer C, Brackmann HH, Pauli G 2002. Defective human T-cell leukaemia virus type I (HTLV-I) genomes: no evidence in serologically indeterminate German blood donors but new type detected in established cell lines. *J Med Virol* 66(1): 102-106.

Nishioka K, Sumida T, Hasunuma T 1996. Human T lymphotropic virus type I in arthropathy and autoimmune disorders. *Arthritis Rheum* 39: 1410-1418.

Osame M, Igata A 1989. The history of discovery and clinical-epidemiology of HTLV-I-associated myelopathy (HAM). *Jpn J Med* 28(3): 412-414.

Ramirez EL, Cartier L, Rios M, Fernandez J 1998. Defective human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) provirus in 10 Chilean seronegative patients with tropical spastic paraparesis or HTLV-I associated myelopathy. *J Clin Microbiol* 36(6): 1811-1813.

Ramirez E, Fernandez J, Cartier J, Villota C, Rios M 2003. Defective human lymphotropic virus type I (HTLV-I) provirus in seronegative tropical spastic paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy (TSP/HAM) patients. *Virus Res* 91(2): 231-239.

Saito M 2010. Immunogenetics and the pathological mechanisms of human T-cell leukemia virus type -1 (HTLV-1) associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2010.

Shuh M, Beilke M 2005. 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). *Microsc Res Tech*. 68 (3-4):176-196.

Suzuki J, Kira J, Baba E, Nakamura M, Koyanagi Y, Nakamura T, Kawano Y, Yamasaki K, Shirabe S, Hatano N, Hayashi K, Yamamoto N, Kobayashi T 1995. The association of antibodies against human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) pX

gene mutant products with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Infect Dis* 173: 1115-1122.

Tamiya S, Matsuoka M, Etoh K, Watanabe T, Kamihira S, Yamaguchi K, Takatsuki K 1996. Two types of defective human T-lymphotropic virus type I provirus in adult T-cell leukemia. *Blood* 88(8): 3065-3073.

TERUYA, H. et al. Human T-cell leukemia virus type I infects human lung epithelial cells and induces gene expression of cytokines, chemokines and cell adhesion molecules. *Retrovirology*, London, v. 5, n. 86, p. 1- 10, Sep. 2008.

Vernant JC, Maurs L, Gessain A, Barin F, Gout O, Delaporte JM, Sanhadji K, Buisson G, De-Thé G 1987. Endemic tropical spastic paraparesis associated with human T lymphotropic virus type I: a clinical and seroepidemiological study of 25 cases. *Ann Neurol* 21: 123-130.

Zucker-Franklin D, Pancake BA 1998. Human T-cell lymphotropic virus type 1 Tax among American blood donors. *Clin Diagn Lab Immunol* 5(6): 831-835.

6.2 VERSÃO EM INGLÊS DO ARTIGO I

Identification of defective provirus

Identification of defective provirus in asymptomatic carriers of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients

Ana Cristina de Souza Bezerra¹, Paulo Roberto Eleutério de Souza², Temístocles Ítalo de Santana², Leandro Souza de Melo², Jéfferson Luis de Almeida Silva³, Niedja Maristoni de Oliveira Barreto Queiroz¹, Maria Lúcia Brito⁴, Divaldo Almeida Sampaio¹, Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho^{3,5}.

1. Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (Fundação HEMOPE), Recife, Pernambuco, Brasil.
2. Laboratório Genoma, Centro, Universidade Federal de Pernambuco (URFPE), Recife, Pernambuco, Brasil.
3. Setor de Virologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Recife, Pernambuco, Brasil.
4. Departamento de neurologia do Hospital da Restauração.
5. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brasil.

Corresponding author:

Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

Rua Manuel Lubambo, 118

50850-040 Afogados Recife, PE, Brasil

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

SUMMARY

A number of host genetic and immunological factors, as well as deletions or changes in certain genetic regions of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1), influence on the development of HTLV-1-associated diseases. The aims of this study were to evaluate the presence of defective provirus in HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) patients, as well as in HTLV-1 asymptomatic carriers (HAC), and to investigate the association of defective provirus with HAM/TSP. From March 2008 to October 2009, we studied 52 HAM/TSP patients and 3 groups of blood donors: 72 HAC individuals, 100 seronegative donors and 23 donors with indeterminate serology for HTLV-1. All samples were subjected to PCR to detect the 5' LTR, *env-tax* and *tax* sequences of HTLV-1. The 5' LTR sequence was absent in 4 HAM/TSP patients and 11 individuals of HAC group. Moreover, the *env-tax* sequence could not be detected in 3 of the HAM/TSP patients and the *tax* sequence could not be detected in 7 individuals of HAC group. These results were indicative of defective provirus in HAM/TSP patients and individuals of HAC group and also showed an association between the presence of the *tax* sequence and HAM/TSP.

Key words: Human T-cell lymphotropic virus type 1, defective provirus, HTLV type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis.

INTRODUCTION

Human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) is a human retrovirus that is associated with adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL), a neurological syndrome called HTLV type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) (Gessain et al. 1985; Osama; Igata 1989), and other diseases such as uveitis, arthropathy, polymyositis (Beilke et al. 1996; Mochizuki et al. 1994; Nischioka et al. 1989), Sjögren's syndrome (Mariett et al. 1995), and infective dermatitis (LaGrenade et al. 1990).

A number of host genetic and immunological factors, as well as deletions or changes in certain regions of the HTLV-1 genome, may influence the development of diseases associated with this virus (Miyazaki et al. 2007).

HTLV-1 can present as a defective provirus that exhibits deletions in some regions of its genome. There are reports of 2 types of defective proviruses with genetic variations in the LTR region, but only one of these, type 2, is associated with the more aggressive form of ATLL (Tamiya et al. 1996). Kira et al. (1994) found mutations in the *px* sequence in samples of tissue from the central nervous system (CNS) of HAM/TSP patients and these mutations may contribute to the pathogenesis of the disease. Suzuki et al. (1996) demonstrated the presence of mutations in the *tax* and *rex* genes in blood cells and CNS tissue of HAM/TSP patients.

In Ceara, Brazil, Costa et al. (1995) did not identify deletions of the *pol* region, *tax* and *rex* genes in HAM/TSP patients seronegative for HTLV-1. Such deletions have not been investigated in HAM/TSP patients in Pernambuco, Brazil. Therefore, the aims of this study were to evaluate the presence of defective provirus in HAM/TSP patients,

as well as in HTLV-1 asymptomatic carriers (HAC), and to investigate the association of defective provirus with HAM/TSP.

MATERIALS AND METHODS

Selection of study population and location

Four distinct groups of individuals participated in this study in the period from March 2008 to October 2009:

- HAM/TSP group: patients with clinical diagnoses of HAM/TSP, 49 of whom were seropositive for HTLV-1/2 confirmed by western blotting and 3 of whom were seronegative, from the Neurology Service of Restoration Hospital located in Recife, Pernambuco, Brazil.
- HTLV-1 asymptomatic carriers (HAC) group: 72 blood donors seropositive for HTLV-1/2 confirmed by western blotting.
- Seronegative blood donors group: 100 blood donors seronegative for anti-HTLV-1/2, anti-HIV and anti-HCV antibodies and for HBsAg using ELISA.
- Indeterminate serology blood donors group: 23 blood donors indeterminate or seropositive for HTLV-1/2 with indeterminate results by western blotting.

All blood donors were from the Foundation of Hematology and Hemotherapy of Pernambuco (HEMOPE Foundation) located in Recife, Pernambuco, Brazil.

Serological tests

Serology for antibodies against HTLV-1/2 was performed on blood donors and HAM/TSP patients using a commercial ELISA (ab HTLV-1/HTLV-2 capture system, Ortho) and a confirmatory test using a commercial western blotting (WB HTLV 2.4,

Genelabs Diagnosis). All tests were performed according to the manufacturers' instructions.

Collection of blood samples and extraction of genomic DNA from lymphocytes

For molecular tests, the lymphocytes were separated from whole blood collected in EDTA tubes, using Sepcell (LGC Biotecnologia) according to the manufacturer's instructions. DNA extraction from isolated lymphocytes was performed using the GFX Genomic Blood DNA Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech).

Polymerase chain reaction (PCR) in-house

5' LTR sequence

We used the protocol described by Ramirez et al. (2003) with the following adjustments in the thermocycler (Flexigene 2.0, Techne) program: 94°C for 5 min, followed by 35 cycles at 94°C for 60s, 60°C for 75s and 72°C for 95s, followed by a final extension of 8 min at 72°C. The primer sequences used are given in table I. The product generated was 401 bp.

Env-tax sequence

The PCR reaction was standardized to a final volume of 20 µL containing 2 µL of extracted DNA, 2 mM of each dNTP (dATP, dGTP, dCTP, and dTTP), 1× dilution buffer (200 mM Tris-HCl [pH 8.4] and 500 mM KCl), 1.5 mM MgCl₂, and 2.5 U/µL Taq DNA polymerase. The internal primers SK44 and SK110 were used at 10 pmol. The reaction was processed in a thermocycler (Flexigene 2.0, Techne) for 7 min at 95°C

followed by 35 cycles of 95°C for 1 min, 55°C for 1 min 30 s and 72°C for 2 min, followed by a final extension of 10 min at 72° C.

For the second PCR, we used the same conditions with 2 µL of amplified product from the previous reaction (diluted 1:10 with distilled water, ultrapure; Invitrogen) to a final volume of 20 µL. The internal primers SK248 and SK249 were used at 10 pmol. The reaction was processed in a thermocycler (Flexigene 2.0, Techne) for 5 min at 94°C followed by 30 cycles of 94°C for 1 min, 58°C for 1 min and 72°C for 2 min, followed by a final extension of 10 min at 72°C. The product generated was 466 bp.

Tax sequence

We used the protocol described by Heneine et al. (1992) adapted to a final volume of 25 µL containing 3.5 µL of extracted DNA, 2 mM of each dNTP (dATP, dGTP, dCTP, and dTTP), dilution buffer 1× (200 mM Tris-HCl [pH 8.4] and 500 mM KCl), 1.5 mM MgCl₂, 2.5 U/µL *Taq* DNA polymerase and primers SK43 and SK44 at 10 pmol. The reaction was processed in a thermocycler (Flexigene 2.0, Techne) for 15 min at 95°C, followed by 35 cycles of 94°C for 20s, 58°C for 20s and 72°C for 20s, followed by a final extension for 10 min at 72° C. The product generated was 152 bp.

Table I. Sequences of primers used for PCR amplification of LTR, *env-tax* and *tax* sequences.

<i>Primers</i>	<i>Description</i>	<i>Position</i>	<i>Genes</i>	<i>Fragment length</i>
LTR1	5'-ACCATGAGCCCCAAATATCCC-3'	10-30	5'LTR	399
LTR6	5'-GCGTGGATGGCGGCCTCAAGGTA-3'	409-288	5'LTR	399
SK110	5'-CCCTACAATCCAACCAGCTCAG-3'	4757-4778	<i>pol</i>	----
SK43	5'-CGGATACCCAGTCTACGTGT-3'	7358 – 7377	<i>tax</i>	152
SK44	5'-GAGCCGATAACGCGTCCATCG-3'	7516– 7496	<i>tax</i>	152
SK248	5'-CTAGTCGACGTCCCAGGATATGACC-3'	5669 – 5693	<i>env-tax</i>	468
SK249	5'-CAGACCGCCACCGGTACCGCTCGGC-3'	6137 – 6113	<i>env-tax</i>	468

Visualization of PCR products

Electrophoresis of the PCR products was performed in 1.8% agarose gels and the products were visualized in a Gel-Pro CoolSNAP Imager (MediaCybernetics) under an ultraviolet light source.

Statistical analysis

The Pearson chi-square (χ^2) and Fisher exact tests were calculated using SPSS v.15 to analyze the independent relationships between the presence of HAM/TSP, patient gender and the sequences analyzed. The Student's *t*-test was used to analyze the relationships between mean age and HTLV-1/2 ELISA optical density among HAM/TSP and HAC groups. A $p < 0.05$ was considered statistically significant for all tests performed.

ETHICS

The study was submitted to the Ethics in Research of Restoration Hospital and HEMOPE Foundation under registration numbers 0029.0.102.000-07 and 033/06, respectively. All study participants signed a consent form.

RESULTS

There was a higher frequency of females in HAM/TSP group compared with HAC group ($p=0.000$). The mean age and the HTLV-1/2 ELISA optical density were higher in the HAM/TSP group (table II).

Table II. Distribution of average age and HTLV-1/2 ELISA optical density in HAM/TSP and HTLV-1 asymptomatic carriers (HAC) groups.

Variable	HAM/TSP	HAC	Student's <i>t</i>	<i>p</i>
	Mean (SD)	Mean (SD)		
Age	51.9 (11.39)	39.72 (10.68)	$t = 6.09$	0.000
HTLV-1/2 ELISA				
Optical density	3.69 (0.92)	2.93 (1.25)	$t = 3.90$	0.000

Among patients in the HAM/TSP group with positive ELISA and western blotting results, 4 exhibited only the 5' LTR sequence, while the others presented all sequences tested. The 3 HAM/TSP patients with ELISA and western blotting negative results presented all sequences tested (table III).

HTLV-1/2 sequences were identified in all HAC group. In eleven of these the 5' *LTR* sequence was absent, for three patients there was lack of *env-tax* sequence and other seven did not present the *tax* sequence (table III).

None of the sequences tested was detected in groups of blood donors seronegative and/or indeterminate serology.

Samples positive for all 3 of the sequences analyzed were considered to contain complete provirus, while those showing deletion of at least one of these sequences were considered to contain defective provirus.

An association was detected between the presence of the *tax* sequence and HAM/TSP, as well as an association between the presence of complete proviruses with this neurological syndrome (Table 2).

Table III. Distribution of variables in HAM/TSP and HTLV-1 asymptomatic carriers (HAC) groups.

Variables	HAM/TSP		HAC		χ^2	p
	Freq. ^a	%	Freq.	%		
Gender						
Female	40	63.49	23	36.51	22.67	0.000
Male	12	19.67	49	80.33		
5' LTR sequence						
Present	48	44.04	61	55.96	0.99	0.318
Absent	4	26.67	11	73.33		
<i>env-tax</i> sequence						
Present	52	42.98	69	57.02		0.264 ^b
Absent	0	0.00	3	100		

tax sequence

Present	52	44.4	65	55.56		0.041 ^b
Absent	0	0.00	7	100		

Provirus type

Complete	48	47.06	54	52.94	5.07	0.024
Defective	4	18.18	18			

^aFreq.: Frequency. ^bFisher's exact test.

DISCUSSION

The distribution by sex and age of the study participants reflects the profile already described. HAM/TSP is a chronic progressive and demyelinating disease that affects 1–5% of individuals infected with HTLV in the fourth decade of life (Vernant et al. 1987; Kaplan et al. 1990). Female patients are the most affected because the efficiency of sexual transmission is greater from men to women than the reverse (Kajiyama et al. 1986).

The immune response against HTLV-1 in HAM/TSP patients causes changes in several immunological parameters. The most prominent is the high level of antibodies in HAM/TSP patients relative to HAC individuals, which indicates that these patients persistently express HTLV-1 proteins and therefore mount an increased humoral immune response (Saito, 2010). Consistent with these findings, our study found that the optical density measured by ELISA was significantly higher in HAM/TSP group.

Defective HTLV-1 provirus have been studied in patients with ATLL, in those with neurological disorders such as HAM/TSP and also in individuals who are infected with the virus but do not develop the disease and are considered to be asymptomatic

carriers (Korber et al. 1991; Tamiya et al. 1996; Hill et al. 1999; Morozov et al. 2000; Miyazaki et al. 2007).

In this study, we have shown the existence of defective proviruses in HAM/TSP group as well as in HAC group, corroborating data from Ramirez et al. (2002). We confirmed viral infection by amplifying the *5'LTR*, *tax*, and *env-tax* sequences from HAM/TSP patients, demonstrating the association of complete provirus with this disease.

HAM/TSP patients seronegative for HTLV-1/2 can be PCR positive for different regions of the virus. As in our study, Ramirez et al. (1998) showed amplification of the *tax* sequence in 10 HAM/TSP patients with negative serology. Later, these same authors found amplification only for the *tax* sequence and an absence of *5'LTR*, *pol*, *env*, and *px* sequences in 17 patients with negative serology (Ramirez et al. 2003). Moreover, Costa et al. (1995) reported that there was no amplification of the *tax*, *rex* or *pol* genes in 12 HAM/TSP patients with negative serology for HTLV-1/2.

The negative serology in these cases could be related to a low viral load (Ramirez et al. 2002) or to the presence of chimeric proteins transcribed from genes with internal deletions in the viral genome (Morozov et al. 2000). The altered immunoreactivity of these proteins raises the question of whether their expression produces abnormal host immune responses, thereby contributing to the autoimmune features of HAM/TSP (Morozov et al. 2000). Thus, cases of HAM/TSP with negative HTLV-1/2 serology could be produced by antibody responses to chimeric proteins, both interfering with the detection of antibodies against HTLV-1/2 in serological testing and exacerbating the disease.

The *LTR* sequence is essential for both integration of proviral DNA into host chromosomal DNA and transcriptional regulation of the HTLV genome (Green; Chen

2001). The tax protein mediates the activation of cellular factors that bind the LTR for the occurrence of viral transcription (Maeda et al. 2008). In our study, very few patients of HAM/TSP group lacked the 5' LTR sequence. However, studies in ATLL patients have reported 3 subtypes of HTLV-1 provirus: complete, defective type 1 without internal sequences (such as *gag*, *pol* or *env* regions) and defective type 2 without internal sequences or the 5'LTR (Miyazaki et al. 2007).

The association between the presence of the tax sequence and HAM/TSP is consistent with findings of Ramirez et al. (2003), but the opposite of what occurs in LLTA (Azran et al., 2004), its function is not defined in the development of this neurological syndrome (Shuh, Beilke, 2005; Saito, 2010).

We encourage further monitoring of individuals of HAC group which possessing deletions of the 3 sequences evaluated, especially in cases in which the 5' LTR is absent, because they may possibly develop the leukemogenic process (Tamiya et al.1996; Miyazaki et al. 2007).

Zucker-Franklin and Pancake (1998) assessed healthy blood donors in the United States and found that 8.6% were positive for anti-p40 antibodies and for the presence of the *tax* sequence, despite testing negative for antibodies to other viral proteins. The authors suggested that this might be a viral subtype and questioned whether the presence of the *tax* sequence would have clinical significance. However, we did not detect any of the sequences analyzed in group of blood donors seronegative for HTLV-1/2. A study on healthy blood donors living in a low HTLV prevalence area did not find any positive for the *tax* sequence (Dezutti et al. 2003).

We did not identify any of the sequences analyzed in blood donors with indeterminate serology, although the population surveyed was resident in an HTLV-1-endemic area (Lopes; Proietti 2008). Similar results were reported by Morozov et al.

(2002). However, we note that Costa and Segurado (2009) showed the presence of *tax* sequence in 9.2% and both *tax* and *pol* in 4.6% of individuals with indeterminate serological results in São Paulo state, Brazil.

We conclude that there is defective provirus in HAM/TSP patients and individuals of HAC group and also showed an association between the presence of the *tax* sequence and HAM/TSP. The *tax* protein is important because, among other functions, it regulates the expression of various genes that produce substances involved in inflammatory processes (SAITO, 2010) Teruya et al (2008) showed evidences of the involvement of *tax* in the development of inflammatory diseases such as HAM/TSP. Thus, it is established the importance of the presence of the *tax* sequence in those patients.

REFERENCES

- Azran I, Schavinsky-Khrapunsky Y, Aboud M 2004. Role of Tax protein in human T-cell leukemia virus type-I leukemogenicity. *Retrovirology* 13;1:20.
- Beilke MA, Traina-Dorge V, England JD, Blanchard JL 1996. Polymyositis, arthritis, and uveitis in a macaque experimentally infected with human lymphotropic virus type I. *Arthritis Rheum* 39(4): 610-615.
- Costa JMP, Segurado AC 2009. Molecular evidence of human T-cell lymphotropic virus types 1 and 2 (HTLV-1 and HTLV-2) infections in HTLV seroindeterminate individuals from São Paulo, Brazil. *J Clin Virol* 44(3): 185-189.
- Costa CM, Goubau P, Liu HF, Vandamme AM, da Cunha FM, Santos TJ, Desmyter J, Carton H 1995. HTLV-negative and HTLV type I-positive tropical spastic paraparesis in Northeastern Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 11(2): 315-318.
- Dezzutti CS, Guenther PC, Daniel S, Utz U, Cabrera T, Marshall JH, Bianco C, Lal RB, Cowan EP 2003. Detection of human T-lymphotropic virus (HTLV) *tax* sequences in New York City blood donors seronegative for HTLV types 1 and 2. *Clin Diagn Lab Immunol* 10(4): 715-717.
- 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 Infect Dis* 182: 1343-1349.

Gessain A, Barin F, Vernant JC, Gout O, Maurs L, Calender A, de Thé G 1985. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet* 326(8452): 407-410.

Green PL, Chen I 2001. Human T-cell leukemia virus types 1 and 2. In *Fields Virology Second volume. Fourth Edition*. Philadelphia, Ed. Lippincott Williams & Wilkins, p. 1941-1969.

Heneine W, Khabbaz RF, Lal RB, Kaplan JE 1992. Sensitive and specific polymerase chain reaction assays for diagnosis of human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) and HTLV-II infection in HTLV-I/II seropositive individuals. *J Clin Microbiol* 30(6): 1605-1607.

Hill SA, Shuh M, Derse D 1999. Comparisons of defective HTLV-I proviruses predict the mode of origin and coding potential of internally deleted genomes. *Virology* 263(2): 273-281.

Kajiyama W, Kashiwagi S, Gibs WN, Ikematsu H, Hayashi J, Nomura H, Okochi K 1986. Intrafamilial transmission of adult T- cell leukemia virus. *J Infect Dis* 154: 851-857.

Kaplan JE, Osame M, Kubota H, Igata A, Nishitani H, Maeda Y, Khabbaz RF, Janssen RS 1990. The risk of development of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis among persons infected with HTLV-I. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 3: 1096-1101.

Kira J, Koyanagi Y, Yamada T, Itoyama Y, Tateishi J, Akizuki S, Kishikawa M, Baba E, Nakamura M, Suzuki J, Nakamura T, Nakamura N, Yamamoto N, Goto I 1994. Sequence heterogeneity of HTLV-I proviral DNA in the central nervous system of patients with HTLV-I-associated myelopathy. *Ann Neurol* 36(2): 149-156.

Korber B, Okayama A, Donnelly R, Tachibana N, Essex M 1991. Polymerase chain reaction analysis of defective human T-cell leukemia virus type I proviral genomes in leukemic cells of patients with adult T-cell leukemia. *J Virol* 65(10): 5471-5476.

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

Lopes MSN, Proietti ABFC 2008. HTLV-1/2 transfusional e hemovigilância: a contribuição dos estudos de look-back. *Rev bras hematol hemoter* 30(3): 229-240.

Maeda N, Fan H, Yoshikai Y 2008. Oncogenesis by retroviruses: old and new paradigms. *Rev Med Virol* 18: 387-405.

Mariett X, Agbalika F, Daniel M, Bisson M, LaGrange P, Brouet J, Morinet F 1993. Detection of lymphotropic virus type I infection *tax* gene in salivary gland epithelium from two patients with Sjogren Syndrome. *Arthritis Rheum* 36: 1423-1428.

Miyazaki M, Yasunaga J, Taniguchi Y, Tamiya S, Nakahata T, Matsuoka M 2007. Preferential selection of human T-cell leukemia virus type 1 provirus lacking the 5' long terminal repeat during oncogenesis. *J Virol* 81(11): 5714-5723.

Mochizuki M, Watanabe T, Yamaguchi K, Takatsuki K, Yoshimura K, Shirao M, Nakashima S, Mori S, Araki S, Miyata N 1992. HTLV-I uveitis: a distinct clinical entity caused by HTLV-I. *Jpn J Cancer Res* 83(3): 236-239.

Morozov VA, Lagaye S, Taylor GP, Matutes E, Weiss RA 2000. Chimeric matrix proteins encoded by defective provirus with large internal deletions in human T-cell leukemia virus type 1-infected humans. *J Virol* 74(9): 3933-3940.

Morozov VA, Ellerbrok H, Fleischer C, Brackmann HH, Pauli G 2002. Defective human T-cell leukaemia virus type I (HTLV-I) genomes: no evidence in serologically indeterminate German blood donors but new type detected in established cell lines. *J Med Virol* 66(1): 102-106.

Nishioka K, Sumida T, Hasunuma T 1996. Human T lymphotropic virus type I in arthropathy and autoimmune disorders. *Arthritis Rheum* 39: 1410-1418.

Osame M, Igata A 1989. The history of discovery and clinical-epidemiology of HTLV-I-associated myelopathy (HAM). *Jpn J Med* 28(3): 412-414.

Ramirez EL, Cartier L, Rios M, Fernandez J 1998. Defective human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) provirus in 10 Chilean seronegative patients with tropical spastic paraparesis or HTLV-I associated myelopathy. *J Clin Microbiol* 36(6): 1811-1813.

Ramirez E, Fernandez J, Cartier J, Villota C, Rios M 2003. Defective human lymphotropic virus type I (HTLV-I) provirus in seronegative tropical spastic paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy (TSP/HAM) patients. *Virus Res* 91(2): 231-239.

Saito M 2010. Immunogenetics and the pathological mechanisms of human T-cell leukemia virus type -1 (HTLV-1) associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *Interdiscip Perspect Infect Dis*.

Shuh M, Beilke M 2005. 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). *Microsc Res Tech*. 68 (3-4):176-196.

Suzuki J, Kira J, Baba E, Nakamura M, Koyanagi Y, Nakamura T, Kawano Y, Yamasaki K, Shirabe S, Hatano N, Hayashi K, Yamamoto N, Kobayashi T 1995. The association of antibodies against human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) pX

gene mutant products with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Infect Dis* 173: 1115-1122.

Tamiya S, Matsuoka M, Etoh K, Watanabe T, Kamihira S, Yamaguchi K, Takatsuki K 1996. Two types of defective human T-lymphotropic virus type I provirus in adult T-cell leukemia. *Blood* 88(8): 3065-3073.

TERUYA, H. et al. Human T-cell leukemia virus type I infects human lung epithelial cells and induces gene expression of cytokines, chemokines and cell adhesion molecules. *Retrovirology*, London, v. 5, n. 86, p. 1- 10, Sep. 2008.

Vernant JC, Maurs L, Gessain A, Barin F, Gout O, Delaporte JM, Sanhadji K, Buisson G, De-Thé G 1987. Endemic tropical spastic paraparesis associated with human T lymphotropic virus type I: a clinical and seroepidemiological study of 25 cases. *Ann Neurol* 21: 123-130.

Zucker-Franklin D, Pancake BA 1998. Human T-cell lymphotropic virus type 1 Tax among American blood donors. *Clin Diagn Lab Immunol* 5(6): 831-835.

6.3 VERSÃO EM PORTUGUÊS DO ARTIGO II

Classificação da seqüência tax do vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 1**Classificação da seqüência tax do vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1) em portadores assintomáticos e pacientes com paraparesia espástica tropical / mielopatia associada ao HTLV-1**

Ana Cristina de Souza Bezerra¹, Paulo Roberto Eleutério de Souza², Paula Loureiro¹, Laís Rodrigues², Antônio Victor Campo Coêlho³, Jéfferson Luis de Almeida Silva³, Niedja Maristoni de Oliveira Barreto Queiroz¹, Divaldo Almeida Sampaio¹, Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho^{3,4}

1. Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (Fundação HEMOPE), Recife, Pernambuco, Brasil.

2. Laboratório Genoma, Centro, Universidade Rural Federal de Pernambuco (URFPE), Recife, Pernambuco, Brasil.

3. Setor de Virologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Recife, Pernambuco, Brasil.

4. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brasil.

Autor para correspondência:

Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

Rua Manuel Lubambo, 118

50850-040 Afogados Recife, PE, Brasil

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

RESUMO

Fatores ligados ao hospedeiro como a frequência dos marcadores de histocompatibilidade, a resposta imune, a carga proviral e mutações virais têm sido avaliados entre os mecanismos envolvidos com a paraparesia espástica tropical / mielopatia associada ao HTLV-1 (PET/MAH). Objetivos: Determinar a frequência dos subgrupos da sequência tax e quantificar a carga proviral do HTLV-1 em pacientes com PET/MAH e portadores assintomáticos do vírus, além de verificar a associação destes marcadores com a presença da PET/MAH. Métodos: Foram avaliados 49 pacientes com PET/MAH e 38 doadores de sangue, no período de março de 2008 a outubro de 2009. Resultados: Oitenta e cinco apresentaram vírus classificados como subgrupo tax A, e dois doadores de sangue possuíam o subgrupo tax B, Não observada associação dos subgrupos da tax com a presença de PET/MAH. A mediana de carga proviral foi estatisticamente mais elevada, $96.681 \text{ cópias}/10^6$ células PMBC, nos pacientes com PET/MAH. Conclusões: Não foi identificada em nossa casuística uma associação entre subgrupos da sequência tax e a presença de PET/MAH, entrtanto foi demonstrado haver uma maior carga proviral em pacientes com PET/MAH.

Palavras-chaves: Vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 1, Paraparesia espástica tropical / mielopatia associada ao HTLV-1, Sequência tax, Carga proviral.

INTRODUÇÃO

A paraparesia espástica tropical / mielopatia (PET/MAH) é uma doença desmielinizante crônica e progressiva associada ao HTLV-1 [1] que afeta 1 a 5 % dos infectados pelo vírus na quarta década de vida [2]. Fatores ligados ao hospedeiro como a frequência dos marcadores de histocompatibilidade, a resposta imune e carga proviral têm sido avaliados entre os mecanismos envolvidos com a PET/MAH [3-5].

A carga proviral tem sido estudada tanto em pacientes com PET/MAH como em portadores de artrite reumatóide, dermatite infecciosa e uveíte por HTLV-1, tendo sido demonstrada uma carga viral elevada nesses pacientes em relação aos portadores assintomáticos do vírus. Esses dados mostram o aumento do provírus em linfócitos e sua importância na patogênese dessas doenças [6-8]. Takenouchi et al. (2003) [9] demonstraram associação entre carga proviral elevada e piora clínica em pacientes com PET/MAH, embora os autores sugiram que este marcador não é suficiente para avaliação prognóstica da doença.

Variações genômicas encontradas no provírus inserido no DNA dos infectados foram avaliadas em pacientes com PET/MAH. Mutações da sequência tax foram associadas com a doença [10,11] e foi demonstrado que provírus defectivos podem levar a produção de proteínas quiméricas, favorecendo a uma resposta imune alterada em sua patogênese [12].

Dois subgrupos A e B da sequência tax foram descritos baseados em quatro mutações em regiões específicas desta sequência. Adicionalmente, foi identificada uma associação entre a presença do subgrupo A com o desenvolvimento de PET/MAH em comparação aos portadores assintomáticos do vírus. A classificação da sequência tax é importante porque no subgrupo A, a substituição de nucleotídeo na posição 7959

promove uma mudança no códon do aminoácido alanina para valina e a substituição na posição 8208 causa alteração da serina para asparagina, as quais podem influenciar a função da proteína tax [13].

Por outro lado, no Brasil, Casseb et al. (2006) [14] não encontraram a associação dos subgrupos da seqüência tax com a progressão da doença em pacientes no estado de São Paulo. Assim, considerando que Pernambuco apresenta alta endemicidade para o HTLV-1 e a importância de se investigar fatores que influenciam a PET/MAH nos diversos grupos populacionais, os objetivos desse estudo foram avaliar a freqüência dos subgrupos da seqüência tax, quantificar a carga proviral em pacientes com PET/MAH e portadores do HTLV-1 assintomáticos (PHA), além de verificar a associação destes marcadores com a PET/MAH.

MATERIAIS E MÉTODOS

Participaram do estudo, no período de março de 2008 a outubro de 2009, dois grupos de indivíduos:

- Grupo PET/MAH: 49 pacientes com diagnóstico clínico de PET/MAH atendidos no Serviço de Neurologia do Hospital da Restauração, Recife, Pernambuco, Brasil.
- Grupo de portadores do HTLV-1 assintomáticos (PHA): 38 doadores de sangue com sorologia positiva para HTLV-1/2 por ELISA e confirmada por Western Blotting originados da Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (Fundação HEMOPE), Recife, Pernambuco, Brasil.

O estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa do Hospital da Restauração e Fundação HEMOPE sob os registros nº 0029.0.102.000-07 e 033/06 respectivamente. Todos os participantes do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

A pesquisa do anticorpo contra o HTLV-1/2 foi realizada em doadores e pacientes com PET/MAH por ELISA comercial (HTLV-1/HTLV-2 ab capture system, ORTHO) e confirmada por Western Blotting comercial (WB HTLV 2.4, Genelabs Diagnosis). Todos os testes foram realizados de acordo com as instruções dos fabricantes.

Para a quantificação da carga proviral, linfócitos foram separados do sangue total coletado em tubo com EDTA utilizando o *Sepcell* (LGC Biotecnologia) conforme instruções do fabricante e feita uma diluição para 1×10^6 células/ml. A extração de DNA dos linfócitos isolados foi executada com o GFX Genomic Blood DNA Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech).

A classificação da seqüência tax foi realizada por PCR-*restriction fragment length polymorphism* (PCR-RFLP) de acordo com o protocolo de Furukawa et al. (2000) [13] e a quantificação da carga proviral de acordo com Arruda et al. (2008) [15], utilizando o kit SYBR Green Master Mix (LGC Biotecnologia).

Foi calculado, no programa SPSS v.15, o teste Exato de Fisher para analisar a relação de independência entre a PET/MAH e os subgrupos da tax e o teste Mann-Whitney para comparação das medianas da carga proviral nos grupos estudados, sendo considerado como resultado estatisticamente significativo um $p < 0,05$.

RESULTADOS

No grupo PET/MAH houve maior frequência do sexo feminino com 75.5% (37/49) e no grupo PHA prevaleceu o sexo masculino em 57,9% (22/38). A idade média do grupo PET/MAH ($52,08 \pm 11,05$ anos) foi maior ($p=0,000$) quando comparada ao grupo PHA ($38,47 \pm 8,69$ anos).

A frequência do subgrupo tax A no grupo PET/MAH foi de 100% e de 94,7% no grupo PHA. O subgrupo tax B não foi encontrado no grupo PET/MAH e em apenas 5,26% (2/38) do grupo PHA. Não foi encontrada a associação dos subgrupos da sequência tax com a presença de PET/MAH ($p=0,108$).

A quantificação da carga proviral foi realizada em 21 pacientes do grupo PET/MAH e 15 doadores de sangue do grupo PHA, em razão da contagem de linfócitos inferior a 1×10^6 células PMBC/ml nas demais amostras analisadas. A mediana de carga proviral foi estatisticamente mais elevada no grupo PET/MAH (tabela 1).

Tabela 1. Mediana da carga proviral entre os grupos PET/MAH e PHA.

Grupo de pacientes	Carga proviral (cópias/ 10^6 células PMBC)	p-valor
	Mediana ($P_{25} - P_{75}$)	
PET/MAH	96.681 (5.000 – 805.494)	0,001
PHA	13.833 (200 – 68.745)	

DISCUSSÃO

A prevalência do sexo feminino em pacientes com PET/MAH é uma característica epidemiológica do HTLV-1, pois dependendo do grupo étnico estudado, o risco de desenvolver a PET/MAH é duas a três vezes maior em mulheres [16]. A explicação está no fato da transmissão do vírus ocorrer com mais facilidade do homem para a mulher do que o inverso [17].

Permanecem ainda não esclarecidos alguns questionamentos sobre o desenvolvimento das doenças crônicas inflamatórias, como a PET/MAH, em pacientes infectados pelo HTLV-1. Parâmetros como os antígenos maior de histocompatibilidade (MHC), carga proviral, resposta imune mediada por células, anticorpos e genotipagem do vírus, são estudados na tentativa de responder a vários questionamentos sobre o desenvolvimento da PET/MAH [16].

Furukawa et al.(2000) [13] mostraram que o subgrupo tax A está associado com o risco de desenvolver PET/MAH, sendo este evento independente da frequência do HLA-A*02. Os autores mostraram que esse marcador oferece proteção contra uma das sequências variantes do HTLV-1, no subgrupo B o que não foi encontrado no subgrupo A. Ainda de acordo com Jeffery et al. (2000) [4], tanto HLA-A*02 como o HLA-Cw*08 conferem proteção contra a doença, como também estão associados à baixa carga proviral nestes pacientes. Tais observações demonstram a importância da avaliação de diversos fatores que podem influenciar o desenvolvimento da PET/MAH.

Em nossa casuística, não houve associação dos subgrupos da sequência tax com a doença, corroborando os achados de Casseb et al.(2006) [14] que também avaliaram pacientes com PET/MAH e indivíduos assintomáticos em São Paulo, Brasil. Demonstrou-se que no Brasil há uma predominância de isolados do subgrupo Cosmopolita (HTLV-1a), subgrupo A (transcontinental) do HTLV-1 [18,19,20].

Segundo Furukawa et al. (2000) [13] o subgrupo tax A está associado ao subgrupo Cosmopolita do vírus na população japonesa e, que além dos fatores ambientais e costumes de uma determinada população, é provável que o risco de desenvolvimento da PET/MAH esteja também relacionado com as diferenças dos subgrupos do vírus.

Ressaltamos que mesmo sem a identificação dos subgrupos virais, acreditamos que a predominância do subgrupo tax A em nossa população esteja relacionada com a alta frequência subgrupo Cosmopolita (HTLV-1a) do subgrupo A (transcontinental) no Brasil.

A mediana de carga proviral estatisticamente mais elevada em pacientes com PET/MAH em comparação ao grupo PHA corrobora achados de outros autores [21,22,23]. No entanto, alguns em pacientes com PET/MAH de nossa população apresentaram carga proviral menor do que em indivíduos do grupo PHA e o inverso também foi observado. Por isso, ela não constitui isoladamente fator prognóstico da doença, uma vez que podem ocorrer flutuações dos valores de carga proviral nos indivíduos afetados ou não pela PET/MAH [24].

Em conclusão, não foi identificada em nossa casuística associação entre subgrupos da sequência tax e a presença de PET/MAH, de demonstramos uma maior carga proviral em pacientes com PET/MAH.

REFERÊNCIAS

1. Souza LA, Lopes IG, Maia EL, Azevedo VN, Machado LF, Ishak MO, Ishak R, Vallinoto AC. Molecular characterization of HTLV-1 among patients with tropical spastic paraparesis/HTLV-1 associated myelopathy in Belém, Pará. Rev Soc Bras Med Trop 2006, 39(5):504-506.

2. Kaplan JE, Osame M, Kubota H, Igata A, Nishitani H, Maeda Y, Khabbaz RF, Janssen RS. The risk of development of HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis among persons infected with HTLV-I. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 1990; 3(11):1096-1101.

3. Jeffery KJ, Usuku K, Hall SE, Matsumoto W, Taylor GP, Procter J, Bunce M, Ogg GS, Welsh KI, Weber JN, Lloyd AL, Nowak MA, Nagai M, Kodama D, Izumo S, Osame M, Bangham CR. HLA alleles determine human T-lymphotropic virus-I (HTLV-I) proviral load and the risk of HTLV-I-associated myelopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(7):3848-3853.

4. Jeffery KJ, Siddiqui AA, Bunce M, Lloyd AL, Vine AM, Witkover AD, Izumo S, Usuku K, Welsh KI, Osame M, Bangham CR. The Influence of HLA Class I Alleles and Heterozygosity on the Outcome of Human T Cell Lymphotropic Virus Type I Infection. *J Immunol* 2000; 165: 7278–7284.

5. Silva MT, Harab RC, Leite AC, Schor D, Araújo A, Andrada-Serpa MJ. 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*. 2007;44(5):689-692.

6. Ono A, Ikeda E, Mochizuki M, Matsuoka M, Yamaguchi K, Sawada T, Yamane S, Tokudome S, Watanabe T. Provirus Load in Patients with Human T-Cell Leukemia

Virus Type 1 Uveitis Correlates with Precedent Graves Disease and Disease Activities. *Jpn J Cancer Res.* 1998;89(6):608-614.

7. Yakova M, Lézin A, Dantin F, Lagathu G, Olindo S, Jean-Baptiste G, Arfi S, Césaire R. Increased proviral load in HTLV-1-infected patients with rheumatoid arthritis or connective tissue disease. *Retrovirology.* 2005; 2:4.

8. Primo J, Siqueira I, Nascimento MCF, Oliveira MF, Farre L, Carvalho EM, Bittencourt AL. High HTLV-1 proviral load, a marker for HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis, is also detected in patients with infective dermatitis associated with HTLV-1. *Brazilian Braz J Med Biol Res* 2009; 42(8): 761-764.

9. Takenouchi N, Yamano Y, Usuku K, Osame M, Izumo S. Usefulness of proviral load measurement for monitoring of disease activity in individual patients with human T-lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Neurovirol*, 2003; 9(1):29-35.

10. Suzuki J, Kira J, Baba E, Nakamura M, Koyanagi Y, Nakamura T, Kawano Y, Yamasaki K, Shirabe S, Hatano N, Hayashi K, Yamamoto N, Kobayashi T. The association of antibodies against human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) pX gene mutant products with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis.. *J Infect Dis* 1996; 173(5):1115-1122.

11. Kira J, Koyanagi Y, Yamada T, Itoyama Y, Tateishi J, Akizuki S, Kishikawa M, Baba E, Nakamura M, Suzuki J, Nakamura T, Nakamura N, Yamamoto N, Goto I.

Sequence heterogeneity of HTLV-I proviral DNA in the central nervous system of patients with HTLV-I-associated myelopathy. *Ann Neurol.* 1994; 36(2):149-156.

12. Morozov VA, Lagaye S, Taylor GP, Matutes E, Weiss RA. Chimeric matrix proteins encoded by defective provirus with large internal deletions in human T-cell leukemia virus type 1-infected humans. *J Virol* 2000; 74(9): 3933-3940.

13. Furukawa Y, Yamashita M, Usuku K, Izumo S, Nakagawa M, Osame M. 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 Infect Dis.* 2000; 182(5):1343-1349.

14. Casseb J, Fukumori LMI, Vergara MPP. 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. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101(3): 273-276.

15. Arruda BC, Lira RA, Loureiro P, Brandão L, Souza P, Souza WV, Gomes YM. 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. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2008; 30(5): 384-389.

16. Saito M. Immunogenetics and the Pathological Mechanisms of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1- (HTLV-1) Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP). *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2010; 2010.

17. Kajiyama W, Kashiwagi S, Ikematsu H, Hayashi J, Nomura H, Okochi K. Interfamilial transmission of adult T-cell leukemia virus. *J Infect Dis* 1986; 154(5):851-857.

18. Segurado AA, Biasutti C, Zeigler R, Rodrigues C, Damas CD, Jorge ML, Marchiori PE. 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-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis from São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002; 97(3):329-333.

19. Kashima S, Alcantara LC, Takayanagui OM, Cunha MA, Castro BG, Pombo-de-Oliveira MS, Zago MA, Covas DT. Distribution of Human T Cell Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1) Subtypes in Brazil: Genetic Characterization of LTR and Tax Region. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2006 Oct;22(10):953-959.

20. Mota-Miranda AC, Araújo SP, Dias JP, Colin DD, Kashima S, Covas DT, Tavares-Neto J, Galvão-Castro B, Alcantara LC. HTLV-1 infection in blood donors from the Western Brazilian Amazon region: seroprevalence and molecular study of viral isolates. *J Med Virol*. 2008 Nov;80(11):1966-1971.

21. Wattel E, Mariotti M, Agis F, Gordien E, Le Coeur FF, Prin L, Rouger P, Chen IS, Wain-Hobson S, Lefrere JJ. Quantification of HTLV-I proviral copy number in peripheral blood of symptomless carriers from the French West Indies. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1992 ; 5(9):943–946.

22. Montanheiro PA, Oliveira AC, Posada-Vergara MP, Milagres AC, Tauil C, Marchiori PE, Duarte AJ, Casseb J. Human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) proviral DNA load among asymptomatic patients and patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Braz J Med Biol Res.* 2005 Nov;38(11):1643-1647.
23. Sabouri AH, Saito M, Usuku K, Bajestan SN, Mahmoudi M, Forughipour M, Sabouri Z, Abbaspour Z, Goharjoo ME, Khayami E, Hasani A, Izumo S, Arimura K, Farid R, Osame M. Differences in viral and host genetic risk factors for development of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis between Iranian and Japanese HTLV-1-infected individuals. *J Gen Virol* 2005; 86:773 -781.
24. Matsuzaki T, Nakagawa M, Nagai M, Usuku K, Higuchi I, Arimura K, Kubota H, Izumo S, Akiba S, Osame M. HTLV-1 proviral load correlates with progression of motor disability in HAM/TSP: Analysis of 239 HAM/TSP patients including 64 patients followed up for 10 years. *J Neurovirol* 2001; 7(3): 228-234.

6.4 VERSÃO EM INGLÊS DO ARTIGO II

Classification of the *tax* sequence of the human T-cell lymphotropic virus type 1**Classification of the *tax* sequence of the human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) in asymptomatic carriers and HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients**

Ana Cristina de Souza Bezerra¹, Paulo Roberto Eleutério de Souza², Paula Loureiro¹, Laís Rodrigues², Antônio Victor Campo Coêlho³, Jéfferson Luis de Almeida Silva³, Niedja Maristoni de Oliveira Barreto Queiroz¹, Divaldo Almeida Sampaio¹, Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho^{3,4}

1. Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (Fundação HEMOPE), Recife, Pernambuco, Brasil.

2. Laboratório Genoma, Centro, Universidade Rural Federal de Pernambuco (URFPE), Recife, Pernambuco, Brasil.

3. Setor de Virologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Recife, Pernambuco, Brasil.

4. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brasil.

Corresponding author:

Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

Rua Manuel Lubambo, 118

50850-040 Afogados Recife, PE, Brasil

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

ABSTRACT

Host factors as the frequency of histocompatibility markers, the immune response, the proviral load and viral mutations have been rated among the mechanisms involved with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). Objectives: To determine the frequency of the subgroups of *tax* sequence, to quantify the proviral load in asymptomatic carriers and HAM/TSP patients and to verify the association between these markers and HAM/TSP. Methods: We evaluated 49 HAM/TSP patients and 38 blood donors from March 2008 to October 2009. Results: All participants had viruses classified as subgroup *tax* A, except two blood donors that presented the subgroup *tax* B, although no association was founded among subgroups of *tax* sequence and the presence of HAM/TSP. The median of proviral load was statistically higher in HAM/TSP patients. Conclusions: Our study did not identify an association between subgroups of *tax* sequence and the presence of HAM/TSP and demonstrated to have a higher proviral load in HAM/TSP patients.

Keywords: Human T-cell lymphotropic virus type 1, HTLV type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis, *tax* sequence, proviral load.

INTRODUCTION

HTLV type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) is a demyelinating chronic and progressive disease associated with HTLV-1 [1] that affecting 1-5% of those infected in the fourth decade of life [2]. Host factors as the frequency of histocompatibility markers, the immune response and proviral load have been evaluated between the mechanisms involved with HAM/TSP [3-5].

The proviral load has been studied in HAM/TSP patients as much as rheumatoid arthritis carriers, uveitis and infective dermatitis caused by HTLV-1, was demonstrated a high viral load in these patients compared to asymptomatic carriers of the virus. These data show an increase in the provirus in lymphocytes and its importance in pathogenesis of these diseases [6-7]. Takenouchi et al. (2003) [9] demonstrated an association between high proviral load and clinical worsening in HAM/TSP patients, although the authors suggest that marker is not sufficient to assess the prognosis of the disease.

Genomic variations found in the provirus inserted in the DNA of infected were evaluated in HAM/TSP patients. Mutations in tax sequence were associated with disease [10,11] and has been shown that defective proviruses may lead to production of chimeric proteins, favoring an altered immune response in its pathogenesis [12].

Two subgroups A and B of tax sequence were described based on four mutations in specific regions of this sequence. Additionally, was identified an association between the presence of subgroup A with the development of HAM/TSP compared with asymptomatic carriers of the virus. The classification of tax sequence is important because in subgroup A, the nucleotide substitution at position 7959 promotes a change in codon of amino acid alanine to valine and substitution at position 8208 causes a change from serine to asparagine, which may influence the function of protein tax [13].

In the other hand, in Brazil Casseb et al. (2006) [14] found no association of the subgroups of tax sequence with progression of disease in patients in São Paulo. Thus, considering that Pernambuco has high endemicity for HTLV-1 and the importance of investigating factors that influence the HAM/TSP in various populations, the objectives of this study was to evaluate the frequency of the subgroups of tax sequence, to quantify the proviral load in HAM/TSP patients and HTLV-1 asymptomatic carriers (HAC) and investigate the association of these markers with HAM/TSP.

MATERIALS AND METHODS

Participated in the study from March 2008 to October 2009, two groups of subjects:

- HAM/TSP group: 49 patients with clinical diagnosis of HAM/ TSP attended the Neurological Outpatient Clinic at the Restorations Hospital, Recife, Pernambuco, Brazil.
- HTLV-1 asymptomatic carrier (HAC) group: 38 blood donors were seropositive for HTLV-1/2 by ELISA and confirmed by Western Blot originated Foundation of Hematology of Pernambuco (HEMOPE Foundation), Recife, Pernambuco , Brazil.

The study was submitted to the Ethics in Research of Restoration Hospital and HEMOPE Foundation under registration numbers 0029.0.102.000-07 and 033/06, respectively. All study participants signed a consent form.

Serology for antibodies against HTLV-1/2 was performed on blood donors and HAM/TSP patients using a commercial ELISA (ab HTLV-1/HTLV-2 capture system,

Ortho) and confirmed using a commercial western blotting (WB HTLV 2.4, Genelabs Diagnosis). All tests were performed according to the manufacturers' instructions.

For proviral load, lymphocytes were separated from whole blood collected in EDTA tube using Sepcell (LGC Biotecnologia) as instructed by the manufacturer. The extraction of DNA of isolated lymphocytes was performed with GFX Genomic Blood DNA Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech).

The classification of tax sequence was performed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) according to the protocol of Furukawa et al. (2000) [13] and quantification of proviral load according to Arruda et al. (2008) [16], using SYBR Green Master Mix kit (LGC Biotecnologia).

Was calculated using the SPSS v.15, the Fisher exact test to analyze the relationship of dependence between the HAM/TSP and subgroups of tax sequence and the Mann-Whitney test for comparison of median proviral load in all groups, being considered as result statistically significant at $p < 0.05$.

RESULTS

In HAM/TSP group was more frequency of females 75.5% (37/49) and group HAC prevailed males in 57.9% (22/38). The average age in HAM/TSP group (52.08 ± 11.05 years) was higher ($p = 0.000$), when compared to HAC group (38.47 ± 8.69 years).

The frequency of the subgroup tax A in HAM/TSP group was 100% and 94.7% in HAC group. The subgroup tax B was not found in HAM/TSP group and in only 5.26% (2 / 38) of the HAC group. No association was found in subgroups of the tax sequence in the presence of HAM/TSP ($p = 0.108$).

Quantification of proviral load was performed in 21 patients in HAM/TSP group and 15 blood donors from the HAC group, because of the lymphocyte count less than 1×10^6 cells / ml in the other samples analysed. The median proviral load was statistically higher in the HAM/TSP group (Table 1).

Table 1. Median proviral load between HAM / TSP and HAC groups.

Patients	Proviral load	p-value
	(c�pies/ 10^6 cells PMBC)	
	Median (P₂₅ – P₇₅)	
HAM/TSP	96.681 (5.000 – 805.494)	0,001
HAC	13.833 (200 – 68.745)	

DISCUSSION

The prevalence of females HAM/TSP patients is an epidemiological characteristic of HTLV-1, because depending on the ethnic group studied, the risk of developing HAM/TSP is two to three-fold in women [16]. The explanation is because the transmission of the virus occurs more easily from men to women than the reverse [17].

Remain to be clarified some questions about the development of chronic inflammatory conditions such as HAM/TSP in patients infected with HTLV-1. Parameters such as major histocompatibility antigens (HLA), proviral load, cell-mediated immune response, antibodies and genotyping of viruses, are studied in an attempt to answer some questions about the development of HAM/TSP [16].

Furukawa et al. (2000) [13] showed that subgroup tax A is associated with the risk of developing HAM/TSP, this event is independent of the frequency of HLA-A*02. The authors showed that marker provides protection against a variant of the sequences

of HTLV-1, in subgroup B which was not found in subgroup A. Also according to Jeffery et al. (2000) [4], both HLA-A*02 and HLA-Cw*08 confer protection against disease, but also are associated with low proviral load in these patients. These observations demonstrate the importance of assessing various factors that may influence the development of HAM/TSP.

We not found association of subgroups of tax sequence with the disease in our study, corroborating the findings of Casseb et al. (2006) [14] who also evaluated HAM/TSP patients and asymptomatic individuals in São Paulo, Brazil. It was shown that in Brazil there is a predominance of isolates from subgroup Cosmopolitan (HTLV-1a), subgroup A (transcontinental) of HTLV-1 [18,19,20]. According to Furukawa et al. (2000) [13] the subgroup tax A is associated with Cosmopolitan subgroup of the virus in the Japanese population and that besides environmental factors and customs of a given population, it is likely that the risk of developing HAM TSP is also related to differences between the subgroups virus.

We emphasize that even without the identification of viral subgroups, we believe that the predominance of subgroup A tax in our population is related to the high frequency subgroup Cosmopolitan (HTLV-1a) subgroup A (transcontinental) in Brazil.

The median proviral load was statistically higher in HAM/TSP patients compared to the HAC group corroborates findings of other studies [21,22,23]. However, some HAM/TSP patients in our population had lower proviral load than HAC group and the reverse was also observed. So it is not a prognostic factor isolated of disease, since can occur fluctuations in proviral load in individuals affected or not by HAM/TSP [24].

In conclusion, our study did not identify an association between subgroups of tax sequence and the presence of HAM/TSP and demonstrated to have a higher proviral load in HAM/TSP patients.

REFERENCES

1. Souza LA, Lopes IG, Maia EL, Azevedo VN, Machado LF, Ishak MO, Ishak R, Vallinoto AC. Molecular characterization of HTLV-1 among patients with tropical spastic paraparesis/HTLV-1 associated myelopathy in Belém, Pará. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006, 39(5):504-506.
2. Kaplan JE, Osame M, Kubota H, Igata A, Nishitani H, Maeda Y, Khabbaz RF, Janssen RS. The risk of development of HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis among persons infected with HTLV-I. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 1990; 3(11):1096-1101.
3. Jeffery KJ, Usuku K, Hall SE, Matsumoto W, Taylor GP, Procter J, Bunce M, Ogg GS, Welsh KI, Weber JN, Lloyd AL, Nowak MA, Nagai M, Kodama D, Izumo S, Osame M, Bangham CR. HLA alleles determine human T-lymphotropic virus-I (HTLV-I) proviral load and the risk of HTLV-I-associated myelopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(7):3848-3853.
4. Jeffery KJ, Siddiqui AA, Bunce M, Lloyd AL, Vine AM, Witkover AD, Izumo S, Usuku K, Welsh KI, Osame M, Bangham CR. The Influence of HLA Class I Alleles and Heterozygosity on the Outcome of Human T Cell Lymphotropic Virus Type I Infection. *J Immunol* 2000; 165: 7278–7284.
5. Silva MT, Harab RC, Leite AC, Schor D, Araújo A, Andrada-Serpa MJ. 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*. 2007;44(5):689-692.

6. Ono A, Ikeda E, Mochizuki M, Matsuoka M, Yamaguchi K, Sawada T, Yamane S, Tokudome S, Watanabe T. Provirus Load in Patients with Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Uveitis Correlates with Precedent Graves Disease and Disease Activities. *Jpn J Cancer Res*. 1998;89(6):608-614.

7. Yakova M, Lézin A, Dantin F, Lagathu G, Olindo S, Jean-Baptiste G, Arfi S, Césaire R. Increased proviral load in HTLV-1-infected patients with rheumatoid arthritis or connective tissue disease. *Retrovirology*. 2005; 2:4.

8. Primo J, Siqueira I, Nascimento MCF, Oliveira MF, Farre L, Carvalho EM, Bittencourt AL. High HTLV-1 proviral load, a marker for HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis, is also detected in patients with infective dermatitis associated with HTLV-1. *Brazilian Braz J Med Biol Res* 2009; 42(8): 761-764.

9. Takenouchi N, Yamano Y, Usuku K, Osame M, Izumo S. Usefulness of proviral load measurement for monitoring of disease activity in individual patients with human T-lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Neurovirol*, 2003; 9(1):29-35.

10. Suzuki J, Kira J, Baba E, Nakamura M, Koyanagi Y, Nakamura T, Kawano Y, Yamasaki K, Shirabe S, Hatano N, Hayashi K, Yamamoto N, Kobayashi T. The association of antibodies against human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) pX gene mutant products with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis.. J Infect Dis 1996; 173(5):1115-1122.

11. Kira J, Koyanagi Y, Yamada T, Itoyama Y, Tateishi J, Akizuki S, Kishikawa M, Baba E, Nakamura M, Suzuki J, Nakamura T, Nakamura N, Yamamoto N, Goto I. Sequence heterogeneity of HTLV-I proviral DNA in the central nervous system of patients with HTLV-I-associated myelopathy. Ann Neurol. 1994; 36(2):149-156.

12. Morozov VA, Lagaye S, Taylor GP, Matutes E, Weiss RA. Chimeric matrix proteins encoded by defective provirus with large internal deletions in human T-cell leukemia virus type 1-infected humans. J Virol 2000; 74(9): 3933-3940.

13. Furukawa Y, Yamashita M, Usuku K, Izumo S, Nakagawa M, Osame M. 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 Infect Dis. 2000; 182(5):1343-1349.

14. Casseb J, Fukumori LMI, Vergara MPP. 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. Mem Inst Oswaldo Cruz 2006; 101(3): 273-276.

15. Arruda BC, Lira RA, Loureiro P, Brandão L, Souza P, Souza WV, Gomes YM. 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. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2008; 30(5): 384-389.

16. Saito M. Immunogenetics and the Pathological Mechanisms of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1- (HTLV-1) Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP). *Interdiscip Perspect Infect Dis*. 2010; 2010.

17. Kajiyama W, Kashiwagi S, Ikematsu H, Hayashi J, Nomura H, Okochi K. Interfamilial transmission of adult T-cell leukemia virus. *J Infect Dis* 1986; 154(5):851-857.

18. Segurado AA, Biasutti C, Zeigler R, Rodrigues C, Damas CD, Jorge ML, Marchiori PE. 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-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis from São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002; 97(3):329-333.

19. Kashima S, Alcantara LC, Takayanagui OM, Cunha MA, Castro BG, Pombo-de-Oliveira MS, Zago MA, Covas DT. Distribution of Human T Cell Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1) Subtypes in Brazil: Genetic Characterization of LTR and Tax Region. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2006 Oct;22(10):953-959.

20. Mota-Miranda AC, Araújo SP, Dias JP, Colin DD, Kashima S, Covas DT, Tavares-Neto J, Galvão-Castro B, Alcantara LC. HTLV-1 infection in blood donors from the Western Brazilian Amazon region: seroprevalence and molecular study of viral isolates. *J Med Virol*. 2008 Nov;80(11):1966-1971.

21. Wattel E, Mariotti M, Agis F, Gordien E, Le Coeur FF, Prin L, Rouger P, Chen IS, Wain-Hobson S, Lefrere JJ. Quantification of HTLV-I proviral copy number in peripheral blood of symptomless carriers from the French West Indies. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1992 ; 5(9):943–946.

22. Montanheiro PA, Oliveira AC, Posada-Vergara MP, Milagres AC, Tauil C, Marchiori PE, Duarte AJ, Casseb J. Human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) proviral DNA load among asymptomatic patients and patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Braz J Med Biol Res*. 2005 Nov;38(11):1643-1647.

23. Sabouri AH, Saito M, Usuku K, Bajestan SN, Mahmoudi M, Forughipour M, Sabouri Z, Abbaspour Z, Goharjoo ME, Khayami E, Hasani A, Izumo S, Arimura K, Farid R, Osame M. Differences in viral and host genetic risk factors for development of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis between Iranian and Japanese HTLV-1-infected individuals . *J Gen Virol* 2005; 86:773 -781.

24. Matsuzaki T, Nakagawa M, Nagai M, Usuku K, Higuchi I, Arimura K, Kubota H, Izumo S, Akiba S, Osame M. HTLV-1 proviral load correlates with progression of

motor disability in HAM/TSP: Analysis of 239 HAM/TSP patients including 64 patients followed up for 10 years. J Neurovirol 2001; 7(3): 228-234.

7.0 CONCLUSÕES

- Identificou-se a presença de provírus defectivo do HTLV-1 em portadores assintomáticos do vírus e pacientes com PET/MAH.
- Houve associação entre o provírus completo e a PET/MAH.
- Houve associação entre a presença da seqüência *tax* e a PET/MAH
- O subgrupo A da seqüência *tax* foi detectado em todos pacientes com PET/MAH e predomínio nos portadores assintomáticos.
- Não houve associação dos subgrupos da seqüência *tax* com a presença da PET/MAH.
- A mediana de carga proviral foi mais elevada nos pacientes com PET/MAH quando comparada aos portadores assintomáticos do vírus

8.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sugerimos o estudo molecular para a identificação do tipo do provirus do HTLV-1 em portadores assintomáticos:

- Caso apresente provirus defectivo seja acompanhado com maior frequência para um diagnóstico precoce da Leucemia/Linfoma de células T do adulto.
- Caso apresente provirus completo seja acompanhado com maior frequência para um diagnóstico precoce da Paraparesia Espástica Tropical/Mieolopatia associada ao HTLV-1.

9.0 REFERÊNCIAS

ARAUJO Abelardo; SILVA Marcos Túlio. The HTLV-1 neurological complex. **Lancet Neurology**, London, v. 5, n. 12, p. 1068–1765, Dec. 2006.

ARAUJO, Adele. Best screening assays for the diagnosis of human T-cell lymphotropic virus types 1 and 2 in South America. **Journal of Virological Methods**, v.156, p. 150–151, 2009.

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.

AZRAN et al. Role of Tax protein in human T-cell leukemia virus type-I leukemogenicity. **Retrovirology**. p. 1-20, 2004.

BEILKE, et al. Polymiositis, arthritis, and uveitis in a macaque experimentally infected with human lymphotropic virus type I. **Arthritis and Rheumatism**, Atlanta, v. 39, n. 4, p. 610-615, Apr. 1996.

BERINI, C. A. et al. Comparison of four commercial screening assays for the diagnosis of human T-cell Lymphotropic virus types 1 and 2. *Journal of Virological Methods*, Amsterdam, v. 147, n. 2, p. 322–327, Fev. 2008.

BEZERRA, A. C. S. et al. Infecção pelo HTLV-I/II em grupos de risco no estado de Pernambuco. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ANÁLISES CLÍNICAS, 22., 1995, Olinda, **Temas livres...** Rio de Janeiro: SBAC, 1996. p.9.

BEZERRA, et al. - “Seroprevalence and Pathogeny of infection by HTLV-I in the city of Recife (Tese de Mestrado). Apresentação In: VIII International Conference on Human Retrovirology : HTLV - I. De 9 a 13 de Junho de 1997 – Local: Rio de Janeiro –RJ. 1997.

BISWAS, et al. Neurologic abnormalities in HTLV-I- and HTLV-II-infected individuals without overt myelopathy. *Neurology*, New York, v. 73, n.10, p. 781-789, Sep. 2009.

BLANK. Adult T- cell leukemia in southwest Colombia. In: Zaninivic, V. (Ed.). **HTLV-I: truths and questions**. Cali: Feriva, p. 266-271. 1996.

BLATTNER. The Human type C retrovirus HTLV in blacks from the Caribbean region and relationship to adult T-cell Leukemia/lymphoma. **International Journal Cancer**, New York, v. 30, n. 3, p. 257-264. Sep. 1982.

CALATTINI, et al. Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. **Retrovirology**, London, v. 2, n. 30, p. 1-4, May, 2005.

CANN, A.J.; IRVIN, S.Y.C. **Human T- cell leukemia virus types II and I** *Virology*. 2. ed. New York: Raven Press. Cap. 52, p. 1501-1519. 1990.

CASSEB, et al. 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**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 3, p. 273-276, May, 2006.

CATALAN-SOARES, B. C.; PROIETTI F. A.; CARNEIRO-PROIETTI, A. B. F. Human T-cell lymphotropic viruses (HTLV) in the last decade (1990-2000). Epidemiological aspects. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 4, n. 2, p. 81-95, ago. 2001.

CATALAN-SOARES, B. C.; CARNEIRO-PROIETTI, 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. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 3, p. 926-931, maio/jun. 2005.

CATALAN-SOARES, Bernadette.; PROIETTI Fernando. HTLV-1 e 2: Aspectos Epidemiológicos. In: PROIETTI, Anna (organizadora). **Cadernos Hemominas**. Belo Horizonte, v. 13, p. 69-85. 2006.

CORTES, E.; FOGER, D.; ABOULAFIA, D. HIV-I, HIV-II, and HTLV-I infection in high-risk groups in Brazil. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 320, n. 15, p. 953-958, Apr. 1989.

COSTA. Molecular evidence of human T-cell lymphotropic virus types 1 and 2 (HTLV-1 and HTLV-2) infections in HTLV seroindeterminate individuals from São Paulo, **Brazil. J Clin Virol** v. 44(3), p. 185-189, 2009.

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

EIRAKU, N. et al. Identification and characterization of a new and distinct molecular subtype of human T-cell lymphotropic virus type 2. **Journal of Virology**, Washington, v. 70, n. 3, p. 1481-1492, Mar. 1996.

FERREIRA JUNIOR, O. C.; PLANELLES, V.; ROSEMBLAT, J. D. Human T- cell leukemia viruses: epidemiology, biology, and pathogenesis. **Blood Reviews**, Edinburgh, v. 11, n. 2, p. 91-104, Jun. 1997.

FERREIRA-JUNIOR, O. C.; POLITE, M. B. C. Testes sorológicos para triagem de doenças transmissíveis por transfusão. In: Bordin; J. O.; Covas, D. T. (Ed.). **Hemoterapia: Fundamentos e Prática**. São Paulo: Atheneu, 2007. p.79-80.

FLORENCIO, M. M. et al. Leucemia/linfoma de células T do adulto relato do primeiro caso diagnosticado em PE. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE HEMATOLOGIA, 19., 1990, Campinas, **Resumos...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 1990. p.101.

FOUCHARD, N. et al. Cutaneous T-cell lymphoma, mycosis fungoides, Sézary syndrome and ATL in Mali, West Africa: a clinical, pathological and immunovirological

study of 14 cases and a review of the African ATL cases. **Leukemia**, New Jersey, v. 112, n. 4, p. 578-585, Apr. 1998.

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**, Chicago, v. 182, n. 5, p. 1343–1349, Apr. 2000.

GALVÃO-CASTRO, B. et al. Distribution of human T-lymphotropic virus type-I among blood donors a nationwide Brazilian study. **Transfusion**, Philadelphia, v. 37, n. 2, p. 242-243, Fev. 1997.

GARCIA-VALLEJO, F. et al. Autoimmunity and molecular mimicry in tropical spastic paraparesis/human T-lymphotropic virus-associated myelopathy. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 38, n. 2, p. 241-250. Fev. 2005.

GASMI, M. et al. 1994, Long terminal repeat sequence analysis of HTLV type I molecular variants identified in four north African patients. **AIDS Research and Human Retroviruses**, Philadelphia, v. 10, n. 10, p. 1313-1315, Oct. 1994.

GESSAIN, A. et. al. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. **Lancet**, London, v. 326, n. 8452, p. 407-410, Aug. 1985.

GHOSH, S. K. et al. Human T-cell leukemia virus type I *tax*/*rex* DNA and RNA in cutaneous T-cell lymphoma. **Blood**, New York, v. 84, n. 8, p. 2663-2671, Oct. 1994.

GIBBS, W. N. et al. Non-Hodgkin lymphoma in Jamaica and its relation to ATLL. **Annals of Internal Medicine**, Philadelphia, v. 106, n. 3, p. 361-368, Mar. 1987.

GIOSEFFI, O. N. et al. Leucemia –linfoma T del adulto HTLV-I positiva en Argentina. **Sangre**, Barcelona, v. 40, n. 5, p. 421-425, Oct. 1995.

HARASHIMA N. et al. Identification of two New HLA-A* 1101-Restricted Tax Epitopes Recongnized by Cytotoxic T Lymphocytes in an Adult T-Cell LeuKemia

Patients after Hematopoietic Stem Cell Transplantation. **Journal of Virology**, v.79, n. 15, p. 10088-10092, 2005.

HENEINE, W. et al. Sensitive and specific polymerase chain reaction assays for diagnosis of human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) and HTLV-II infection in HTLV-I/II seropositive individuals. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 30, n. 6, p. 1605-1607, Jun. 1992.

HENNI, M. et al. Polymerase Chain Reaction (PCR) amplification demonstrates the absence of Human T-Cell Lymphotropic Virus (HTLV)-I specific pol sequences in peripheral T-Cell lymphomas. **Journal of Clinical Immunology**, Irvine, n. 10, n. 5, p. 282-286, Sep.1990.

HILL, S. A.; SHUH, M.; DERSE, D. Compararisons of defective HTLV-I proviruses predict the mode of origin and coding potencial of internally deleted genomes. **Virology**, New York, v. 263, n. 2, p. 273-281, Oct. 1999.

HINUMA ,Y. et. al. Adult T-cell leukemia: Antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United America**, Washington, v. 78, n. 10, p. 6476-6480, Oct. 1981.

IJICHI, S. et al. An autoaggressive process against bystander tissues in HTLV-I-infected individuals: a possible pathomechanism of HAM/TSP. Medical hypotheses, Edinburgh, v. 41, n. 6, p. 542-547, Dec. 1993.

IWASAKI, Y. Pathology of cronic myelopathy asociated with HTLV-1 infection (HAM /TSP). **Journal of the Neurological Science**, Amsterdam, v. 96, n. 1, p. 103 -123, Apr. 1990.

IZUMO, S.; UMEHARA, F.; OSAME, M. HTLV-I- associated myelopathy. **Neuropathology**. Sendai, v. 20, p. 65-68. Sep. 2000, Supplement 1.

KALYANARAMAN, V. S. et. al. A New subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) asocieted with variant of hairy cell leukemia. **Science**, Washington, v. 218, n. 4272, p. 571-573, Nov. 1982.

KAMIHIRA, S.; NAKASIMA, S.; OYAKAWA, Y. Transmission of human T-cell lymphotropic virus type I by blood transfusion before and after mass screening of sero from seropositive donors. **Vox Sanguinis**, Basel, v. 52, n.1/2, p. 43-44, Mar. 1987.

KAWAI, H. et al. HTLV-I infection in patients with autoimmune thyroiditis (Hashimoto's thyroiditis). **Journal of Medical Virology**, New York, v. 38, n. 2, p. 138-141, Oct. 1992.

KITAGAWA, T. et al. Antibodies to HTLV-I in Japanese Imigrants in Brazil. **JAMA**, Chicago, v. 256, n. 17 p. 2342, Nov. 1986.

KLEINE, N. W. et al. Prevalence risk factor 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**, Uberaba, v. 42, n. 3, p. 264-270, May/Jun. 2009.

KLEINMAN, S. H. et al. Evaluation of a p-21e-spiked Western Blot (immunoblot) in confirming human T-cell lymphotropic virus type I or II infection in volunteer Blood Donors. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 32, n. 3, p. 603-607, Mar. 1994.

KIRA J et al. Sequence heterogeneity of HTLV-I proviral DNA in the central nervous system of patients with HTLV-I-associated myelopathy. **Ann Neurol**, v. 36, n. 2, p. 149-156, 1994.

KORBER, B. et al. Polymerase chain reaction analysis of defective human T-cell leukemia virus type I proviral genomes in leukemic cells of patients with adult T-cell leukemia. **Journal of Virology**, Washington, v. 65, n. 10, p. 5471-5476, Oct. 1991.

KURBANOL, S.A.; MAMEDOV, M.K. Sorological marked of viral infection in patients with rheumatoid arthritis. **Georgian Med News**, New York, v. 166, n. 1, p. 65-70, Jan. 2009.

LAURENTINO, R. V. et al. Molecular characterization of human T-cell lymphotropic vírus coinfecting human immunodeficiency vírus 1 infected patients in the Amazon region of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.100, n. 4, p. 371-376. Jul. 2005.

LEE, T. H. et al. Quantitation of HTLV-1 and 2 proviral load using real-time quantitative PCR with SYBR green chemistry. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 31, p. 275-282, 2004.

LINHARES, M. I. S. et al. No relation between HTLV-1 infection and filariasis-Serological study on patiens with filariasis in Recife, Brazil. **Microbiology and Immunology**, Tokio, v. 39, n. 11, p. 917-919, 1995.

LOPES, M. S. N.; PROIETTI, A B.F.C. HTLV-1/2 transfusional e hemovigilância: a contribuição dos estudos de *look-back*. **Revista Brasileira Hematologia e Hemoterapia**. São Paulo, v. 30, n. 3, p. 229-240, Maio/Jun. 2008.

LOUREIRO, P. et al. HTLV-1 antibody in blood donors and in haematological patients in the Northeast of Brazil-State of Pernambuco. **Revista Paulista de Medicina**, São Paulo, v. 110, n. 5, 1994.

LOUREIRO, P.; BEZERRA, A.C.; SOUZA E. HTLV-I. Infection in pregnant women in Recife, northeast of Brazil. **Journal Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology**, New York, v. 10, n. 2, p. 264, 1995.

LOUREIRO, Paula. **Infecção pelo HTLV-1** : diagnóstico e determinação da carga proviral em indivíduos assintomáticos e com enfermidades associadas em serviço de referência no Nordeste. 2009. 179 f. Tese (Doutorado em Saúde Pública)- Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2009.

MACKAI, I. M. Real-times in virology. **Nucleic Acids Reseach**, London, v. 30, n. 6, p. 1292-1305, 2002.

MALONEY, E. M. et al. Prediagnostic human T lymphotropic virus type I provirus load were highest in Jamaican children who developed seborrheic dermatitis and

severe anemia. **Journal of infectious diseases**, Chicago, v. 189, n. 1, p. 41-45, Dec. 2004.

MATHIEUX, R. et al. Molecular characterization and phylogenetic analyses of a new, highly divergent simian T-cell lymphotropic virus type 1 (STLV-1 marc 1) in *Macaca arctoides*. **Journal of Virology**, Washington, v. 71, n. 8, p. 6253-6258, Aug. 1997.

MIYAZAKI M, et al. Preferential selection of human T-cell leukemia virus type 1 provirus lacking the 5' long terminal repeat during oncogenesis. **Journal of Virology**, v. 81 n. 11, p. 5714-5723, 2007

MIURA, T. et al. Phylogenetic subtypes of human T-lymphotropic virus type I and their relations to the anthropological background. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United America**, Washington, v. 91, n. 3, p. 1124-7, Feb. 1994.

MONTANHEIRO, P. A. et al. Human T-cell lymphotropic vírus type I (HTLV-I) proviral DNA load among asymptomatic patients and patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 38, n. 11, p. 1643-1647, Nov. 2005.

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. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 190, n. 3, p. 504-510, Aug. 2004.

OKAYAMA, A. et al. Role of HTLV-I proviral DNA load and clonality in the development of adult T-cell leukemia/lymphoma in asymptomatic carriers. **International Journal of Cancer**, New York, v. 110, n. 4, p. 621-625, Jul. 2004.

OSAME, M.; IGATA, A. The history of discovery and clinico-epidemiology of HTLV-I-associated myelopathy (HAM). **Japanese Journal of Medicine, Tokyo**, v. 28, n. 3, p. 412-414, May/Jun. 1989.

OSHIMA, K. et al. Random integration of HTLV-1 provirus: increasing chromosomal instability. **Cancer Letters**, Virginia, v.132, n. 1-2, p. 203- 212, Oct. 1998.

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. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United America**, Washington, v. 77, n. 12, p. 7415-7419, Dec. 1980.

POMBO-DE-OLIVEIRA, M. S. et al. T-cell malignancies in Brazil clinico- pathological and molecular studies of HTLV-1 positive and negative cases. **International Journal of Cancer**, New York, v. 60, p. 6, p. 823-827, Mar.1995.

POMBO-DE-OLIVEIRA, M. S. et al. Geographic diversity of Adult T-cell Leukemia/Lymphoma in Brazil. **International Journal of Cancer**, New York, v. 83, n. 3, p. 291-298, Oct. 1999.

POMBO-DE-OLIVEIRA, M. S. et al. Adult T-cell leukemia/lymphoma and cluster of HTLV-I associated diseases in Brazilian settings. **Leukemia and Lymphoma**, Chur, v. 42, n.1-2, p. 135-146, Jun. 2001.

POSADA-VERGARA, M. P. et al. 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. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 48, n. 4, Jul./Aug. 2006.

PRIMO, J. et al. High HTLV-1 proviral load, a marker for HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis, is also detected in patients with infective dermatitis associated with HTLV-1. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 42, n. 8, p. 761-764, Aug. 2009.

PROIETTI, F. A. et al. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated disease. **Oncogene**, Basingstoke, v. 24, n. 39, p. 6058-6068, Sep. 2005.

RAMIREZ, E. L. et al. Defective human T- cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) provirus in 10 Chilean seronegative patients with tropical spastic paraparesis or HTLV-I associated myelopathy. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, n. 6, p. 1811-1813. Jun. 1998.

RATNER, L.; POIESZ, B. J. Leukemias associated with human T-cell lymphotropic virus type I in a non-endemic region. **Medicine Baltimore**, Baltimore, v. 67, n. 6, p. 401-422, Nov. 1988.

RENNER, J. D. L. et al. Molecular evidence of HTLV-II subtype B among an urban population living in South Brasil. **AIDS Research and Human Retroviruses, New York**, v. 22, n. 4, p. 301-306, Apr. 2006.

RODRIGUEZ, W. et al. Síndrome leucemia/linfoma T-cel adult (ATL) en el Peru. **Acta Cancerológica**, Lima, v. 24, n. 3, p. 7-19, Sep. 1994.

RUDOLH, D. L.; LAL, R. B. Discrimination of human T-lymphotropic virus type-I and type-II infection by synthetic peptides representing structural epitopes from the envelope glycoproteins. **Clinical Chemistry**, New York, v. 39, n.2, p. 288-292, Feb. 1993.

SAITO M. Immunogenetics and the pathological mechanisms of human T-cell leukemia virus type -1 (HTLV-1) associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). **Interdiscip Perspect Infect Dis** 2010.

ROMANOS M. et al. Víruses Oncogênicas. cap. 15. p. 449-478. In: SANTOS, N.; ROMANOS, M.; WIGG, M. **Introdução a Virologia Humana**. 2. Ed. RJ: Guanabara-Koogan S.A. 2008.

SEGURADO, A. A. C. 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-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis from São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.97, n. 3, p. 329-333, Apr. 2002.

SEIKI, M.; HATTOR, S.; YOSHIDA, M. Human adult T-cell leukemia virus: molecular cloning of the provirus DNA and the unique terminal structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United America**, Washington, v. 79, n. 22, p. 6899-6902, Nov. 1982.

SERPA Maria J. A. Retroviridae. P. 315-337. In: OLIVEIRA L. H. S. Virologia humana, Ed. Cultura médica, 1994.

SHUH, M.; 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**, New York, v. 68, n.3-4, p.176-196. Nov. 2005.

SILVA, M. T. et al. 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. **Clinical Infectious Diseases, Chicago**, v. 44, n. 5, p. 689-692, Mar. 2007.

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**, Brasília, v. 39, n. 5, p. 504-506, set/out. 2006.

SOWA, J. M. Human T lymphotropic virus I myelopathy, polymiositis and synovitis: an expanding rheumatic spectrum. **Journal of Rheumatology, Toronto**, v. 19, n. 2, p. 316-318, Feb. 1992.

SWITZER, W. M. et al. Ancient, independent evolution and distinct molecular features of the novel human T-lymphotropic virus type 4. **Retrovirology**, London, v. 6, n. 9, p.1-20, Fev. 2009.

TAMEGÃO-LOPES, B. P. R. R. et al. Carga proviral do HTLV-1 e HTLV-2: um método simples através da PCR quantitativa em tempo real HTLV-1 and HTLV-2 proviral load: a simple method using quantitative real-time PCR. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília**, v. 39, n. 6, p. 548-552, nov./dez. 2006.

TAKATSUKI, K. et al. Clinical diversity in adult-T-cell leukemia/lymphoma. **Cancer Research**, Baltimore, v. 45, p. 4644-4645, 1985.

TAKENOUCHI et al. Defective human T-lymphotropic virus Type 1 provirus in asymptomatic carriers. *International Journal of Cancer* 2010.

TAMIYA, S. et al. Two Types of Defective human T-lymphotropic virus type I provirus in adult T-cell leukemia. **Blood**, New York, v. 88, n. 8, p. 3065-3073, Oct. 1996.

TEIXEIRA, S. T. J. et al. Western Blot seroindeterminate individuals for human T-lymphotropic virus 1/ (HTLV-1/2) in Fortaleza (Brazil): a serological and molecular diagnostic and epidemiological approach. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 7, n. 3, p. 202-209, Jun. 2003.

TERUYA, H. et al. Human T-cell leukemia virus type I infects human lung epithelial cells and induces gene expression of cytokines, chemokines and cell adhesion molecules. **Retrovirology**, London, v. 5, n. 86, p. 1- 10, Sep. 2008.

TORRES, M. J. M. R. et al. Perfil de 192 pacientes com anemia falciforme quanto ao sexo, faixa etária, número de unidades de hemocomponentes transfundidos e soropositividade para HCV, HIV, HTLV I/II e HBsAg. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA, 23., 1998, São Paulo, **Resumos...** São Paulo: Boletim da Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 1998. p.61.

TSUKASAKI, K. et al. Definition, prognostic factors, treatment, and response criteria of adult T-cell leukemia-lymphoma: a proposal from an international consensus meeting. **Journal of Clinical Oncology** , New York, v. 27, n. 3, p. 453-459, Jan. 2009.

UCHIYAMA, T. et al. Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. **Blood**, New York, 1977, v. 50, n. 3, p. 481-492. Sep. 1977.

VALLINOTO, A. C. et al. Molecular epidemiology of human T-lymphotropic virus type II infection in Amerindian and urban populations of the Amazon region of Brazil. **Human Biology**, Detroit, v. 74, n. 5, p. 633-644. Oct. 2002.

VANDAMME, A. M. et al. African origin of human T-lymphotropic virus type 2 (HTLV-2) supported by a potential new HTLV-2d subtype in Congolese bambuti Efe Pygmies. **Journal of virology**, Washington, v. 75, n. 5, p. 4327-4340, May, 1998.

VAN DOOREN, S. et al. Evidence for a post- Columbian introduction of human T-cell lymphotropic virus in Latin America. **Journal of general virology, London**, v. 79, pt. 11, p. 2695-2708, Nov. 1998.

VIDAL, A. U. et al. Phylogenetics classification of human T-cell leukemia/ lymphoma virus type I genotypes in five major molecular and geographical subtypes. **Journal of General Virology**, London, v. 75, p. 3655-3666, Dec.1994.

WATANABE, T. HTLV-1-associated diseases. **International journal of hematology, Limerick** , v. 66, n. 3, p. 257-278, Oct. 1997.

WOLFE, N. D. et al. Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United America**, Washington, v. 102, n. 22, p. 7994- 7999, May, 2005.

YAMAGUCHI, K. KIYOKAWA, T, FUTAMI, G. et al. Pathogenesis of adult T cell leukemia from clinical pathologic features. In: Blattner W.A. (Ed.). **Human retrovirology: HTLV**. New York: Raven Press. 1990. p. 163-171.

YAMASHITA , M. et al. Molecular epidemiology of HTLV-I in the world . **Journal Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology**, New York, v. 13, p S124-S131, 1996. Supplement, 1.

YOSHIDA, M.; MIOSHI, I.; HINUMA, Y. Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell and its implication in the disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United America**, Washington, v. 79, n. 6, p. 2031-2035, Mar. 1982.

APÊNDICES

Apêndice A**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Título da Pesquisa: ESTUDO MOLECULAR DO HTLV-1 EM DOADORES DE SANGUE E PACIENTES PORTADOR DA PARAPARESIA ESPÁSTICA TROPICAL EM PERNAMBUCO

Eu, _____ abaixo assinado, dou o meu consentimento livre e esclarecido para participar como voluntário do projeto de pesquisa supracitado, sob a responsabilidade do pesquisador (a) Ana Cristina de Souza Bezerra, membro da Fundação Hemope.

Assinando este termo de consentimento estou ciente de que:

1-O objetivo da pesquisa é conhecer o perfil molecular do HTLV-1 em doadores de sangue e pacientes com PET/MAH (Paraparesia Espástica Tropical/Mielopatia) com sorologia positiva, negativa e indeterminada em testes sorológicos, analisar a associação desse perfil com o desenvolvimento da doença.

2-Durante o estudo será realizado a coleta de sangue e serão fornecidos alguns dados epidemiológicos como: idade sexo, procedência, escolaridade e outras informações relacionadas a doença que possam vir a ser necessárias.

3- Obtive todas as informações necessárias para estar consciente sobre a minha participação na referida pesquisa

4- Estou livre para interromper a qualquer momento minha participação na pesquisa, sem nenhuma forma de prejuízo ao atendimento.

5- Os autores da pesquisa garantem e se comprometem a preservar a minha privacidade e me asseguram a confiabilidade dos dados e informações coletadas garantindo que os resultados obtidos serão utilizados para alcançar os objetivos do trabalho, expostos acima, incluindo sua publicação na literatura científica especializada.

6- Dúvidas ou outras informações posteriores poderão ser obtidas com a equipe da pesquisa no seguinte endereço: Fundação HEMOPE Rua Joaquim Nabuco -171 Graças e nos telefones 3416-4764 e 9426-9343.

7- Poderei contactar o comitê de ética para apresentar recursos ou reclamações em relação à pesquisa, ensaio clínico, através do telefone: 3421-5694, o qual tomará as medidas cabíveis.

Recife,

Voluntário

RG _____

Pesquisador

Apêndice B**QUESTIONÁRIO**

Nome:

Protuário:

Data de nascimento:

Procedência:

Grau de instrução:

Ensino Fundamental completo () Ensino Fundamental incompleto ()

Ensino Médio completo () Ensino Médio incompleto ()

Ensino superior completo () Ensino superior incompleto ()

Estado Civil :

Transmissão:

Transfusão sangüínea: sim () não ()

Número de transfusões:

Aleitamento: sim () não ()

Compartilha seringa: sim () não ()

Transplante de órgão e tecidos: sim () não ()

Parceiros : único () múltiplo ()

Data de início dos sintomas:

Data do diagnóstico sorológico e/pou clínico de PET/MAH:

Anexo A



Comitê de Ética em Pesquisa

1 - DADOS SOBRE O PROJETO

PARECER Nº 033/06

Título do Projeto: Estudo Molecular para Sequências do Vírus HTLV-I dos Doadores de Sangue dos Hemocentros e Hemonúcleos da Fundação Hemope com Resultados Indeterminados e Positivos em Testes Sorológicos.

Instituição Solicitante: Fundação Hemope

Local de Desenvolvimento do Projeto: Fundação Hemope

Responsável: Divaldo de Almeida Sampaio

Identidade: 1.291.191 SSP/ PE

CPF: 105.914.864-15

Endereço: Av. Cons. Portela, 120/1301 – Espinheiro - CEP 52010-030 - Recife, PE

Telefone: 3421-5430

Finalidade: Iniciação Científica

2 - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Objetivo Geral: Definir um perfil molecular para sequências do vírus HTLV-I dos doadores de sangue de retorno dos hemocentros e hemonúcleos da Fundação Hemope com resultados indeterminados e positivos em testes sorológicos de triagem a saber se existe na nossa população de doadores esse padrão de vírus defeitivo.

Objetivos Específicos:

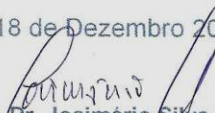
1. Estabelecer uma relação entre o perfil dos resultados do PCR realizado por diferentes regiões do vírus com o resultado da sorologia nos doadores positivos e indeterminados;
2. Dentro desse perfil, observar a frequência de positividade da sequência tax e a positividade para o HTLV I e II;
3. Estudar um grupo de indivíduos saudáveis e portadores assintomáticos para as diferentes regiões do vírus, na tentativa de identificar a possibilidade de provírus incompleto.

Metodologia: Será estudada a população de doadores de sangue com resultados positivos e indeterminados no teste sorológico (enzimaimunoensaio) para HTLV I e II, como também doadores com resultados sorológicos negativos para todos os parâmetros sorológicos (HIV, HCV, HBs-Ag, sífilis e chagas) que são tidos como a população saudável, procedentes dos hemocontros e hemonúcleos da Fundação Hemope. O total de amostra é de 786 doadores com resultado positivo e indeterminado (para retorno). Todas as amostras dos doadores serão submetidas ao teste ELISA para HTLV I e II e as que obtiverem resultados positivos ou indeterminados serão submetidas ao estudo molecular. Os dados serão analisados por meio de tabelas. Será calculada a frequência dos objetivos propostos através de tratamento estatístico adequado. Participarão do estudo doadores de sangue que ao concordarem, deverão assinar o TCLE, ficando claro que a qualquer tempo poderão ser excluídos, se assim solicitarem, sem que venha a prejudicar o seu atendimento na Fundação Hemope.

3 - PARECER DO RELATOR: De acordo com a Resolução CNS 196/96 e complementares o referido protocolo está **APROVADO**.

*Recebi o original
24/10/06
Maísterina*

Anexo B

 CEP/HR Comitê de Ética em Pesquisa HOSPITAL DA RESTAURAÇÃO	
Av. Agamenon Magalhães, s/n 5º andar, Derby, Recife-PE CEP 52020-000 - Telefax: (81) 3421-5694	
PARECER	
Após avaliação no projeto de pesquisa intitulado: ESTUDO MOLECULAR DO HTLV-I EM DOADORES DE SANGUE E PACIENTES PORTADORES DA PARAPARESIA ESPÁTICA TROPICAL EM PERNAMBUCO, o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital da Restauração em reunião datada de 26/11/07 emite parecer favorável para início da pesquisa. CAAE nº 0029.0.102.000-07	
Esse parecer tem CARÁTER TEMPORÁRIO, portanto não poderá ser utilizado como documento de conclusão da pesquisa ficando o pesquisador informado das exigências do CEP-HR e ao final da pesquisa será emitido o parecer Final.	
PESQUISADORA:	ANA CRISTINA DE SOUZA BEZERRA
ORIENTADORA:	MARIA ROSÂNGELA C. D. COELHO
CO-ORIENTADOROR:	DIVALDO DE ALMEIDA SAMPAIO
Recife, 18 de Dezembro 2007.  Prof. Dr. Josimário Silva Coordenador do CEP/HR	

Anexo C



MEMÓRIAS DO
INSTITUTO
OSWALDO
CRUZ

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

- Objetivos e política editorial
- Formato e estilo

ISSN 0074-0276

versão impressa

ISSN 1678-8060

versão on-line

Objetivos e política editorial

As Memórias do Instituto Oswaldo Cruz são uma revista multidisciplinar que publica pesquisas originais relativas aos campos da medicina tropical (incluindo patologia, epidemiologia de campo e estudos clínicos), parasitologia médica e veterinária (protozoologia, helmintologia, entomologia e malacologia) e microbiologia médica (virologia, bacteriologia e micologia). A revista aceita, especialmente, pesquisas básicas e aplicadas em bioquímica, imunologia, biologia molecular e celular, fisiologia, farmacologia e genética relacionada a essas áreas. Comunicações breves são também consideradas. Artigos de revisão só quando solicitados. A revista publica oito números regulares, constituindo um por ano. Ocasionalmente, trabalhos apresentados em simpósios ou congressos são publicados como suplementos.

Os artigos apresentados devem ser escritos preferencialmente em inglês. Quando neste idioma, para não causar atrasos na publicação sugerimos que sejam checados por alguém que tenha o inglês como primeira língua e que, preferencialmente, seja um cientista da área.

A submissão de um manuscrito às Memórias requer que este não tenha sido publicado anteriormente (exceto na forma de resumo) e que não esteja sendo considerado para publicação por outra revista. A veracidade das informações e das citações bibliográficas é de responsabilidade exclusiva dos autores.

Os manuscritos serão analisados por pelo menos dois pareceristas; a aprovação dos trabalhos será baseada no conteúdo científico e na apresentação.

Somente serão aceitas submissões eletrônicas dos artigos, no seguinte endereço: <http://submission.scielo.br/index.php/mioc/login>.

Por meio desse serviço você pode submeter o artigo e acompanhar o status do mesmo durante todo o processo editorial. Garantindo rapidez e segurança na submissão do seu manuscrito e agilizando o processo de avaliação.

O manuscrito deverá ser preparado de acordo com as **Orientações aos Autores**.

Ao encaminhar um manuscrito para a revista, os autores devem estar cientes de que, se aprovado para publicação, o copyright do artigo, incluindo os direitos de reprodução em todas as mídias e formatos, deverá ser concedido exclusivamente para as Memórias. A revista não recusará as solicitações legítimas dos autores para reproduzir seus trabalhos.

Para maiores informações sobre o formato e o estilo da revista, favor consultar um número recente da Revista ou entrar em contato com a Editoria Científica pelos telefones (+55-21-2598.4335/2561-1442), fax (+55-21-2280-5048), ou e-mail (memorias@fiocruz.br / memorias@ioc.fiocruz.br).

Formato e estilo

O manuscrito (incluindo tabelas e referências) deve ser preparado em um software para edição de textos, em espaço duplo, fonte 12, paginado. As margens devem ser de pelo menos 3 cm. As figuras deverão vir na extensão tiff, com resolução mínima de 300 dpi. Tabelas e figuras deverão vir em documentos separados.

Deve ser organizado de acordo com a seguinte ordem:

Título resumido: com até 40 caracteres (letras e espaços)

Título: com até 250 caracteres

Autores: sem títulos ou graduações

Afiliação institucional: endereço completo somente do autor correspondente

Resumo: com até 200 palavras (100 palavras no caso de comunicações breves). Deve enfatizar novos e importantes aspectos do estudo ou observações.

Palavras-chave: devem ser fornecidos de 3 a 6 termos, de acordo com a lista Medical Subject Headings (Mesh) do Index Medicus.

Notas de rodapé: indicando a fonte de financiamento e mudança de endereço

Introdução: deve determinar o propósito do estudo, oferecer um breve resumo (e não uma revisão de literatura) dos trabalhos anteriores relevantes, e

especificar quais novos avanços foram alcançados através da pesquisa. A introdução não deve incluir dados ou conclusões do trabalho em referência.

Materiais e Métodos: deve oferecer, de forma breve e clara, informações suficientes para permitir que o estudo seja repetido por outros pesquisadores. Técnicas padronizadas bastam ser referenciadas.

Ética: ao descrever experimentos relacionados a temas humanos, indicar se os procedimentos seguidos estiveram de acordo com os padrões éticos do comitê responsável por experimentos humanos (institucional ou regional) e de acordo com a Declaração de Helsinki de 1975, revisada em 1983. Ao relatar experimentos em animais, indicar se diretrizes de conselhos de pesquisa institucionais ou nacionais, ou qualquer lei nacional relativa aos cuidados e ao uso de animais de laboratório foram seguidas.

Resultados: devem oferecer uma descrição concisa das novas informações descobertas, com o mínimo julgamento pessoal. Não repetir no texto todos os dados contidos em tabelas e ilustrações.

Discussão: deve limitar-se ao significado de novas informações e relacionar as novas descobertas ao conhecimento existente. Somente as citações indispensáveis devem ser incluídas.

Agradecimentos: devem ser breves e concisos e se restringir ao absolutamente necessário.

Referências: devem ser precisas. Somente as citações que aparecem no texto devem ser referenciadas. Trabalhos não publicados, a não ser os já aceitos para publicação, não devem ser citados. Trabalhos aceitos para publicação devem ser citados como "in press"; nesse caso, uma carta de aceitação da revista deverá ser fornecida. Dados não publicados devem ser citados somente no texto como "unpublished observations"; nesse caso, uma carta com a permissão do autor deve ser fornecida. As referências ao final do manuscrito devem ser organizadas em ordem alfabética de acordo com o sobrenome do primeiro autor.

Os títulos de revistas devem ser abreviados de acordo com o estilo usado no Index Medicus. Consultar:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=journals&TabCmd=Limits>.

• **No texto, usar o sobrenome do autor e a data:**

Lutz (1910) ou (Lutz 1910).

Com dois autores, a forma é:

(Lutz; Neiva 1912) ou Lutz and Neiva (1912).

Quando há mais que dois autores, somente o primeiro é mencionado:

Lutz et al. (1910) ou (Lutz et al. 1910).

• **Nas referências, usar os seguintes estilos:**

Artigo de revista

Chagas C, Villela E 1922. Forma cardíaca da tripanosomíase americana. Mem Inst Oswaldo Cruz 14: 15-61.

Livro ou Tese

Forattini OP 1973. Entomologia Médica. Psychodidae, Phlebotominae, Leishmaniose, Bartonelose, Vol. IV, Edgard Blucher, São Paulo, 658 pp.

Morel CM 1983. Genes and Antigens of Parasites. A Laboratory Manual, 2nd ed., Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, xxii + 580 pp.

Mello-Silva CC 2005. Controle alternativo e alterações fisiológicas em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), hospedeiro intermediário de *Schistosoma mansoni* Sambom, 1907 pela ação do látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopii* N.E.B (Euphorbiaceae), PhD Thesis, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 85 pp.

Capítulo de livro

Cruz OG 1911. The prophylaxis of malaria in central and southern Brasil. In R Ross, The Prevention of Malaria, John Murray, London, p. 390-398.

Artigo de revista na Internet

Aboud S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. Am J Nurs [serial on the Internet]. 2002 Jun [cited 2002 Aug 12];102(6):[about 3 p.]. Available from: <http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htm>

Monografia na Internet

Foley KM, Gelband H, editors. Improving palliative care for cancer [monograph on the Internet]. Washington: National Academy Press; 2001 [cited 2002 Jul 9]. Available from: <http://www.nap.edu/books/0309074029/html/>.

Homepage/Web site

Cancer-Pain.org [homepage on the Internet]. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc.; c2000-01 [updated 2002 May 16; cited 2002 Jul 9]. Available from: <http://www.cancer-pain.org/>.

Parte de uma homepage/Web site

American Medical Association [homepage on the Internet]. Chicago: The Association; c1995-2002 [updated 2001 Aug 23; cited 2002 Aug 12]. AMA Office of Group Practice Liaison; [about 2 screens]. Available from: <http://www.ama-assn.org/ama/pub/category/1736.html>

BASE DE DADOS NA INTERNET

Acesso aberto:

Who's Certified [database on the Internet]. Evanston (IL): The American Board of Medical Specialists. c2000 - [cited 2001 Mar 8]. Available from: <http://www.abms.org/newsearch.asp>

Acesso fechado:

Jablonski S. Online Multiple Congenital Anomaly/Mental Retardation (MCA/MR) Syndromes [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). c1999 [updated 2001 Nov 20; cited 2002 Aug 12]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/mesh/jablonski/syndrome_title.html

Parte de uma base de dados na Internet

MeSH Browser [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); 2002 - [cited 2003 Jun 10]. Meta-analysis; unique ID: D015201; [about 3 p.]. Available from: <http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html> Files updated weekly. Updated June 15, 2005

• **Ilustrações:** figuras e tabelas devem ser compreensíveis sem a necessidade de referência ao texto.

- Figuras: as fotografias devem ser bem nítidas, com alto contraste, ampliadas em preto e branco em papel brilhante, se apresentadas lâminas, as figuras devem ser numeradas consecutivamente em algarismos arábicos. As escalas devem ser indicadas por uma linha ou barra na figura, e referenciadas, se necessário, na legenda (por exemplo, bar = 1 mm etc.). Lâminas e gráficos devem ajustar-se tanto em uma coluna (8 cm) ou na largura completa (16.5 cm) da página, e devem ser menores que a página para permitir a inclusão da legenda. As letras e números nas figuras devem ter tamanho legível após a redução ou a impressão. Ilustrações coloridas somente podem ser aceitas se os autores assumirem os custos. Por outro lado, uma fotografia colorida ilustra a capa de cada fascículo de Memórias, e os autores são convidados a submeter para consideração da revista ilustrações com legendas de seus manuscritos que poderão vir a ilustrar a capa.

- Tabelas: devem complementar, e não duplicar, o texto. Elas devem ser numeradas em algarismos romanos. Um título breve e descritivo deve constar no alto de cada tabela, com quaisquer explicações ou notas de rodapé (identificadas com letras a, b, c etc.) colocadas abaixo.

• **Comunicações breves:** devem ser breves e diretas. Seu objetivo é comunicar com rapidez resultados ou técnicas particulares. As comunicações não devem ocupar mais do que três páginas impressas, incluindo figuras e/ou tabelas. Não devem conter referências em excesso. As referências devem ser citadas no final do texto, usando o mesmo formato para artigos originais. Um resumo breve e três palavras-chave devem ser apresentados.

• **Formato alternativo:** Os manuscritos podem ser submetidos seguindo os "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" produzidos pelo International Committee of Medical Journal Editors, também conhecidos como Vancouver Style. Nesse caso, os autores devem seguir as diretrizes da quinta edição (Annals of Internal Medicine 1997; 126: 36-47, ou no website <http://www.acponline.org/journals/resource/unifreq/htm>), sendo responsáveis por modificar o manuscrito onde diferir das instruções aqui apresentadas, se o manuscrito for aceito para publicação. Os autores também

deverão seguir os Uniform Requirements para quaisquer outras diretrizes omitidas nestas instruções.

Uma vez que um trabalho seja aceito para publicação, os autores devem enviar:

- uma declaração de **affidavit** fornecida pela produção editorial da revista, assinada por todos os autores. Autores de diferentes países ou instituições podem assinar em diferentes folhas que contenham a mesma declaração.
- uma declaração de **copyright** fornecida pela produção editorial da revista, assinada pelo autor responsável pela correspondência.
- **Taxas:** a revista não cobra taxas para publicação.
- **Provas:** serão enviadas provas tipográficas aos autores para a correção de erros de impressão. As provas devem retornar para a Produção Editorial na data estipulada. Outras mudanças no manuscrito original não serão aceitas nesta fase.

[\[Home\]](#) [\[Sobre a revista\]](#) [\[Corpo editorial\]](#) [\[Assinaturas\]](#)



Todo o conteúdo do periódico, exceto onde está identificado, está licenciado sob uma Licença Creative Commons

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz
Av Brasil, 4365 - Manguinhos
Pavilhão Mourisco, sala 308
21040-900 - Rio de Janeiro - RJ
Tel: +55-21 2562.1222
Fax: +55-21 2562.1220



memorias@fiocruz.br

Anexo D**Guidelines for Authors**

www.karger.com/int_guidelines

Submission

Only original papers written in English are considered and should be submitted online:

Online Manuscript Submission

Should you experience problems with your submission, please contact:
int@karger.ch

S. Karger AG

Editorial Office Intervirology

PO Box

CH–4009 Basel (Switzerland)

Tel. +41 61 306 1344

Fax +41 61 306 1434

Names, postal and e-mail addresses of three experts in the appropriate area of research should accompany each manuscript. Selected scientist(s) will be invited to act as referee(s). Referees suggested should not be from the same institution as the author and should have expert knowledge of the subject.

Conditions

All manuscripts are subject to editorial review. Manuscripts are received with the explicit understanding that they are not under simultaneous consideration by

any other publication. Submission of an article for publication implies the transfer of the copyright from the author to the publisher upon acceptance. Accepted papers become the permanent property of 'Intervirology' and may not be reproduced by any means, in whole or in part, without the written consent of the publisher. It is the author's responsibility to obtain permission to reproduce illustrations, tables, etc. from other publications.

Studies involving human subjects: Authors of articles based on trials in humans must first obtain approval from an independent national ethics committee. In addition, a statement that research has been carried out in accordance with the Helsinki Declaration, signed by all authors, must be submitted to the Editorial Office along with the submitted paper.

Consent of patients: If there is any chance that a patient may be identified from an illustration, we ask for the written consent of the patient for publication (or where appropriate from his/her relatives or guardian). Data relating to anonymized tissue and other samples will not normally be considered to be personal information. Publication of research findings connected with such samples does not require patient consent.

Studies involving animals: An article based on trials performed on animals requires a statement that approval from an independent ethics committee has been obtained, signed by all authors.

The Editor-in-Chief recommends that approvals and informed consent, where appropriate, are also declared in the article itself, preferably in the Materials and Methods section.

Arrangement

Lines should be numbered in the margin.

Title page: The first page of each paper should indicate the title, the authors' names, the institute where the work was conducted, and a short title for use as

running head. NB: Authors wishing to preserve the phonetic meaning of diacritics (PubMed reduces diacritics to their root characters) must spell their names accordingly when submitting manuscripts (e.g. Müller should be Mueller).

Full address: The exact postal address of the corresponding author complete with postal code must be given at the bottom of the title page. Please also supply phone and fax numbers, as well as e-mail address.

Key words: For indexing purposes, a list of 3–10 key words in English is essential.

Abstract: Each paper needs an abstract of up to 200 words structured with subheadings as follows: Objective(s), Methods, Results, Conclusion(s).

Footnotes: Avoid footnotes. When essential, they are numbered consecutively and typed at the foot of the appropriate page.

Body of the paper: Manuscripts should then be divided into the following subdivisions: Introduction, Materials and Methods (as brief as possible), Results, Discussion, Acknowledgments and References.

Tables and illustrations: Tables and illustrations (both numbered in Arabic numerals) should be prepared on separate sheets. Tables require a heading and figures a legend, also prepared on a separate sheet. Due to technical reasons, figures with a screen background should not be submitted. When possible, group several illustrations on one block for reproduction (max. size 180 x 223 mm) or provide crop marks. B/w half-tone and color illustrations must have a final resolution of 300 dpi after scaling, line drawings one of 800-1200 dpi.

Color Illustrations

Online edition: Color illustrations are reproduced free of charge. In the print version, the illustrations are reproduced in black and white. Please avoid referring to the colors in the text and figure legends.

Print edition: Up to 6 color illustrations per page can be integrated within the text at CHF 800.00 per page.

References

In the text identify references by Arabic numerals [in square brackets]. Material submitted for publication but not yet accepted should be noted as 'unpublished data' and not be included in the reference list. The list of references should include only those publications which are cited in the text. Do not alphabetize; number references in the order in which they are first mentioned in the text. The surnames of the authors followed by initials should be given. There should be no punctuation other than a comma to separate the authors. Preferably, please cite all authors. Abbreviate journal names according to the Index Medicus system. Also see International Committee of Medical Journal Editors: Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals (www.icmje.org).

Examples

(a) Papers published in periodicals: Sun J, Koto H, Chung KF: Interaction of ozone and allergen challenges on bronchial responsiveness and inflammation in sensitised guinea pigs. *Int Arch Allergy Immunol* 1997;112:191–195.

(b) Papers published only with DOI numbers: Theoharides TC, Boucher W, Spear K: Serum interleukin-6 reflects disease severity and osteoporosis in mastocytosis patients. *Int Arch Allergy Immunol* DOI: 10.1159/000063858.

(c) Monographs: Matthews DE, Farewell VT: *Using and Understanding Medical Statistics*, ed 3, revised. Basel, Karger, 1996.

(d) Edited books: Parren PWHL, Burton DR: Antibodies against HIV-1 from phage display libraries: Mapping of an immune response and progress towards antiviral immunotherapy; in Capra JD (ed): Antibody Engineering. Chem Immunol. Basel, Karger, 1997, vol 65, pp 18–56.

Reference Management Software: Use of EndNote is recommended for easy management and formatting of citations and reference lists.

Digital Object Identifier (DOI)

S. Karger Publishers supports DOIs as unique identifiers for articles. A DOI number will be printed on the title page of each article. DOIs can be useful in the future for identifying and citing articles published online without volume or issue information. More information can be found at www.doi.org

Supplementary Material

Supplementary material is restricted to additional data that are not necessary for the scientific integrity and conclusions of the paper. Please note that all supplementary files will undergo editorial review and should be submitted together with the original manuscript. The Editors reserve the right to limit the scope and length of the supplementary material. Supplementary material must meet production quality standards for Web publication without the need for any modification or editing. In general, supplementary files should not exceed 10 MB in size. All figures and tables should have titles and legends and all files should be supplied separately and named clearly. Acceptable files and formats are: Word or PDF files, Excel spreadsheets (only if the data cannot be converted properly to a PDF file), and video files (.mov, .avi, .mpeg).

Nomenclature of Viruses

Names used for viruses should be those approved by the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) and published in Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (eds): Virus Taxonomy, VIIIth

Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, ed 2, revised (New York, Academic Press, 2005). If desired, synonyms may be added in parentheses when the name is first mentioned. Approved generic (or group) and family names should also be used.

Short Communications

In addition to regular papers, a section of the journal will publish brief communications of important findings, in which illustrative material should be limited. Such notes should include a brief summary and key words, the body of the report (without any subdivisions), brief acknowledgment, and a few selected references. The general style and submission procedures outlined above apply to the short communication.

Commentaries

Short commentaries of an editorial nature may be submitted to the journal. In these communications, usual manuscript subdivisions do not apply, and a summary statement is not needed; however, a very brief reference list may be included.

Letters to the Editor

This section provides readers with a forum in which to exchange ideas and comments on papers published in the journal. Letters should be no longer than 1–½ double-spaced pages, including a maximum of six references, and do not require abstracts or formal section headings.

Page Charges

There are no page charges for papers of 6 or fewer printed pages (including tables, illustrations and references). Each additional complete or partial page is charged to the author at CHF 325.00. The allotted size of a paper is equal to approx. 16 manuscript pages (including tables, illustrations and references).

E-pub First

All articles are published electronically ahead of print with a DOI number and are supplemented later with the definite reference of the printed version. The articles become available immediately after the authors' approval to publication, with the added advantage of being citable much earlier than in print. Authors can influence the time of appearance by promptly returning the proofs.

Author's Choice™

Karger's Author's Choice™ service broadens the reach of your article and gives all users worldwide free and full access for reading, downloading and printing at www.Karger.com. The option is available for a one-time fee of CHF 3,000.00, which is a permissible cost in grant allocation. More information can be found at www.karger.com/authors_choice.

NIH-Funded Research

The U.S. National Institutes of Health (NIH) mandates under the NIH Public Access Policy that final, peer-reviewed manuscripts appear in its digital database within 12 months of the official publication date. As a service to authors, Karger submits the final version of your article on your behalf to PubMed Central (PMC) immediately upon publishing. It usually receives a PMCID within approximately a month and will appear in PMC after 12 months. For those selecting our premium Author's Choice™ service, the usual embargo will be overridden, accelerating the accessibility of your work. More details on NIH's Public Access Policy are available [here](#).

Self-Archiving

Karger permits authors to archive their pre-prints (i.e. pre-refereeing) or post-prints (i.e. final draft post-refereeing) on their personal or institution's servers, provided the following conditions are met: Articles may not be used for commercial purposes, must be linked to the publisher's version, and must

acknowledge the publisher's copyright. Authors selecting Karger's Author's Choice™ feature, however, are also permitted to archive the final, published version of their article, which includes copyediting and design improvements as well as citation links.

Proofs

Unless indicated otherwise, proofs are sent to the first-named author and should be returned with the least possible delay. Alterations made in proofs, other than the correction of printer's errors, are charged to the author. No page proofs are supplied.

Reprints

Order forms and a price list are sent to the author with the proofs. Orders submitted after the issue is printed are subject to considerably higher prices.