UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Vírus linfotrópicos de células T humanas dos tipos 1 e 2 (HTLV-1 e HTLV-2). Estudo de segmentos do genoma proviral obtidos de pacientes com HIV/Aids de São Paulo e de Londrina e região

Mariana Cavalheiro Magri

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa. Dra. Adele Caterino de Araujo

São Paulo
2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Vírus linfotrópicos de células T humanas dos tipos 1 e 2 (HTLV-1 e HTLV-2). Estudo de segmentos do genoma proviral obtidos de pacientes com HIV/Aids de São Paulo e de Londrina e região

Versão corrigida da Tese conforme Resolução CoPGr 5890.
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP.

Mariana Cavalheiro Magri

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa. Dra. Adele Caterino de Araujo

São Paulo
2013

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Magri, Mariana Cavalheiro
M212v Vírus linfotrópicos de células T humanas dos tipos 1 e 2 (HTLV-1 e HTLV-2). Estudo de segmentos do genoma proviral obtidos de pacientes com HIV/Aids de São Paulo e de Londrina e região / Mariana Cavalheiro Magri. -- São Paulo, 2013.
182p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Caterino-de-Araujo, Adele

1. Retrovírus: Microbiologia médica 2. Biologia molecular 3. Epidemiologia 4. Filogenia 5. Virologia I. T. II. Caterino-de-Araujo, Adele, orientador.

616.0194 CDD

Mariana Cavalheiro Magri

Vírus linfotrópicos de células T humanas dos tipos 1 e 2 (HTLV-1 e HTLV-2). Estudo de segmentos do genoma proviral obtidos de pacientes com HIV/Aids de São Paulo e de Londrina e região

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Adele Caterino de Araujo
orientador/presidente

Prof. Dr. José Eduardo Levi
1º. examinador

Prof. Dr. Jorge Simão do Rosário Casseb
2º. examinador

Prof. Dr. Celso Francisco Hernandes Granato
3º. examinador

Profa. Dra. Rosário Dominguez Crespo Hirata
4º. examinador

São Paulo, 26 de Setembro de 2013.

Trabalho realizado no Laboratório de Retrovírus do Centro de Virologia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, SP.

Apoio Financeiro:

-Ministério da Ciência e Tecnologia/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (MCT/CNPq): processo #481040/2007-2 e Bolsa de Produtividade em Pesquisa #303328/2009-6 e #303545/2012-10.

-Instituto Adolfo Lutz de São Paulo: projeto #49D/2010.

Dedico este trabalho aos meus pais Pedro e Heloisa que tanto amo, por estarem ao meu lado em todos os momentos da minha vida e por me fazerem acreditar que era capaz de tudo. Obrigada pelo amor incondicional, compreensão, carinho, valores e proteção.

Agradeço à Profa. Dra. Adele Caterino de Araujo pela entrega incondicional que faz de sua vida à Ciência e por me mostrar caminhos que nunca encontraria sozinha. Desde quando a conheci, a admiro e estimo, por isso agradeço por ter tido paciência durante minhas falhas e compartilhado alegrias durante os acertos. Por ter sempre me incentivado e apoiado durante o aprimoramento, o mestrado e o doutorado. Agradeço a honra de ter sido orientada por ela, minha eterna orientadora, e por todos os ensinamentos e pela amizade.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luis Fernando de Macedo Brigido, muito obrigada por ter me aceitado em seu laboratório para a realização desse projeto, pelas orientações e por todos esses anos de convívio, aprendizado e amizade.

À Profa. Dra. Irene da Silva Soares pela compreensão, apoio e disponibilidade no momento mais difícil.

À Dra. Helena Kaminami Morimoto por parte das amostras e pela colaboração durante todo o projeto.

Aos professores Dr. Aluisio Augusto Cotrim Segurado, Dra. Rosário Dominguez Crespo Hirata e Dr. Jorge Simão do Rosário Casseb pelo comprometimento com o qual participaram do exame de qualificação, contribuindo com suas sábias críticas e sugestões.

À Profa. Dra. Fátima Mitiko Tengan por toda a compreensão e generosidade na etapa final do doutorado.

Aos companheiros do Laboratorio de Retrovírus do Centro de Virologia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo pela colaboração, convívio, amizade e pelas lembranças que farão parte de uma etapa importante da minha vida: Jaqueline, Mayra, João Paulo, João Leandro, Rosangela, Mariucha, Paula, Gabriela, Denise, Luana, Giselle, Luciana, André, Sandro, Maria, Fabio, Flávio, Andrea, Flávia e Ricardo. JL, obrigada pelas discussões de protocolo. Dra. Rosangela, obrigada por compartilhar seus conhecimentos em bioinformática. Jackie, Mayroca e Joãozinho, vocês são amigos muito especiais!

À todos os colegas da Centro de Virologia do Instituto Adolfo Lutz, em especial aos do Núcleo de Doenças Sanguíneas e Sexuais, e à todos os colegas do Centro de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz, pela amizade.

À Emanuela Avelar Silva Costa e Karoline Rodrigues Campos pelo companheirismo e apoio durante esses anos e, por compartilharem o fato de serem “amigas do HTLV”.

À minha familia, por estar sempre ao meu lado, me incentivando e apoiando. Especialmente aos meus queridos irmãos Eduardo e Thiago e minhas cunhadinhas lindas Danielle e Juliana, sempre presentes, amigos e companheiros. E a fofíssima pequenina Julia! Amo muito vocês.

Ao meu namorado Alfredo, por todo carinho, amor e amizade e, por sempre acreditar que vai dar tudo certo. Agradeço muito por você existir na minha vida, te amo!

Aos meus sogros Benjamin e Elizabeth e, meu cunhado Raphael, pelo incentivo e carinho. Vocês são especiais!

Às minhas boas e velhas amigas, Mariana Mandelli, Ana Carolina de Bragança, Anne Spichler, Andressa Picoli, Anna Arestivo Nicolau, Ana Carolina Trindade, e Michele Picoli, que perto ou distante estão sempre presentes na minha vida.

Aos novos colegas de trabalho do Laboratório de Investigação Médica em Hepatologia por Vírus (LIM-47) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

E, finalmente, à todos que sempre torceram por mim e aos que me influenciaram positivamente ao longo da minha vida.

“A vontade de se tornar algo melhor a cada dia é o que faz do ser humano uma máquina de sonhar.

Projetar ideias e desejos e lutar para transformar o que um dia foi um simples pensamento em uma situação real.

Nunca desistir de algo que se deseja muito e que se almeja fazer parte da vida.

O ser humano sonha!

Mas se ele apenas sonhasse nunca saberia do que é capaz, é preciso conquistar os sonhos.”

(Autor Desconhecido)

RESUMO

MAGRI, M. C. **Vírus linfotrópicos de células T humanas dos tipos 1 e 2 (HTLV-1 e HTLV-2). Estudo de segmentos do genoma proviral obtidos de pacientes com HIV/Aids de São Paulo e de Londrina e região.** 2013. 184 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

O Brasil é considerado o país com o maior número absoluto de indivíduos infectados pelos vírus linfotrópicos de células T humanas dos tipos 1 e 2 (HTLV-1 e HTLV–2), perto de 2,5 milhões; além disso, é também considerado epidêmico para o HIV e, portanto, casos de coinfecção HIV/HTLV são frequentes no país. O presente trabalho efetuou o seqüenciamento das regiões LTR, *env* e *tax* do genoma proviral do HTLV-1 e do HTLV-2 isolados das amostras de sangue de pacientes coinfectados pelo HIV-1 de Londrina e região (n=34) e de São Paulo (n=20), para realizar a caracterização molecular e determinar subtipos virais. Foram utilizadas na análise das sequências as ferramentas Sequencher 4.7, BLAST, Genotyping-NCBI, Subtyping-REGA, BioEdit 7.0.5.3, ClustalW, GenBank, PAUP 4.0.b10*,* Modeltest 3.7, TreeView 1.6.6 e MEGA4. As diversas análises confirmaram como subtipos prevalentes o HTLV-1a, subgrupo Transcontinental A, e o HTLV-2a (variante -2c). Foram detectadas assinaturas moleculares nos isolados do Brasil. Detectou-se o genótipo brasileiro *tax*A para o HTLV-1 e para o HTLV-2 a Tax longa**,** a qual é característica da variante HTLV-2c. Houve também a confirmação da troca de aminoácido S1909P no *env* dos HTLV-2. Especulou-se sobre duas entradas do HTLV-1 no Brasil e sobre a disseminação do HTLV-2c em grupos distintos quanto ao comportamento de risco e região geográfica. O estabelecimento de métodos laboratoriais otimizados para isolados brasileiros de HTLV-1 e HTLV-2 possibilitou melhor compreensão da diversidade genômica e da origem e disseminação dos HTLVs em populações coinfectadas pelo HIV no Brasil.

Palavras-chave: Vírus linfotrópicos de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1). Vírus linfotrópicos de células T humanas do tipo 2 (HTLV-2). Coinfecção HIV-1. Caracterização molecular. Epidemiologia.

ABSTRACT

MAGRI, M.C. **Human T-lymphotropic virus type 1 and 2 (HTLV-1 and HTLV-2). Study on proviral genome segments obtained from patients with HIV/Aids from Sao Paulo and Londrina and vicinities.** 2013. 184 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Brazil is considered the country with the major absolute number of individuals infected with human T-lymphotropic virus types 1 and 2 (HTLV-1 and HTLV-2), close to 2,500,000**;** moreover, it is also considered epidemic for HIV/Aids =and therefore HIV/HTLV coinfection is frequent in the country. This study aimed at sequencing the LTR, *env* and *tax* regions of the proviral genome of HTLV-1 and HTLV-2 isolated from blood samples obtained from patients coinfected with HIV-1 from Londrina and vicinities (n=34) and São Paulo (n=20), in order to perform the molecular characterization and viral subtyping. For sequences analysis, several bioinformatics tools were employed**:** Sequencher 4.7, BLAST, Genotyping-NCBI, Subtyping-REGA, BioEdit 7.0.5.3, ClustalW, GenBank, PAUP 4.0.b10, Modeltest 3.7, TreeView 1.6.6 and MEGA4. The results confirmed as prevalent the HTLV-1a subtype, the Transcontinental subgroup A, and the HTLV-2a (variant-2c). Molecular signatures characteristic of Brazilian isolates were detected: *tax*A Brazilian genotype in HTLV-1, and the long Tax which is characteristic of the HTLV-2c in HTLV-2. Also, it was confirmed the S1909P amino acid change in the *env* region of HTLV-2c. It was speculated on two entrances of HTLV-1 in Brazil, and on the spread of HTLV-2c in distinct groups related to risk factors and geographic region. The establishment and optimization of laboratory methods performed in this study allowed to get a better understanding on HTLVs genomic diversity, and to give insights on the origin and spread of HTLVs in populations coinfected with HIV in Brazil.

Keywords: Human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1). Human T-lymphotropic virus type 2 (HTLV-2). HIV-1 Coinfection. Molecular characterization. Epidemiology.

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Distribuição geográfica de HTLV-1 e HTLV-2 no mundo. 26

Figura 2. Representação esquemática do genoma do HTLV-1. 27

Figura 3. Árvore filogenética *Maximum Likelihood* da região LTR do HTLV-1 com 692 pb (posição 75-766 em relação ao protótipo internacional ATK) de 59 isolados, incluindo as 17 sequências de Londrina e região e de São Paulo (número de acesso no GenBank JF271836-JF271852) em negrito, construída usando o modelo evolutivo GTR+G, usando o PAUP v4b10. Valores de *bootstrap* acima de 70% e *zero length* com $p<0.001$ (**) e $p\leq0.05$ (*) estão retratados nos ramos. O isolado mel5 (HTLV-1c) foi usado com grupo externo. 63

Figura 4. Subtipo do HTLV-1 gerado pela ferramenta Genotyping-NCBI a partir da sequência da região *env* da amostra BRLO14-02. A parte superior do gráfico mostra a sequência do presente estudo, com a cor vermelha referente ao seu subtipo (A), definido através da comparação com banco de dados de sequências do NCBI. 65

Figura 5. Árvore filogenética *Maximum Likelihood* da região *env* do HTLV-1 com 705 pb (posição 5614-6318 em relação ao protótipo internacional ATK) de 44 isolados, incluindo as 15 sequências de Londrina e região e de São Paulo (número de acesso no GenBank HM770426-HM770440) em negrito, construída usando o modelo evolutivo HKY+i+G, usando o PAUP v4b10. Valores de *bootstrap* acima de 70% e *zero length* com $p<0.001$ (**) e $p\leq0.05$ (*) estão retratados nos ramos. O isolado mel5 (HTLV-1c) foi usado com grupo externo. 66

Figura 6. Alinhamento de aminoácidos da região *env* do HTLV-1 (705 pb) usando a ferramenta ClustalW do programa BioEdit 7.0.5.3, mostrando a substituição de Valina para Isoleucina (V-I) na posição 1981, em 6 amostras do Paraná (BRLO) e de São Paulo (BRSP), em relação ao protótipo internacional Mo. 67

Figura 7. Subtipo do HTLV-1 gerado pela ferramenta Genotyping-NCBI a partir da sequência da região *tax* da amostra BRLO14-02. A parte superior do gráfico mostra a sequência do presente estudo, com a cor vermelha referente ao seu subtipo (A), definido através da comparação com banco de dados de sequências do NCBI. 68

Figura 8. Árvore filogenética *Neighbor Joining* da região *tax* do HTLV-1 com 977 pb (posição 7378–8354 em relação ao protótipo internacional ATK) de 49 isolados, incluindo as 13 sequências de Londrina e região e de São Paulo (número de acesso no GenBank JN887698-JN887710) em negrito, construída usando o modelo evolutivo TrN+G, usando o PAUP v4b10. Valores de *bootstrap* acima de 65% e *zero length* com $p<0.001$ (**) e $p\leq0.05$ (*) estão retratados nos ramos. O isolado EL (HTLV-1b) foi usado 69

com grupo externo.

Figura 9. Árvore filogenética *Neighbor Joining* da região LTR do HTLV-2 com 458 pb (posição 181-638 em relação ao protótipo internacional Mo) de 88 isolados, incluindo as 18 sequências de Londrina e região (número de acesso no GenBank GU573730-GU573743) e antigas de São Paulo em negrito, construída usando o modelo evolutivo HKY+i+G, usando o PAUP v4b10. Valores de *bootstrap* acima de 70% e *zero length* com *p*<0.001 (**) e *p*≤0.05 (*) estão retratados nos ramos. O isolado Efe2 (HTLV-2d) foi usado com grupo externo. 73

Figura 10. Árvore filogenética *Maximum Likelihood* da região LTR do HTLV-2 com 458 pb, (posição 181-638 em relação ao protótipo internacional Mo) de 51 isolados, incluindo as 18 sequências de Londrina e região (número de acesso no GenBank GU573730-GU573743) e antigas de São Paulo em negrito, construída usando o modelo evolutivo HKY+i+G, usando o PAUP v4b10. Valores de *zero length* com *p*<0.001 (**) e *p*≤0.05 (*) estão retratados nos ramos. O isolado NRA (HTLV-2b) foi usado com grupo externo. (MAGRI *et al*., 2010, **Anexo L**) 75

Figura 11. Mapas de restrição enzimática da região LTR do HTLV-2 (nt. 181-638) das sequências estudadas, usando as ferramentas Sequencher, Cutter e NEBcutter. 76

Figura 12. Árvore filogenética *Neighbor Joining* da região LTR do HTLV-2 com 458 pb (posição 181-638 em relação ao protótipo internacional Mo) de 77 isolados, incluindo as 23 sequências de Londrina e região e de São Paulo (número de acesso no GenBank GU573730-GU573743 e JQ435902-JQ435910) em negrito, construída usando o modelo evolutivo HKY+i+G, usando o PAUP v4b10. Valores de *bootstrap* acima de 65% e *zero length* com *p*<0.001 (**) e *p*≤0.05 (*) estão retratados nos ramos. O isolado Efe2 (HTLV-2d) foi usado com grupo externo. 77

Figura 13. Subtipo do HTLV-2 gerado pela ferramenta Genotyping-NCBI a partir da sequência da região env da amostra BRLO03-02. A parte superior do gráfico mostra a sequência do presente estudo, com a cor vermelha referente ao seu subtipo (A), definido através da comparação com banco de dados de sequências do NCBI. 79

Figura 14. Árvore filogenética *Neighbor Joining* da região *env* do HTLV-2 com 1065 pb (posição 5573-6637 em relação ao protótipo internacional Mo) de 48 isolados, incluindo as 36 sequências de Londrina e região e de São Paulo (número de acesso no GenBank HM770390-HM770425) em negrito, construída usando o modelo evolutivo HKY+i+G, usando o PAUP v4b10. Valores de *bootstrap* acima de 70% e *zero length* com *p*<0.001 (**) e *p*≤0.05 (*) estão retratados nos ramos. O isolado Efe (HTLV-2d) foi usado com grupo externo. 80

Figura 15. Alinhamento de aminoácidos de região *env* do HTLV-2 com 1065 pb usando a ferramenta ClustalW do programa BioEdit 7.0.5.3, 81

mostrando a substituição de Serina para Prolina (S-P) na posição 1909 em relação ao protótipo internacional Mo, nas amostras de Londrina e região (BRLO) e de São Paulo (BRSP).

Figura 16. Subtipo do HTLV-2 gerado pela ferramenta Genotyping-NCBI a partir da sequência da região *tax.* A parte superior do gráfico mostra: **a-)** a sequência da amostra BRLO02-02, com a cor vermelha referente ao seu subtipo (A); e **b-)** a amostra BRLO38-02 com a cor verde referente ao seu subtipo (B), definidos através da comparação com banco de dados de sequências do NCBI. 83

Figura 17. Árvore filogenética *Maximum Likelihood* da região *tax* do HTLV-2 com 1068 pb (posição 7213-8280 em relação ao protótipo internacional Mo) de 43 isolados, incluindo as 25 sequências de Londrina e região e de São Paulo (número de acesso no GenBank JN887712-JN887736) em negrito, construída usando o modelo evolutivo TrN+G, usando o PAUP v4b10. Valores de *bootstrap* acima de 65% e *zero length* com $p<0.001$ (**) e $p\leq0.05$ (*) estão retratados nos ramos. O isolado Efe2 (HTLV-2d) foi usado com grupo externo. 85

Figura 18. Alinhamento de aminoácidos da região *tax* do HTLV-2 com 1068 pb, usando a ferramenta ClustalW do programa BioEdit 7.0.5.3, mostrando as substituições de Treonina para Alanina (T→A) na posição 2607 e de Isoleucina para Valina (I→V) na posição 2609, em 25 e 9, respectivamente, amostras de Londrina e região (BRLO) e de São Paulo (BRSP), em relação ao protótipo internacional Mo. 86

Figura 19. Alinhamento de aminoácidos da região *tax* do HTLV-2, usando a ferramenta ClustalW do programa BioEdit 7.0.5.3, mostrando as substituições de Tirosina para Cisteina (Y→C) na posição 2664, de Glutamato para Glutamina (E→Q) na posição 2685 e de *stop codon* para Glutamina (*stop codon*→Q) na posição 2735, que gerou um ganho de 25 aminoácidos na posição carboxi terminal, em todas amostras de Londrina e região (BRLO) e de São Paulo (BRSP), em relação ao protótipo internacional Mo. 87

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Dados epidemiológicos obtidos dos 54 pacientes infectados pelo HIV-1/Aids e coinfectados pelo HTLV-1 e pelo HTLV-2, provenientes de Centros de Referência e Treinamento em Aids do estado do Paraná e do estado de São Paulo, Brasil. 39

Tabela 2. *Primers* utilizados nos ensaios de PCR e *n*-PCR da região LTR para detecção de DNA proviral do HTLV-1 de pacientes coinfectados pelo HIV-1 de Londrina e região (sul) e de São Paulo (sudeste). 45

Tabela 3. Protocolos dos ensaios de PCR e *n*-PCR da região LTR para a detecção de DNA proviral do HTLV-1 de pacientes coinfectados pelo HIV-1 de Londrina e região (sul) e de São Paulo (sudeste). 45

Tabela 4. *Primers* utilizados nos ensaios de PCR e *n*-PCR da região *env* para detecção de DNA proviral do HTLV-1 de pacientes coinfectados pelo HIV-1 de Londrina e região (sul) e de São Paulo (sudeste). 46

Tabela 5. Protocolos dos ensaios de PCR e *n*-PCR da região *env* para a detecção de DNA proviral do HTLV-1 de pacientes coinfectados pelo HIV-1 de Londrina e região (sul) e de São Paulo (sudeste). 47

Tabela 6. *Primers* utilizados nos ensaios de PCR e *n*-PCR da região *tax* para detecção de DNA proviral do HTLV-1 de pacientes coinfectados pelo HIV-1 de Londrina e região (sul) e de São Paulo (sudeste). 48

Tabela 7. Protocolos dos ensaios de PCR e *n*-PCR da região *tax* para a detecção de DNA proviral do HTLV-1 de pacientes coinfectados pelo HIV-1 de Londrina e região (sul) e de São Paulo (sudeste). 48

Tabela 8. *Primers* utilizados no sequenciamento da região *tax* de DNA proviral do HTLV-1 de pacientes coinfectados pelo HIV-1 de Londrina e região (sul) e de São Paulo (sudeste). 49

Tabela 9. *Primers* utilizados nos ensaios de PCR e *n*-PCR da região LTR para detecção de DNA proviral do HTLV-2 de pacientes coinfectados pelo HIV-1 de Londrina e região (sul) e de São Paulo (sudeste). 50

Tabela 10. Protocolos dos ensaios de PCR e *n*-PCR da região LTR para a detecção de DNA proviral do HTLV-2 de pacientes coinfectados pelo HIV-1 de Londrina e região (sul) e de São Paulo (sudeste). 50

Tabela 11. *Primers* utilizados nos ensaios de PCR e *n*-PCR da região *env* para detecção de DNA proviral do HTLV-2 de pacientes coinfectados pelo HIV-1 de Londrina e região (sul) e de São Paulo (sudeste). 51

Tabela 12. Protocolos dos ensaios de PCR e *n*-PCR da região *env* para a detecção de DNA proviral do HTLV-2 de pacientes coinfectados pelo HIV-1 52

de Londrina e região (sul) e de São Paulo (sudeste).

Tabela 13. *Primers* utilizados nos ensaios de PCR e *n*-PCR da região *env* para detecção de DNA proviral do HTLV-2 de pacientes coinfectados pelo HIV-1 de Londrina e região (sul) e de São Paulo (sudeste). 52

Tabela 14. Protocolos dos ensaios de PCR e *n*-PCR da região *env* para a detecção de DNA proviral do HTLV-2 de pacientes coinfectados pelo HIV-1 de Londrina e região (sul) e de São Paulo (sudeste). 53

Tabela 15. *Primers* utilizados nos ensaios de PCR e *n*-PCR da região *tax* para detecção de DNA proviral do HTLV-2 de pacientes coinfectados pelo HIV-1 de Londrina e região (sul) e de São Paulo (sudeste). 54

Tabela 16. Protocolos dos ensaios de PCR e *n*-PCR da região *tax* para a detecção de DNA proviral do HTLV-2 de pacientes coinfectados pelo HIV-1 de Londrina e região (sul) e de São Paulo (sudeste). 54

Tabela 17. *Primers* utilizados no sequenciamento da região *tax* de DNA proviral do HTLV-2 de pacientes coinfectados pelo HIV-1 de Londrina e região (sul) e de São Paulo (sudeste). 55

Tabela 18. *Primers* adicionais utilizados no sequenciamento da região *tax* de DNA proviral do HTLV-2 de pacientes coinfectados pelo HIV-1 de Londrina e região (sul) e de São Paulo (sudeste). 55

Tabela 19. Comparação das sequências da região tax do HTLV-1, mostrando as substituições de nucleotídeos, as trocas de aminoácidos e suas posições nas 13 amostras provenientes das regiões Sul e Sudeste do Brasil, em relação ao protótipo internacional ATK. 71

Tabela 20. Fragmentos (expressos em número de nucleotídeos) que resultaram da clivagem de produto de PCR de 458 pb da região LTR do HTLV-2 (nt. 181-638) dos isolados de Londrina e região (PR) e de São Paulo (SP). 74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aids *Acquired Immunodeficiency Syndrome* - Síndrome da imunodeficiência adquirida

APH-2 *Antisense protein of HTLV-2* - Proteína anti senso do HTLV-2

ATL *Adult T-cell leukemia/lymphoma* - Leucemia/linfoma de células T do adulto

BLAST *Basic Local Alignment Search Tool*

BRLO Brasil - Londrina

BRSP Brasil - São Paulo

CEP Comitê de Ética em Pesquisa

Ct *Cycle threshold*

CTC Comitê Técnico Científico

DNA *Deoxyribonucleic acid* - Ácido desoxirribonucleico

dNTP Desoxirribonucleotídeos fosfatados

DST(s) Doença(s) sexualmente(s) transmissível(s)

EDTA Ácido etilenodiamino tetra-acético

env Gene do envelope viral

et al E colaboradores

gp21 Glicoproteína 21

gp46 Glicoproteína 46

HAM *HTLV-1 Associated Myelopathy* - Mielopatia associada ao HTLV-1

HBZ *HTLV-1 basic leucine zipper factor*

HIV-1 *Human immundeficiency virus type 1* - Vírus da imunodeficiência humana do tipo 1

HSH Homens que fazem sexo com homens

HTLV *Human T-lymphotropic virus* - Vírus linfotrópico de células T humanas

HTLV-1 *Human T-lymphotropic virus type 1* - Vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 1

HTLV-2 *Human T-lymphotropic virus type 2* - Vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 2

HTLV-3 *Human T-lymphotropic virus type 3* - Vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 3

HTLV-4 *Human T-lymphotropic virus type 4* - Vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 4

IAL Instituto Adolfo Lutz

IFN *Interferon*

Kit Conjunto de reagentes

LTR	*Long Terminal Repeat* - Região terminal de longa repetição
MEGA	*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*
$MgCl_2$	Cloreto de magnésio
min	Minuto
mL	Mililitro
ML	*Maximum Likelihood* - Máxima verossimilhança
mM	Milimolar
n	Número de amostras
***n*-PCR**	*nested*-PCR (reação em cadeia da polimerase)
NCBI	*National Center for Biotechnology Information*
ng	Nanograma
nt.	Nucleotídeos
NJ	*Neighbor Joining*
Nº	Número
p	Nível de significância estatística
pb	Pares de bases
pmol/µL	Picomol por microlitro
PBL	*Peripheral blood leucocytes* - Leucócitos do sangue periférico
PCR	*Polymerase chain reaction* - Reação em cadeia da polimerase
pH	Concentração hidrogênio-iônica
pol	Gene da polimerase
RFLP	*Restriction Fragments Length Polymorphism* - Polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição
RNA	*Ribonucleic acid* - Ácido ribonucléico
SP	São Paulo
Tº	Temperatura
tax	Gene regulador de transativação
Tax	Fosfoproteína transativadora
TBE	Tris/Borato/EDTA
T CD4+	Linfócito T auxiliador, classe de diferenciação 4
T CD8+	Linfócito T citotóxico, classe de diferenciação 8
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TRE	*Tax responsive elements*
TSP	*Tropical Spastic Paraparesis* - Paraparesia Espástica Tropical

U	Unidades internacionais
USP	Universidade de São Paulo
UDEV	Usuários de drogas endovenosas
U/µL	Unidades por microlitro
ºC	Graus Celsius
µL	Microlitro
3´	Região carboxi-terminal do ácido nucléico
5´	Região amino-terminal do ácido nucléico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 22
1.1 Histórico 22
1.2 Manifestações clínicas 22
1.3 Vias de transmissão 22
1.4 Epidemiologia 24
1.5 Genoma 26
1.6 Subtipos virais 28
1.7 Características moleculares: LTR, *env* e *tax* 29
1.8 Coinfecção HIV/HTLV-1 e HIV/HTLV-2 31

2 JUSTIFICATIVA 34

3 OBJETIVOS 36
3.1 Objetivo Geral 36
3.2 Objetivos Específicos 36

4 CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS 38
4.1 Casuística 38
4.1.1 Metodologia de estudo 41
4.1.2 Aspectos éticos 42
4.2 Material 42
4.2.1 Amostras 42
4.2.2 Material necessário 42
4.3 Métodos 43
4.3.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR) e *nested*-PCR (*n*-PCR) 43
4.3.1.1 HTLV-1 – LTR 44
4.3.1.2 HTLV-1 – *env* 46
4.3.1.3 HTLV-1 – *tax* 47
4.3.1.4 HTLV-2 – LTR 49
4.3.1.5 HTLV-2 – *env* 51

4.3.1.6 HTLV-2 – *tax* 53
4.3.2 Tipagem e subtipagem viral por RFLP (polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição) para região LTR do HTLV-2 56
4.3.3 Detecção e purificação de produtos da PCR para sequenciamento 56
4.3.4 Reação de sequenciamento 57
4.3.5 Purificação da reação de sequenciamento 57
4.3.6 Análise molecular: Edição, Análise de subtipos do HTLV e Análises filogenéticas 58
4.3.6.1 Edição 58
4.3.6.2 Análise de subtipos do HTLV 58
4.3.6.3 Análise filogenética 59
4.3.6.4 Análise de mutações 60
4.3.6.5 Análise de similaridade de nucleotídeos 60

5 RESULTADOS 62
5.1 HTLV-1 62
5.1.1 HTLV-1 - LTR 62
5.1.2 HTLV-1 - *env* 64
5.1.3 HTLV-1 - *tax* 67
5.2 HTLV-2 72
5.2.1 HTLV-2 - LTR 72
5.2.2 HTLV-2 - *env* 78
5.2.3 HTLV-2 - *tax* 82

6 DISCUSSÃO 89

7 CONCLUSÕES 99

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 101

ANEXOS 121
Anexo A - Carta de concordância em participar da pesquisa e utilizar o 121

material biológico.

Anexo B - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. 122

Anexo C - Aprovação das modificações no projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. 124

Anexo D - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz. 125

Anexo E - Aprovação do Conselho Técnico Científico do Instituto Adolfo Lutz. 126

Anexo F. Bases degeneradas e seus respectivos símbolos, utilizados para otimização de alguns dos *primers* do presente estudo. 127

Anexo G - Resumo publicado em revista internacional: MAGRI *et al*., *Retrovirology*, v.8, n.1, p.A68, 2011. 128

Anexo H - Artigo publicado: MAGRI *et al., AIDS Research and Human Retroviruses,* v.28, p.110-114, 2012a. 129

Anexo I - Artigo publicado: MAGRI *et al*., *Virology Journal*, v.9, p.184, 2012c. 134

Anexo J - Artigo publicado: MAGRI *et al*., *AIDS Research and Human Retroviruses*, v.28, n.12, p.1775-1778, 2012b. 137

Anexo K - Número dos isolados de pacientes coinfectados pelo HIV-1 de Londrina e região (sul) e de São Paulo (sudeste) no Brasil, e seus respectivos números de acesso no GenBank para as regiões LTR, *env* e *tax* do genoma proviral do HTLV-1. 141

Anexo L - Artigo publicado: MAGRI *et al*., *AIDS Research and Human Retroviruses*, v.26, p.1327-1331, 2010. 142

Anexo M - Artigo publicado: MAGRI *et al*., *Aids Research and Human Retroviruses*, v.29, p.1010-1018, 2013. 147

Anexo N - Número dos isolados de pacientes coinfectados pelo HIV-1 de Londrina e região (sul) e de São Paulo (sudeste) no Brasil, e seus respectivos números de acesso no GenBank para as regiões LTR, *env* e *tax* do genoma proviral do HTLV-2. 157

Anexo O - Mapa das migrações humanas baseado em análises de DNA 159

mitocondrial humano (a) e Mapa da disperão de HTLV-1 pelo mundo (b).
Anexo P - Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado. 160
Anexo Q - Ficha do aluno (histórico escolar de pós-graduação). 161
Anexo R - *Curriculum* Lattes 163

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

Os vírus linfotrópicos de células T humanas dos tipos 1 e 2 (HTLV-1 e HTLV-2) pertencem à família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae,* gênero *Deltaretrovirus*, sendo o HTLV-1 o primeiro retrovírus humano descrito. Os retrovírus são vírus RNA que usam a enzima transcriptase reversa para produzir DNA a partir de RNA. O DNA é posteriormente incorporado no genoma da célula hospedeira com o auxílio da integrase viral, passando a ser chamado de provírus (HALL *et al*., 1994; PROIETTI, 2010). O HTLV possui essa designação, pois infecta predominantemente os linfócitos T, sendo que o HTLV-1 infecta preferencialmente os linfócitos T CD4+, enquanto que o HTLV-2 os linfócitos T CD8+. Porém, também podem ser encontrados em outros tipos celulares como os monócitos, linfócitos B, células dendríticas e endoteliais, e macrófagos (ROSENBLATT *et al*., 1988; HALL *et al*., 1994; FRANCHINI, 1995).

O HTLV-1 foi descrito pela primeira vez em 1980, isolado a partir de cultura de células do sangue periférico de pacientes com linfoma cutâneo de células T (POIESZ *et al*., 1980). Desde então, vários estudos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais vem sendo realizados e estima-se que cerca de 10-20 milhões de pessoas em todo o mundo estejam infectadas por este vírus (PROIETTI *et al*., 2005). Já o HTLV-2 foi descrito pela primeira vez em 1982, isolado a partir de cultura de células do baço de paciente com tricoleucemia de células T (KALYANARAMAN *et al*., 1982).

Recentemente, foram descritos o HTLV-3 e o HTLV-4, isolados em indivíduos sem doenças específicas de Camarões na África Central (CALATTINI *et al*., 2005; WOLFE *et al*., 2005; SWITZER *et al*., 2009).

1.2 Manifestações clínicas

O HTLV-1 é mais patogênico do que o HTLV-2, embora a maioria dos indivíduos infectados permaneça assintomático, esta infecção pode causar amplo espectro de doenças, incluindo leucemia (leucemia/linfoma de células T do adulto,

ATL), que foi confirmada pela primeira vez em 1982 no Japão por YOSHIDA e colaboradores, e doenças neurodegenerativas lentas e progressivas (mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical, HAM/TSP) (GESSAIN *et al*., 1985), além de outras dermatológicas, reumáticas, oftalmológicas e pulmonares (SOARES & MORAES JUNIOR, 2000; PROIETTI *et al*., 2005; BITTENCOURT *et al*., 2006; CARVALHO *et al*., 2006).

Alguns fatores têm sido apontados como importantes para o desenvolvimento e/ou agravamento da HAM/TSP, como por exemplo, alta carga proviral (NAGAI *et al*., 1998; MONTANHEIRO *et al*., 2005) e alta expressão de alguns genes do HTLV-1 (YAMANO *et al*., 2002). Recentemente, o padrão de integração do provírus do HTLV-1 no genoma da célula hospedeira (MEEKINGS *et al*., 2008) e a expressão de um subconjunto específico de genes IFN-estimulados (TATTERMUSCH *et al*., 2012), além de fatores do hospedeiro, como os polimorfismos em genes relacionados à produção de interleucina (GADELHA *et al*., 2008) foram também considerados associados ao desenvolvimento de HAM/TSP. Porém, o manejo clínico dos pacientes com HAM/TSP ainda é insatisfatório e o tratamento atual disponível é apenas paliativo (TATTERMUSCH *et al*., 2012).

O HTLV-2 embora menos associado a doenças, tem sido apontado como responsável por manifestações neurológicas (HALL *et al*., 1994; ORLAND *et al*., 2003; ROUCOUX & MURPHY, 2004; POSADA-VERGARA *et al*., 2006). Ainda, parece causar predisposição a infecções bacterianas e também a manifestações dermatológicas (MURPHY, 1996), e pode estar associado a aumento de mortalidade por câncer, segundo estudo multicêntrico nos Estados Unidos com uma coorte acompanhada por 15,9 anos composta por 155 indivíduos infectados pelo HTLV-1, 387 indivíduos infectados pelo HTLV-2 e 799 indivíduos HTLV-soronegativos (BISWAS *et al*., 2010).

1.3 Vias de transmissão

O HTLV-1 e o HTLV-2 possuem padrões de transmissão semelhantes, embora a eficiência de transmissão do HTLV-2 ainda seja incerta. A transmissão acontece pelo contato célula-célula, enquanto que a transmissão por vírus livres, aparentemente, não é eficiente. Esses dois retrovírus podem ser transmitidos da

mãe para o filho pelo aleitamento materno (considerado atualmente a principal via de transmissão) ou raramente no parto, pelo contato sexual, e pelo contato direto com sangue contaminado, seja pelo uso de drogas endovenosas (UDEV) (reutilização de seringas) ou por transfusão sanguínea (OKOCHI, 1984; MANNS *et al*., 1992; BITTENCOURT, 1998; LI *et al*., 2004; ROUCOUX & MURPHY, 2004; ZUNT *et al*., 2006). A transfusão de sangue é muito eficaz na transmissão do HTLV-1 e do HTLV-2, e por isso, a sorologia para estes vírus tornou-se obrigatória em Bancos de Sangue do Brasil em 1993 pela portaria nº 1.376 do Ministério da Saúde (BRASIL, 1993). Ainda, existem relatos de transmissão do HTLV-1 pelo transplante de rim, fígado e pulmão (YARA *et al*., 2009).

As vias de transmissão do HTLV-2 também dependem da população analisada. A relação sexual e o aleitamento materno são as principais formas de transmissão entre os ameríndios e a população em geral do Brasil (ISHAK *et al*., 2003; CATALAN-SOARES *et al*., 2005). Nos UDEV a transmissão da infecção pelo HTLV-2 se dá principalmente pelo compartilhamento de agulhas com indivíduos infectados (GABBAI *et al*., 1993; DE-ARAUJO *et al*., 1994; ETZEL *et al*., 2001; MORIMOTO *et al*., 2005).

1.4 Epidemiologia

A prevalência da infecção pelo HTLV varia de acordo com a população estudada, a região geográfica e comportamento de risco. Na América do Sul, varia de 0,1% a 5% na população geral (CARNEIRO-PROIETTI *et al*., 2002). O Brasil desponta como o primeiro em número de indivíduos infectados pelo HTLV no mundo, estimado em 2,5 milhões (CATALAN-SOARES *et al*., 2005; PROIETTI, 2010). Trabalho recente de revisão relata que no Brasil há entre 300.000 a 800.000 indivíduos infectados pelo HTLV-1 (GESSAIN & CASSAR, 2012).

Em todo o mundo existe entre 15 a 20 milhões de pessoas infectadas pelo HTLV-1/2, e o sudoeste do Japão, Caribe, algumas regiões da África e América do Sul são consideradas regiões endêmicas (EDLICH *et al*., 2000; PROIETTI *et al*., 2005). Um trabalho recente de revisão estimou uma prevalência entre 5 a 10 milhões de indivíduos infectados pelo HTLV-1. No entanto, os autores ressaltaram que este valor pode estar subestimado uma vez que a maioria dos estudos foram

conduzidos apenas em áreas endêmicas e/ou em doadores de sangue, mulheres grávidas e indivíduos de comportamento de risco (GESSAIN & CASSAR, 2012). No Brasil, a infecção pelo HTLV-1 é mais frequente no norte e nordeste do país, e isto pode ser consequência do tráfico de escravos durante os séculos XVII, XVIII e XIX (GALVÃO-CASTRO *et al*., 1997; DOURADO *et al*., 2003; MOTA-MIRANDA *et al*., 2008). Os estados onde são observadas as maiores prevalências são Bahia, Pernambuco, Pará e Maranhão, variando de 7,5/1000 a 10,0/1000 doadores de sangue (CATALAN-SOARES *et al*., 2005). A coinfecção HIV/HTLV-1 é mais frequente do que a coinfecção HIV/HTLV-2 na região nordeste do Brasil (ALCANTARA *et al*., 2006).

Já o HTLV-2 parece ser endêmico de povos antigos, tanto na África quanto nas Américas, e epidêmico entre UDEV em áreas urbanas da América do Norte, Europa e sudeste Asiático (HALL *et al*., 1996; MURPHY *et al*., 1998). No Brasil, o HTLV-2 tem sido considerado endêmico em populações indígenas da Amazônia (BLACK *et al*., 1994; ISHAK *et al*., 2003) e, recentemente, na região sul (MENNA-BARRETO *et al*., 2005). O HTLV-2 tem sido detectado em baixas frequências na população em geral como doadores de sangue (GABBAI *et al*., 1993; CATALAN-SOARES *et al*., 2005; NAMEN-LOPES *et al*., 2009), e em altas frequências em pacientes com HIV/Aids e UDEV, principalmente do sudeste e sul do país (DE-ARAUJO *et al*., 1994; ETZEL *et al*., 2001; MORIMOTO *et al*., 2005). Portanto, no Brasil, a infecção pelo HTLV-2 é endêmica no norte e epidêmica no sul.

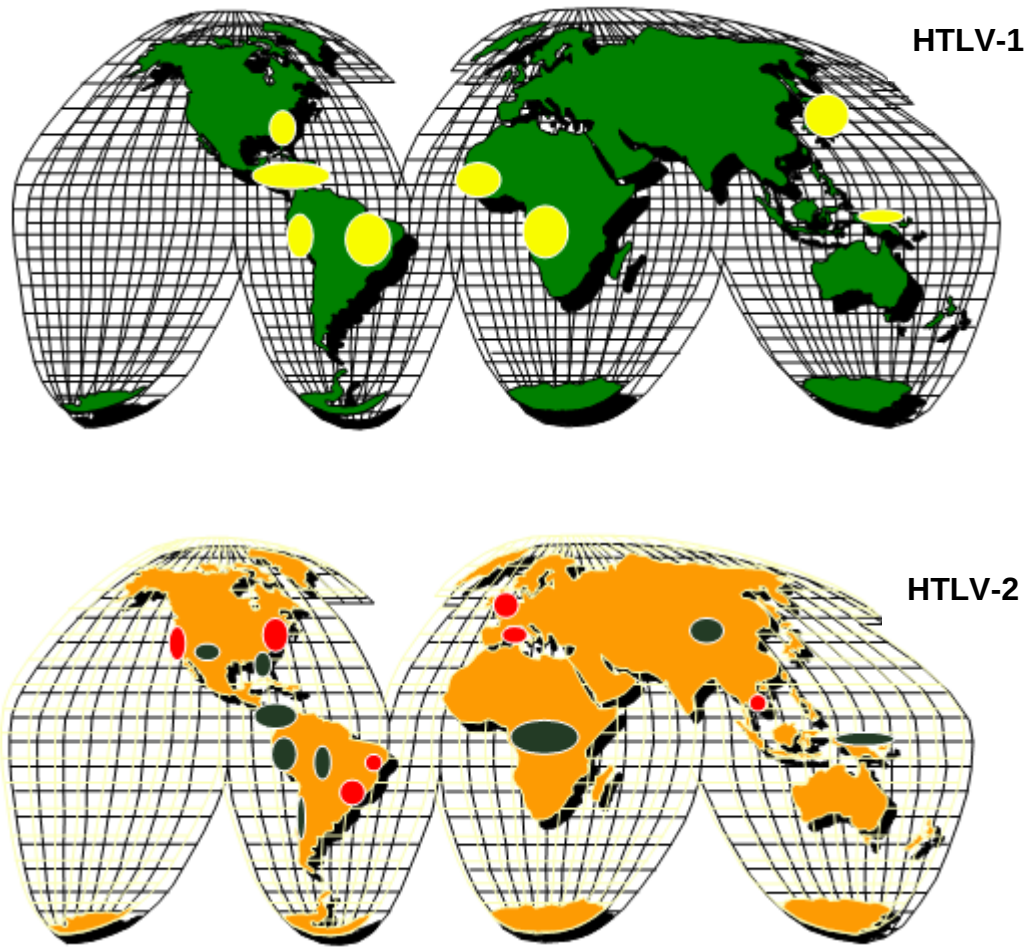


Figura 1. Distribuição geográfica de HTLV-1 e HTLV-2 no mundo.

Fonte: BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids, 2003.

1.5 Genoma

O HTLV-1 e o HTLV-2 possuem uma variabilidade genética de cerca de apenas 4% (SEGURADO *et al*., 2002; TAYLOR, 2004; PROIETTI *et al*., 2005). Isto pode ser explicado pelo fato de que a replicação do HTLV, diferentemente dos outros retrovírus, é principalmente por meio da expansão clonal das células que estão infectadas, via mitose, e não tanto pelo uso da enzima transcriptase reversa (WATTEL *et al.,* 1995). O genoma completo do HTLV-1 possui 9032 pb (SEIKI *et al*., 1983) e o do HTLV-2 possui 8952 pb (SHIMOTOHNO *et al*., 1985), ambos compostos por duas fitas simples de RNA.

O genoma proviral do HTLV-1/2 contém os genes estruturais *gag* e *env*, o gene funcional *pol*, os genes reguladores *tax e rex* na região *pX*, e os genes reguladores transcritos no sentido anti senso que codificam as proteínas HBZ no HTLV-1 (**Figura 2**) e APH-2 no HTLV-2, e nas extremidades contém a região terminal de longa repetição (LTR 5' e 3'), importante na integração do DNA proviral ao DNA da célula hospedeira e na regulação transcricional do seu genoma (SHIMOTOHNO *et al*., 1985; HALIN *et al*., 2009; PROIETTI, 2010; LAIRMORE *et al*., 2011). Ainda, na extremidade 5' da LTR do HTLV-1 existe um promotor viral que contém três regiões repetitivas de 21 pb chamadas de *Tax-responsive elements* (TRE-1, TRE-2 e TRE-3), numeradas no sentido anti senso a partir do *start site* de transcrição do RNA viral. A presença de substituições de nucleotídeos nestas regiões que indiretamente interagem com a proteína Tax pode estar associada com bloqueio ou ativação da proliferação viral (FELBER *et al*., 1985; NYBORG *et al*., 1988; NETO *et al*., 2011).

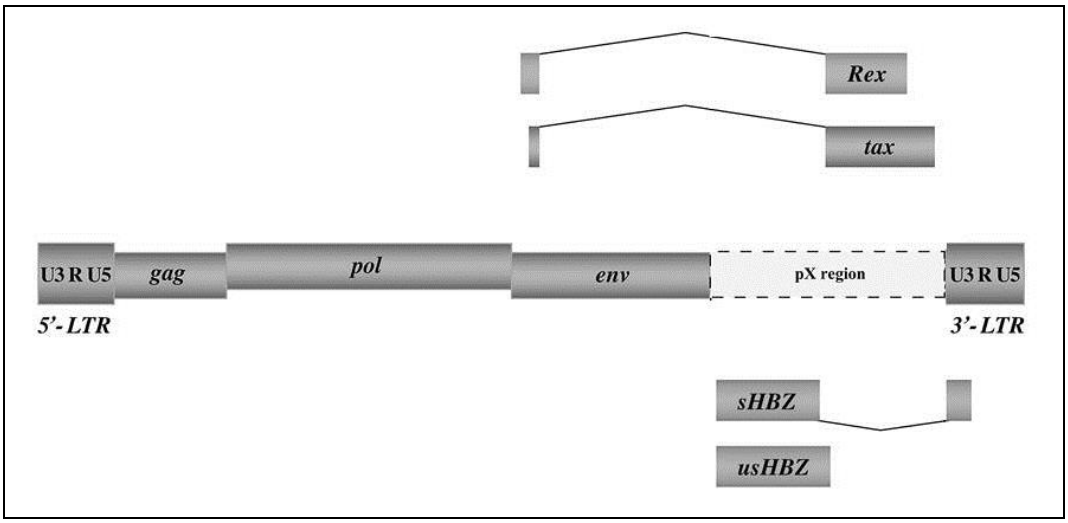


Figura 2. Representação esquemática do genoma do HTLV-1.
Fonte: Adaptado de SATOU & MATSUOKA, 2010.

O gene *env* codifica as proteínas do envelope viral (proteína de superfície - gp46 e proteína transmembrana - gp21), que são imunogênicas e, portanto, importantes para a resposta celular e humoral (TANAKA *et al*., 1994; WILSON *et al*.,

2001; TAYLOR, 2004).

A região *pX* participa da transcrição viral codificando as proteínas reguladoras Tax, Rex, e as proteínas acessórias p12, p13 e p30. Essas proteínas são importantes para a infectividade viral, proliferação e imortalização das células, e ainda, podem influenciar a patogênese. As oncoproteínas Tax-1 e Tax-2 estão presentes, respectivamente, no HTLV-1 e HTLV-2, porém a Tax-1 tem demonstrado possuir uma atividade de transativação elevada para a LTR viral maior do que a Tax-2 (FEUER & GREEN, 2005; LAIRMORE *et al*., 2011). Ainda, a Tax-1 possui um domínio regulatório, o domínio PDZ, que contém proteínas regulatórias essenciais para o recrutamento e organização de proteínas que estão envolvidas na sinalização celular e comunicação polarizada entre as celúlas (MATSUOKA, *et al*. 2007; HIGUCHI & FUJII, 2009). A proteína Tax pode interferir com a diferenciação celular, o acúmulo de mutações e a prevenção da apoptose (YOSHIDA, 2001).

Nos últimos anos foi descrito um outro gene na região *pX* do genoma do HTLV-1 denominado de *HBZ* (HTLV-1 *basic leucine zipper factor*) que é transcrito no sentido anti senso e que parece ter um papel muito importante na patogênese do HTLV-1 (SATOU *et al.*, 2006; MATSUOKA & JEANG, 2007; HIGUCHI & FUJII, 2009). Já em relação ao HTLV-2, no ano de 2009 foi descrito um gene similar ao *HBZ* do HTLV-1, responsável pela produção da APH-2 (proteína anti senso do HTLV-2) (HALIN *et al*., 2009).

1.6 Subtipos virais

A distribuição dos subtipos de HTLV-1 e de HTLV-2 é distinta. Os subtipos do HTLV-1 estão associados com regiões geográficas específicas do globo, enquanto que os subtipos do HTLV-2 são mais relacionados com subpopulações específicas, como os índios da Amazônia brasileira e UDEV.

São conhecidos sete subtipos do HTLV-1, e cada um é considerado endêmico para uma região geográfica (MIURA *et al*., 1994; URETA-VIDAL *et al*., 1994; SALEMI *et al*., 1998a; VAN DOOREN *et al*., 2001; PROIETTI *et al.*, 2005):

- ✓ Subtipo HTLV-1a: cosmopolita;
- ✓ Subtipos HTLV-1b, HTLV-1d, HTLV-1e, HTLV-1f, HTLV-1g: África Central;
- ✓ Subtipo HTLV-1c: Melanésia/Austrália.

O subtipo mais frequente em circulação no mundo é o HTLV-1a (Cosmopolita) (CARNEIRO-PROIETTI *et al*., 2002).

O HTLV-2 é classificado em quatro subtipos, cada um tem sido associado com subpopulações específicas e com região geográfica (ISHAK *et al.*, 1995; EIRAKU *et al*., 1996; SLATTERY *et al.*, 1999; VANDAMME *et al.*, 1998):

- ✓ Subtipos HTLV-2a e HTLV-2b: Europa e América, e distribuição esporádica na Ásia e África; em UDEV de áreas urbanas e populações indígenas das Américas;
- ✓ Subtipo HTLV-2c: população indígena da Amazônia brasileira e populações urbanas do Brasil;
- ✓ Subtipo HTLV-2d: tribo de pigmeus na Africa.

1.7 Características moleculares: LTR, *env* e *tax*

Os segmentos genômicos do HTLV-1/2 que apresentam maior variabilidade são o LTR e o *env*, e são considerados os que melhor se prestam para estudos epidemiológicos e de caracterização molecular. O HTLV-1 tem um genoma conservado, com 0,1% a 6,9% de diversidade genética entre os isolados, e as regiões *env* e LTR são as mais usadas para a caracterização do subtipo viral (RATNER *et al*.,1991; MAGRI *et al*., 2012a). Estudos da região *env* e LTR do HTLV-2 tem se mostrado importantes (SWITZER *et al*.,1995; COVAS & KASHIMA, 2003; MAGRI *et al*., 2010, 2013), com uma variabilidade no *env* de 4,3% segundo TAKAHASHI e colaboradores, 1993.

No Brasil, a maioria dos estudos relacionados à caracterização molecular do HTLV-1 são conduzidos com pacientes que apresentam ATL e HAM/TSP e com doadores de sangue assintomáticos. Estudos em relação ao HTLV-1 em pacientes coinfectados pelo HIV são limitados, porém tem sido descrito que o principal subtipo que circula nesses indivíduos é o HTLV-1a (YAMASHITA *et al*., 1999; LAURENTINO *et al*., 2005; ALCANTARA *et al*., 2006; KASHIMA *et al*., 2006; REGO *et al*., 2010). Os trabalhos relacionados à caracterização molecular do HTLV-2 são conduzidos principalmente com populações de ameríndios e UDEV (CATERINO-DE-ARAUJO *et al*., 2000; SHINDO *et al*., 2002; ISHAK *et al*., 2003; ALCANTARA *et al*., 2003;

RENNER *et al*., 2006; NOVOA *et al*., 2007).

Recentemente, foram descritas mutações pontuais nos TRE-1 e TRE-2 na região LTR 5' do HTLV-1 (NETO *et al*., 2011; MAGRI *et al*., 2012c). Estas regiões são sítios de interação da proteína Tax e sua integridade se faz importante para a proliferação viral (FELBER *et al*., 1985; NYBORG *et al*., 1988).

O gene *tax* do HTLV-1/2 pode divergir entre os isolados por diferenças de nucleotídeos e tamanho da proteína Tax codificada, portanto, esta região pode ser útil para análises moleculares e epidemiológicas. O gene *tax* de HTLV-1 foi classificado em dois genótipos, *tax*A e *tax*B. Houve uma tentativa de se associar genótipo de *tax* e doença clínica, mas os resultados são controversos (FURUKAWA *et al*., 2000; CASSEB *et al*., 2006). Os genótipos *tax*A e *tax*B do HTLV-1 parecem ser mais relacionados com região geográfica. Trabalhos conduzidos no Brasil mostram a presença da *tax*A e uma assinatura molecular com cinco substituições de nucleotídeos: C7401T, T7914C, C7920T, C7982T, e G8231A em relação ao protótipo internacional ATK (KASHIMA *et al*., 2006; CASSEB *et al*., 2006).

A proteína Tax do HTLV-1 é o antígeno alvo dominante para a resposta de linfócitos T citotóxicos e tem a capacidade de ativar genes de citocinas levando ao processo inflamatório (KANNAGI *et al*., 1992; HIGUCHI & FUJII, 2009). Na ATL, a Tax, leva a leucogenese e imortalização de linfócitos T *in vitro* (BOXUS *et al*., 2008). Porém, a expressão do gene *tax* nem sempre é encontrada nas células de ATL (TAKEDA *et al*., 2004). Alguns investigadores mostraram que a diversidade genética da *tax* do HTLV-1 é maior em portadores assintomáticos do que nos pacientes com HAM/TSP (IÑIGUEZ *et al*., 2010). Outros acreditam que o aumento da expressão da Tax pode ser mais relevante na progressão da HAM/TSP do que a carga proviral, isto implica na adequação de terapia que deveria ser realizada para reduzir a expressão da proteína Tax em vez da redução da carga proviral (ASQUITH *et al*., 2005).

A hipótese de que a diferença na patogênese do HTLV-1 e do HTLV-2 é atribuída somente às propriedades da proteína Tax pode ser questionável. Acredita-se que ao contrário das proteínas virais Tax-1 e Tax-2, tanto o HBZ quanto a APH-2 são expressos de forma constitutiva nas células infectadas, portanto, podendo desempenhar papéis importantes na patogénese destes vírus (MARBAN *et al*., 2012). Estudos recentes mostram que o gene *HBZ* tem papel na proliferação maligna de células na ATL (HIGUCHI & FUJII, 2009). Isso pode ser correlacionado

com o aumento da patogênese do HTLV-1 (MATSUOKA & JEANG, 2007). Em relação ao potencial patogênico do HTLV-2, foi demonstrado, recentemente, que a APH-2 atua como um inibidor da ativação mediada pela Tax-2 e não promove a proliferação das células (DOUCERON *et al*., 2012; MARBAN *et al*., 2012).

O gene *tax* do HTLV-2 pode divergir entre os isolados por diferenças de nucleotídeos e tamanho da proteína Tax codificada, que é classificada em quatro genótipos Tax-2a (331 aa), Tax-2b (356 aa), Tax-2c (356 aa) e Tax-2d (344 aa), associados com subpopulações específicas e com região geográfica, assim como os quatro subtipos virais do HTLV-2 (LEWIS *et al*., 2002; MAGRI *et al*., 2013). No Brasil, um único subtipo do HTLV-2 foi detectado entre os UDEV e ameríndios; este subtipo possui uma proteína Tax transativadora longa semelhante ao HTLV-2b, e as regiões genomicas do LTR e *env* semelhantes ao HTLV-2a. Por isso, este subtipo do HTLV-2 foi tentativamente denominado HTLV-2c (ISHAK *et al*., 2003). Porém, sequências completas de nucleotídeos de vários genomas demonstraram que as cepas brasileiras do HTLV-2 são variantes moleculares do subtipo HTLV-2a (LEWIS *et al*., 2000; SHINDO *et al*., 2002; COVAS & KASHIMA, 2003). O subtipo HTLV-2b, embora endêmico em ameríndios da América Central, Colômbia, Venezuela, Chile e Argentina, só recentemente foi detectado no Brasil entre doadores de sangue da região sul (RENNER *et al*., 2006), e em UDEV infectados com HIV do sudeste (NOVOA *et al*., 2007).

1.8 Coinfecção HIV/HTLV-1 e HIV/HTLV-2

Pelo fato do Brasil ser considerado o país com o maior número absoluto de indivíduos infectados pelos HTLV-1/2 (CATALAN-SOARES *et al*., 2005; PROIETTI, 2010), e ser considerado epidêmico para o HIV/Aids, com uma taxa de prevalência de 0,3 - 0,6% (UNAIDS, 2010), e por esses vírus, HIV e HTLV-1/2, compartilharem as mesmas vias de transmissão viral (LOPES & PROIETTI, 2008), um número elevado de indivíduos coinfectados pelo HIV/HTLV-1/2 têm sido descrito no Brasil. No estado da Bahia, considerado área endêmica para a infecção pelo HTLV-1 com uma prevalência de 1,8% na população em geral (DOURADO *et al*., 2003), a prevalência do HTLV-1/2 em pacientes infectados pelo HIV foi estimada em 21,1% (BRITES *et al*., 2011), e no norte do estado do Paraná, em 6,4% (MORIMOTO *et al*., 2005). Estudo conduzido no estado de São Paulo encontrou prevalência de infecção

pelos HTLV1/2 de 1,5% em indivíduos com HIV-assintomáticos e de 14% em pacientes com HIV/Aids (CASSEB *et al*., 1997).

Acredita-se que a coinfecção com o HIV pode alterar o curso das doenças associadas (BEILKE, 2012). Especula-se que a infecção pelo HTLV-1 talvez facilite a infecção pelo HIV e, também, que ambos os retrovírus poderiam infectar a mesma célula, e o resultado disso poderia ser prejudicial para o sistema imune, levando a uma progressão mais rápida para a Aids. Até o momento, alguns estudos relataram maior número de células T CD4+ em pacientes coinfectados, e indicam que tal fato pode induzir o erro de alguns médicos na escolha do momento mais adequado para iniciar a terapia antirretroviral ou mesmo na profilaxia de infecções oportunistas (SCHECHTER *et al*., 1994; BRITES *et al*., 2001; COLLINS *et al*., 2009). Em relação à coinfecção HIV/HTLV-2 nenhuma evidência mostrou que pode haver uma rápida progressão para a Aids, pelo contrário, essa coinfecção pode gerar alguns efeitos protetores com base em estudos *in vitro* (BRITES *et al*., 2009; BARRIOS *et al*., 2013). Pode ocorrer uma evolução lenta para Aids, provavelmente devido à produção de quimiocinas que interferem com os correceptores CCR5, obstruindo a entrada do HIV na célula (BEILKE *et al*., 2004; BAGHERI *et al*., 2008; CATERINO-DE-ARAUJO, 2009; BARRIOS *et al*., 2013). Recentemente foi demonstrada maior capacidade da Tax-2 em comparação com a Tax-1 de inibir a replicação viral do HIV-1 *in vitro* (BARRIOS *et al*., 2013). Porém, existem estudos que relataram manifestações neurológicas e linfoproliferativas, na coinfecção HIV/HTLV-2, em UDEV (DOONEIEF *et al*., 1996).

Justificativa

2 JUSTIFICATIVA

Pelo exposto, verifica-se que existem lacunas no conhecimento relacionado aos aspectos epidemiológicos das infecções pelos HTLV-1 e HTLV-2 no Brasil. Além disso, as consequencias da coinfecção HIV/HTLV-1/2 no curso clínico das doenças associadas ainda são controversas, e a influência das características moleculares de ambos os vírus na evolução clínica do indivíduo coinfectado é desconhecida.

Faz-ze importante um maior entendimento das características moleculares e epidemiológicas associadas à infecção pelo HTLV-1 e pelo HTLV-2 para estabelecer quais subtipos circulam na população coinfectada pelo HIV-1 e para buscar por mutações e assinaturas moleculares dos vírus que circulam no Brasil. Desta forma poder-se-a debater sobre rotas e vias de dissiminação desses vírus no país.

Portanto, o presente estudo foi conduzido para adicionar informações sobre os isolados de HTLV-1 e de HTLV-2 que circulam em pacientes coinfectados pelo HIV-1 das regiões sul e sudeste do Brasil, incluindo a análise molecular de três regiões do genoma proviral: LTR, *env* e *tax*. Este estudo se justifica ainda pelo fato do Brasil ser o país com maior número de indivíduos infectados pelos HTLV-1/2 no mundo e por ter um número elevado de indivíduos infectados pelo HIV.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Realizar estudo de epidemiologia molecular de HTLV-1 e HTLV-2 em pacientes coinfectados pelo HIV-1 de Londrina e região e de São Paulo.

3.2 Objetivos específicos

- Sequenciar as regiões LTR, *env* e *tax* do genoma proviral do HTLV-1 e do HTLV-2 de amostras de sangue obtidas de pacientes coinfectados pelo HIV-1 de Londrina e região e de São Paulo.

- Determinar os subtipos virais usando ferramentas disponíveis na internet.

- Realizar análises filogenéticas, a fim de confirmar os subtipos que circulam nessas regiões geográficas, analisar a presença de *clusters* e de possíveis relações evolutivas.

- Buscar presença de mutações no genoma proviral do HTLV-1 e do HTLV-2.

- Realizar análises de similaridade genética entre as sequências obtidas e compará-las com os protótipos internacionais.

Casuística, Material e Métodos

4 CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Casuística

As amostras de DNA analisadas no presente estudo foram de conveniência, obtidas de estudo anterior, onde dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais dos pacientes eram conhecidos (MORIMOTO, 2003) e amostras de rotina diagnóstica de infecção por HTLV-1/2 onde apenas dados sobre idade, sexo e local de encaminhamento da amostra eram conhecidos. Todas estas amostras de DNA foram extraídas a partir de células do sangue periférico para a realização de pesquisa de segmentos do genoma proviral do HTLV-1 e 2.

O estudo compreendeu 34 amostras de DNA obtidas de pacientes infectados pelo HIV-1/Aids, sendo 23 homens e 11 mulheres, faixa etária 23 a 56 anos (média de 36,1 anos), provenientes de Centros de Referência e Treinamento em Aids de Londrina e região (designadas BRLO) e que resultaram coinfectadas pelo HTLV-1 (sete casos) e HTLV-2 (28 casos). Um caso é triplo infectado: HIV/HTLV-1/HTLV-2.

Ainda, foram analisadas 20 amostras de DNA de pacientes infectados pelo HIV-1/Aids, sendo 11 homens e nove mulheres, faixa etária 27 a 62 anos (média de 41,1 anos), provenientes de Centros de Referência e Treinamento em Aids de São Paulo (designadas BRSP), da rotina diagnóstica de infecção pelo HTLV do Centro de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo (IAL), (10 casos de infecção por HTLV-1 e 10 casos de infecção por HTLV-2).

As características dos 54 pacientes infectados pelo HIV-1/Aids coinfectados pelo HTLV-1 e/ou HTLV-2, assintomáticos para infecção por HTLV-1, cujos DNA foram analisados no presente estudo são descritas na **Tabela 1**.

Tabela 1. Dados epidemiológicos obtidos dos 54 pacientes infectados pelo HIV-1/Aids e coinfectados pelo HTLV-1 e pelo HTLV-2, provenientes de Centros de Referência e Treinamento em Aids do estado do Paraná e do estado de São Paulo, Brasil.

Código do paciente	Sexo	Idade (anos)	Localidade (cidade – estado)	Comportamento de risco
HTLV-1				
BRLO14-02	M	39	Londrina – PR	Sexual
BRLO15-02	M	34	Londrina – PR	UDEV
BRLO30-02	F	44	Londrina – PR	Sexual
BRLO34-02	M	23	Londrina – PR	Hemofílico
BRLO37-02*	M	46	Londrina – PR	Sexual + UDEV
BRLO47-02	M	34	Londrina – PR	UDEV
BRLO48-02	M	42	Londrina – PR	Sexual + UDEV
BRSP134-08	M	45	São Paulo – SP	Desconhecido
BRSP145-08	M	50	São Paulo – SP	Desconhecido
BRSP206-08	F	42	São Paulo – SP	Desconhecido
BRSP232-08	F	56	São Paulo – SP	Desconhecido
BRSP42-09	F	55	Jundiaí – SP	Desconhecido
BRSP205-09	F	27	São Paulo – SP	Desconhecido
BRSP320-09	F	51	São Paulo – SP	Desconhecido
BRSP414-09	M	62	Jundiaí – SP	Desconhecido
BRSP425-09	F	57	São Paulo – SP	Desconhecido
BRSP01-10	F	32	São Paulo – SP	Desconhecido
HTLV-2				
BRLO02-02	F	26	Londrina – PR	UDEV
BRLO03-02	F	39	Londrina – PR	Sexual
BRLO05-02	M	56	Londrina – PR	UDEV
BRLO07-02	M	41	Londrina – PR	UDEV
BRLO09-02	M	30	Londrina – PR	UDEV
BRLO10-02	M	45	Londrina – PR	Sexual
BRLO11-02	M	35	Londrina – PR	UDEV
BRLO12-02	F	33	Londrina – PR	UDEV
BRLO18-02	F	29	Londrina – PR	Sexual

HTLV-2				
BRLO19-02	M	34	Londrina – PR	UDEV
BRLO21-02	F	30	Londrina – PR	Sexual
BRLO22-02	M	46	Londrina – PR	Sexual
BRLO23-02	F	39	Londrina – PR	Sexual
BRLO24-02	M	37	Londrina – PR	Sexual
BRLO25-02	F	33	Londrina – PR	UDEV
BRLO26-02	M	37	Londrina – PR	UDEV
BRLO27-02	F	31	Londrina – PR	Sexual
BRLO28-02	M	42	Londrina – PR	Sexual + UDEV
BRLO29-02	F	34	Londrina – PR	Acidente de trabalho
BRLO31-02	M	29	Londrina – PR	UDEV
BRLO32-02	M	34	Londrina – PR	UDEV
BRLO35-02	M	34	Londrina – PR	UDEV
BRLO37-02*	M	46	Londrina – PR	Sexual + UDEV
BRLO38-02	F	27	Londrina – PR	Sexual
BRLO39-02	M	32	Londrina – PR	UDEV
BRLO43-02	M	34	Londrina – PR	UDEV
BRLO45-02	M	45	Londrina – PR	Sexual
BRLO49-02	M	35	Londrina – PR	Sexual + Transfusão
BRSP91-08	M	47	São Paulo – SP	Desconhecido
BRSP111-08	M	42	São Paulo – SP	Desconhecido
BRSP160-08	M	46	São Paulo – SP	Desconhecido
BRSP171-08	F	33	Jundiaí – SP	Desconhecido
BRSP172-08	M	46	Jundiaí – SP	Desconhecido
BRSP239-08	M	52	São Paulo – SP	Desconhecido
BRSP319-08	F	47	São Paulo – SP	Desconhecido
BRSP348-08	M	35	Jundiaí – SP	Desconhecido
BRSP84-09	M	36	Jundiaí – SP	Desconhecido
BRSP130-09	M	29	Jundiaí – SP	Desconhecido

* Paciente triplo infectado: HIV/HTLV-1/HTLV-2.

Legenda: M – masculino; F – feminino; SP – São Paulo; PR – Paraná; UDEV - uso de drogas endovenosas.

Além disto, quatro sequências da região LTR do HTLV-2, obtidas no ano de 1994 por sequenciamento manual, provenientes de pacientes coinfectados pelo HIV/Aids do Instituto de Infectologia Emílio Ribas de São Paulo, sendo três homens e uma mulher, foram usadas na construção de árvores filogenéticas junto às de Londrina e região e aos protótipos internacionais.

4.1.1 Metodologia de estudo

Estudo de corte transversal com amostras de DNA de conveniência.

A participação de todos os indivíduos de Londrina e região foi voluntária. O termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e o questionário (contendo dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais) foram obtidos durante a dissertação de mestrado de Helena Kaminami Morimoto, ex-aluna do Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Área de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (projeto 148 do CEP da FCF/USP, em 2002). Constava no projeto inicial também esta etapa de trabalho e foi autorizada a utilização desse material biológico (DNA) que estava estocado no Centro de Imunologia do IAL (**Anexo A**). No período descrito acima, para a totalidade dos pacientes, foi fornecida a explicação sobre o objetivo da pesquisa e foi obtida a assinatura do TCLE. Foi também informado que ele poderia participar, recusar ou abandonar a pesquisa em qualquer momento, sem qualquer prejuízo ao seu tratamento.

A casuística de São Paulo foi composta por amostras de conveniência, selecionadas seguindo os critérios de inclusão citados abaixo.

Critérios de inclusão:

a. Amostras de DNA da rotina diagnóstica de infecção pelo HTLV do Centro de Imunologia do IAL, na cidade de São Paulo;

b. Infecção pelo vírus linfotrópicos de células T humanas do tipo 1 ou 2 (HTLV-1 ou HTLV-2), definida pela presença de anticorpos específicos detectados pelo ensaio imunoenzimático e confirmado pelo *Western-Blot*;

c. DNA extraído para a realização de teste confirmatório de presença de segmento do genoma proviral *pol* de HTLV-1 ou HTLV-2 pela PCR em tempo real, no período de 2008 a 2010 e armazenado no Centro de Imunologia do IAL;

d. Infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), definida pela informação obtida da ficha de requisição do exame de pesquisa de infecção por HTLV;
e. Quantidade mínima do DNA para realização dos ensaios de reação em cadeia da polimerase (PCR) (50 µL).

Dados epidemiológicos, como sexo, idade e local de origem do paciente, foram obtidos da ficha de requisição do exame de pesquisa de infecção por HTLV. Os pacientes foram informados quanto a sua condição HTLV, foram atendidos/tratados nas Unidades de Saúde solicitantes dos exames e sabiam da coleta de sangue para os testes confirmatórios, sorológico e molecular.

Foi mantido sigilo sobre a identidade de todos os indivíduos do estudo, que foram identificados por números.

4.1.2 Aspectos éticos

Houve aprovação do projeto pelos Comitês Técnico Científico e de Ética das Instituições envolvidas (**Anexos B, C, D e E**).

4.2 Material

4.2.1 Amostras

Todas as amostras do estudo estavam estocadas no Centro de Imunologia do IAL de São Paulo, sob a guarda da Profa. Dra. Adele Caterino de Araujo em freezer -70ºC.

Os DNA foram extraídos de leucócitos do sangue periférico usando o kit *PureLinkTM Genomic DNA* (Invitrogen - Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)**,** segundo as instruções do fabricante.

4.2.2 Material necessário

O projeto foi parcialmente financiado pelo CNPq, Edital Universal, Processo # 481040/2007-2, e a parte experimental conduzida no Laboratório de Retrovírus do Centro de Virologia do IAL. Foram respeitadas todas as normas de biossegurança e

de qualidade em técnicas de biologia molecular necessárias para a manipulação de todo o material utilizado nesse trabalho, inclusive na utilização das salas de pré e pós-amplificação de DNA.

4.3 Métodos

4.3.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR) e *nested*-PCR (*n*-PCR)

As misturas de reação para as PCR e *n*-PCR utilizaram o mesmo tampão 10x concentrado (Tris-HCl pH 8.8) (LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil), $MgCl_2$ na concentração de 50 mM (LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil), dNTP (desoxirribonucleotídeos fosfatados) na concentração de 10 mM (Invitrogen - Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), *primers* (ou iniciadores) na concentração de 10 pmol/µL (Invitrogen - Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), *Taq* DNA polimerase na concentração de 5 U/µL (LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil), e água ultra pura (Gibco, Gaithersburg, MD, USA). A quantidade de cada reagente variou conforme o protocolo. Nas PCR foram empregados de 2,5 a 5 µL de DNA alvo e nas *n*-PCR, 5 µL do produto amplificado na primeira PCR. As misturas de reação foram submetidas, em termociclador (GeneAmp PCR System 9700, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), à desnaturação inicial por 4 ou 5 min a 94 ou 95ºC e extensão final a 72ºC. A temperatura de pareamento dos *primers* variou de acordo com o tamanho e a composição dos mesmos. Ainda, uma reação contendo todos os componentes acima, porém utilizando água ultra pura ao invés do DNA, foi incluída em todas as reações como controle negativo. Além disso, algumas amostras tiveram todos os ensaios repetidos, a fim de confirmar os resultados obtidos e garantir a sua qualidade.

Os protocolos utilizados nas PCR *e n*-PCR foram selecionados da literatura e sofreram pequenas adaptações e otimizações. Para a otimização dos *primers* selecionados, cada um foi alinhando com sequências de referência e cada nucleotídeo foi conferido. Para o HTLV-1 foram usadas a sequência do protótipo internacional ATK (número de acesso no Genbank: J02029) e duas sequências com genoma completo de HTLV-1 do Brasil (números de acesso no Genbank: AY563953 e AY563954). Já para o HTLV-2 foram usadas a sequência do protótipo internacional Mo (número de acesso no Genbank: M10060) e duas sequências com

genoma completo de HTLV-2 do Brasil (números de acesso no Genbank: AF326584 e AF139382). Quando o *primer* da maneira descrita do artigo original não funcionou corretamente, e foi encontrada diferença de nucleotídeo entre o *primer* e as sequências comparadas, o *primer* foi ajustado, em alguns casos, corrigido por uma base degenerada. As bases degeneradas, também conhecidas como bases mistas, podem ser introduzidas em qualquer posição na sequência de um *primer*. Por exemplo, uma base de composição mista em uma única posição pode incluir todas as quatro bases (N), bases C ou T (Y), bases A ou G (R), etc. Existem 11 combinações possíveis de duas, tres ou quatro bases e, portanto uma nomenclatura universal foi estabelecida e se encontra descrita no **Anexo F**.

Ainda, alguns protocolos sofreram trocas de reagentes; eles foram otimizados com o uso da *GoTaq Colorless Master Mix* (Promega, Madison, WI, USA) para maior estabilidade. Foram ajustadas também as condições de ciclagem: as temperaturas ideais dos *primers* foram calculadas usando a ferramenta *Oligo Calculator* disponível no site da Universidade de Pittsburgh (www.pitt.edu/~rsup/OligoCalc.htmL), e temperaturas próximas das fornecidas por essa ferramenta foram utilizadas na otimização. As condições ideais de ciclagem foram definidas pela observação da banda mais nítida e forte no gel de agarose.

Os *primers* e sua posição na linhagem ATK e Mo, bem como o número de ciclos, o tempo de cada etapa de amplificação, e o tamanho do produto obtido se encontram descritos nas tabelas a seguir.

4.3.1.1 HTLV-1 – LTR

As **Tabelas 2** e **3** mostram os protocolos dos ensaios de PCR e *n*-PCR adaptados para região LTR do HTLV-1, com base na descrição de LAURENTINO *et al*., 2005. Foi possível amplificar por PCR e *n*-PCR e sequenciar os 17 isolados.

Tabela 2. *Primers* utilizados nos ensaios de PCR e *n*-PCR da região LTR para detecção de DNA proviral do HTLV-1 de pacientes coinfectados pelo HIV-1 de Londrina e região (sul) e de São Paulo (sudeste).

Ensaio Molecular	*Primer*	Sequência 5' – 3' e tamanho do produto	Posição[a]
PCR LTR [b]	LTR-I.01 *Forward*	TGA CAA TGA CCA TGA GCC CCA (20 pb)	23-43
	LTR-I.02 *Reverse*	CGC GGA ATA GGG CTA GCG CT (20 pb)	963-844
***n*-PCR LTR** [b,c]	LTR-I.03 *Forward*	GGC TTA GAG CCT CCC AGT GA (20 pb)	57-76
	LTR-I.04 *Reverse*	GCC TAG GGA ATA AAG GGG CG (20 pb)	821-802

[a] Posição dos nucleotídeos dos *primers* fornecida pelo alinhamento com o protótipo ATK (linhagem celular infectada pelo HTLV-1; número de acesso no GenBank é J02029).pb: pares de bases.

[b] adaptado de LAURENTINO *et al*., 2005.

[c] *Primers* utilizados nos ensaios de *n*-PCR e de sequenciamento.

Tabela 3. Protocolos dos ensaios de PCR e *n*-PCR da região LTR para a detecção de DNA proviral do HTLV-1 de pacientes coinfectados pelo HIV-1 de Londrina e região (sul) e de São Paulo (sudeste).

Condições da reação	**HTLV-1 - LTR**[a]	
	PCR	***n*-PCR**
Reagentes		
Tris-HCl Tampão 10X	5 µL	5 µL
$MgCl_2$ 50 mM	2,5 µL	2,5 µL
dNTP 10 mM	1 µL	1 µL
Taq DNA polimerase 5 U/µl	0.5 µL	0,5 µL
Primer Forward 10 pmol/µL	1 µL	1 µL
Primer Reverse 10 pmol/µL	1 µL	1 µL
H_2O	34 µL	34 µL
DNA *input*	5 µL	5 µL
Volume final	50 µL	50 µL
Condições de ciclagem		94° C – 4 min
	35 ciclos	94° C – 1 min 57° C – 1 min 72° C – 2 min
		72° C – 7 min
		8° C - ∞

[a] adaptado de LAURENTINO *et al*., 2005.

4.3.1.2 HTLV-1 - *env*

As **Tabelas 4** e **5** descrevem os protocolos adaptados para região *env* do HTLV-1, com base na descrição de CATERINO-DE-ARAUJO *et al*., 2000. Com eles, foi possível amplificar por PCR e *n*-PCR e sequenciar 16 isolados.

Tabela 4. *Primers* utilizados nos ensaios de PCR e *n*-PCR da região *env* para detecção de DNA proviral do HTLV-1 de pacientes coinfectados pelo HIV-1 de Londrina e região (sul) e de São Paulo (sudeste).

Ensaio Molecular	*Primer*	Sequência 5' – 3' e tamanho do produto	Posição[a]
PCR *env*[b]	D498 *Forward*	ATG GGT AAG TTT CTB GCC (18 pb)	5202-5219
	D500 *Reverse*	TTA CAG GGA TGA CTB AGG (18 pb)	6668-6651
***n*-PCR *env*[b,c]**	LUI 7 *Forward*	CCG TCT CCA GYC CMT MCT GGA (21 pb)	5547-5567
	LUI 8 *Reverse*	CCT CGT CTR TTY TGG GCW GCA (21 pb)	6309-6289

[a] Posição dos nucleotídeos dos *primers* fornecida pelo alinhamento com o protótipo ATK (linhagem celular infectada pelo HTLV-1; número de acesso no GenBank é J02029).pb: pares de bases.

[b] adaptado de CATERINO-DE-ARAUJO *et al*., 2000.

[c] *Primers* utilizados nos ensaios de *n*-PCR e de sequenciamento.

Em evidência as bases degeneradas.

Tabela 5. Protocolos dos ensaios de PCR e *n*-PCR da região *env* para a detecção de DNA proviral do HTLV-1 de pacientes coinfectados pelo HIV-1 de Londrina e região (sul) e de São Paulo (sudeste).

Condições da reação	**HTLV-1 - *env*[a]**	
	PCR	***n*-PCR**
Reagentes		
Tris-HCl Tampão 10X	5 μL	5 μL
$MgCl_2$ 50 mM	1,5μL	1,5 μL
dNTP 10 mM	1 μL	1 μL
Taq DNA polimerase 5 U/μl	0,5 μL	0,5 μL
Primer Forward 10 pmol/μL	1 μL	1 μL
Primer Reverse 10 pmol/μL	1 μL	1 μL
H_2O	35 μL	35 μL
DNA *input*	5 μL	5 μL
Volume final	50 μL	50 μL
Condições de ciclagem		95° C – 5 min
	35 ciclos	95° C – 1 min 55° C – 2 min 72° C – 3 min
		72° C – 7 min
		8° C - ∞

[a] adaptado de CATERINO-DE-ARAUJO *et al*., 2000.

4.3.1.3 HTLV-1 - *tax*

As **Tabelas 6** e **7** mostram os protocolos adaptados para região *tax* do HTLV-1, com base em descrição de FURUKAWA *et al*., 2000. Foi possível amplificar por PCR e *n*-PCR e sequenciar 13 isolados, sendo cinco de Londrina e região e oito de São Paulo. A **Tabela 8** descreve os *primers* utilizados no sequenciamento.

Tabela 6. *Primers* utilizados nos ensaios de PCR e *n*-PCR da região *tax* para detecção de DNA proviral do HTLV-1 de pacientes coinfectados pelo HIV-1 de Londrina e região (sul) e de São Paulo (sudeste).

Ensaio Molecular	*Primer*	Sequência 5' – 3' e tamanho do produto	Posição[a]
PCR *tax*[b]	PXO1 *Forward*	TCG AAA CAR CCC TRC AGA TA (20 pb)	7280-7299
	PXO2 *Reverse*	TGA GCT TAT GAT TTG TCT TCA (21 pb)	8470-8490
***n*-PCR *tax*[b]**	PXI1 *Forward*	ATA CAA AGT TAA CCA TGC TT (20 pb)	7297-7316
	PXI3 *Reverse*	AGA CGT CAG AGC CTT AGT CT (20 pb)	8397-8416

[a] Posição dos nucleotídeos dos *primers* fornecida pelo alinhamento com o protótipo ATK (linhagem celular infectada pelo HTLV-1; número de acesso no GenBank é J02029). pb: pares de bases.

[b] Adaptado de FURUKAWA *et al*., 2000.

Em evidência as bases degeneradas.

Tabela 7. Protocolos dos ensaios de PCR e *n*-PCR da região *tax* para a detecção de DNA proviral do HTLV-1 de pacientes coinfectados pelo HIV-1 de Londrina e região (sul) e de São Paulo (sudeste).

Condições da reação		**HTLV-1 - *tax*[a]**		
		PCR		***n*-PCR**
Reagentes				
GoTaq Colorless Master Mix 2X		12,5 µL		25 µL
Primer Forward 10 pmol/µL		1 µL		1,5 µL
Primer Reverse 10 pmol/µL		1 µL		1,5 µL
H_2O		8 µL		17 µL
DNA *input*		2,5 µL		5 µL
Volume final		25 µL		50 µL
Condições de ciclagem		94° C – 5 min		94° C – 5 min
	35 ciclos	94° C – 1 min 58° C – 1 min 15 seg 72° C – 1 min 30 seg	20 ciclos	94° C – 1 min 58° C – 1 min 15 seg 72° C – 1 min 30 seg
		72° C – 10 min		72° C – 10 min
		8° C - ∞		8° C - ∞

[a] Adaptado de FURUKAWA *et al*., 2000.

Tabela 8. *Primers* utilizados no sequenciamento da região *tax* de DNA proviral do HTLV-1 de pacientes coinfectados pelo HIV-1 de Londrina e região (sul) e de São Paulo (sudeste).

Ensaio Molecular	*Primer*	Sequência 5' – 3' e tamanho do produto	Posição[a]
Sequenciamento *tax*[b]	PXI1 *Forward*[c]	ATA CAA AGT TAA CCA TGC TT (20 pb)	7297-7316
	PXI2 *Forward*	GGC CAT GCG CAA ATA CTC CC (20 pb)	7641-7660
	PXI3 *Forward*	TTC CGT TCC ACT CAA CCC TC (20 pb)	8024-8043
	PXI1 *Reverse*	GGG TTC CAT GTA TCC ATT TC (20 pb)	7667-7686
	PXI2 *Reverse*	GTC CAA ATA AGG CCT GGA GT (20 pb)	8047-8066
	PXI3 *Reverse*[c]	AGA CGT CAG AGC CTT AGT CT (20 pb)	8397-8416

[a] Posição dos nucleotídeos dos *primers* fornecida pelo alinhamento com o protótipo ATK (linhagem celular infectada pelo HTLV-1; número de acesso no GenBank é J02029). pb: pares de bases.

[b] Adaptado de FURUKAWA *et al*., 2000.

[c] *Primers* utilizados nos ensaios de *n*-PCR e de sequenciamento.

4.3.1.4 HTLV-2 - LTR

Os protocolos estabelecidos para a região LTR do genoma proviral do HTLV-2 foram baseados em protocolo previamente descrito (MORIMOTO *et al*., 2007). Com eles foi possível amplificar por PCR e *n*-PCR e sequenciar 23 isolados. A **Tabela 9** e a **Tabela 10** descrevem os protocolos adaptados para região LTR do HTLV-2.

Tabela 9. *Primers* utilizados nos ensaios de PCR e *n*-PCR da região LTR para detecção de DNA proviral do HTLV-2 de pacientes coinfectados pelo HIV-1 de Londrina e região (sul) e de São Paulo (sudeste).

Ensaio Molecular	*Primer*	Sequência 5' – 3' e tamanho do produto	Posição[a]
PCR LTR [b]	VS1 *Forward*	CAG GGC GAG TCA TCG ACC CAA AAG (24 pb)	35-58
	VS2 *Reverse*	GAA GAC AAT GCT CCT AGG GCG GGC (24 pb)	746-724
***n*-PCR LTR** [b,c]	VS3 *Forward*	ACC GTC TCA CAC AAA CAA TCC C (22 pb)	64-85
	VS4 *Reverse*	GCG GGC CTG CCT ATA GCG ATG (21 pb)	729-709

[a] Posição dos nucleotídeos dos *primers* fornecida pelo alinhamento com o protótipo Mo (linhagem celular infectada pelo HTLV-2; número de acesso no GenBank é M10060).pb: pares de bases.

[b] adaptado de MORIMOTO *et al*., 2007.

[c] *Primers* utilizados nos ensaios de *n*-PCR e de sequenciamento.

Tabela 10. Protocolos dos ensaios de PCR e *n*-PCR da região LTR para a detecção de DNA proviral do HTLV-2 de pacientes coinfectados pelo HIV-1 de Londrina e região (sul) e de São Paulo (sudeste).

Condições da reação	**HTLV-2 - LTR**[a]			
	PCR		***n*-PCR**	
Reagentes				
Tris-HCl Tampão 10X	5 µL		5 µL	
$MgCl_2$ 50 mM	2,5 µL		2,5 µL	
dNTP 10 mM	1 µL		1 µL	
Taq DNA polimerase 5 U/µl	0.5 µL		0,5 µL	
Primer Forward 10 pmol/µL	1 µL		1 µL	
Primer Reverse 10 pmol/µL	1 µL		1 µL	
H_2O	34 µL		34 µL	
DNA *input*	5 µL		5 µL	
Volume final	50 µL		50 µL	
Condições de ciclagem		95° C – 5 min		95° C – 5 min
	35 ciclos	95° C – 1 min	30 ciclos	95° C – 1 min
		66° C – 1 min		64° C – 1 min
		72° C – 30 seg		72° C – 1 min
		72° C – 7 min		72° C – 7 min
		8° C - ∞		8° C - ∞

[a] adaptado de MORIMOTO *et al*., 2007.

4.3.1.5 HTLV-2 - *env*

Os protocolos estabelecidos para a região *env* do genoma proviral do HTLV-2 foram baseados em protocolo previamente descrito (EGAN *et al*., 1999; SHINDO *et al*., 2002; MORIMOTO *et al*., 2007). Com eles foi possível amplificar por PCR e *n*-PCR e sequenciar 37 isolados, sendo 27 de Londrina e região e 10 de São Paulo. Foram utilizados dois protocolos diferentes para tornar possível o sequenciamento de um fragmento grande da região *env* do HTLV-2. As **Tabelas 11** e **12** descrevem o primeiro protocolo, enquanto as **Tabelas 13** e **14** descrevem o segundo protocolo.

Tabela 11. *Primers* utilizados nos ensaios de PCR e *n*-PCR da região *env* para detecção de DNA proviral do HTLV-2 de pacientes coinfectados pelo HIV-1 de Londrina e região (sul) e de São Paulo (sudeste).

Ensaio Molecular	*Primer*	Sequência 5' – 3' e tamanho do produto	Posição[a]
PCR *env* [b]	E5 *Forward*	AGC CAA GTG TCC CTT CGA CTA (21 pb)	5612-5632
	E2 *Reverse*	CTG CAG AAG CTA GCA GGT CTA (21 pb)	6670-6650
n*-PCR *env [b,c]	E3 *Forward*	TTC TCT AAG TGC GGC TCC TC (20 pb)	5636-5655
	E2 *Reverse*	CTG CAG AAG CTA GCA GGT CTA (21 pb)	6670-6650
Sequenciamento	GP21F1 *Forward*	CTG CAA CAA CTC CAT TAT CCT (21 pb)	6041-6060

[a] Posição dos nucleotídeos dos *primers* fornecida pelo alinhamento com o protótipo Mo (linhagem celular infectada pelo HTLV-2; número de acesso no GenBank é M10060).pb: pares de bases.

[b] adaptado de EGAN *et al*., 1999; SHINDO *et al*., 2002.

[c] *Primers* utilizados nos ensaios de *n*-PCR e de sequenciamento.

Tabela 12. Protocolos dos ensaios de PCR e *n*-PCR da região *env* para a detecção de DNA proviral do HTLV-2 de pacientes coinfectados pelo HIV-1 de Londrina e região (sul) e de São Paulo (sudeste).

Condições da reação	**HTLV-2 - *env*[a]**	
	PCR	***n*-PCR**
Reagentes		
GoTaq Colorless Master Mix 2X	12,5 µL	25 µL
Primer Forward 10 pmol/µL	1 µL	1,5 µL
Primer Reverse 10 pmol/µL	1 µL	1,5 µL
H_2O	8 µL	17 µL
DNA *input*	2,5 µL	5 µL
Volume final	25 µL	50 µL
Condições de ciclagem		94° C – 4 min
	30 ciclos	94° C – 1 min 56° C – 1 min 72° C – 1 min 30 seg
		72° C – 10 min
		8° C - ∞

[a] adaptado de EGAN *et al*., 1999; SHINDO *et al*., 2002.

Tabela 13. Primers utilizados nos ensaios de PCR e *n*-PCR da região *env* para detecção de DNA proviral do HTLV-2 de pacientes coinfectados pelo HIV-1 de Londrina e região (sul) e de São Paulo (sudeste).

Ensaio Molecular	***Primer***	**Sequência 5' – 3' e tamanho do produto**	**Posição[a]**
PCR *env*[b]	envA *Forward*	ATG GGT AAT GTT TTC TTC (18 pb)	5180-5197
	envB *Reverse*	TAT TAT AGC ATG GTT TCT (18 pb)	6642-6625
***n*-PCR *env*[b,c]**	Lui7 *Forward*	CCG TCT CCA GYC CMT MCT GGA (21 pb)	5547-5567
	Lui8 *Reverse*	CCT CGT CTR TTY TGG GCW GCA (21 pb)	6309-6289

[a] Posição dos nucleotídeos dos *primers* fornecida pelo alinhamento com o protótipo Mo (linhagem celular infectada pelo HTLV-2; número de acesso no GenBank é M10060).pb: pares de bases.

[b] adaptado de MORIMOTO *et al*., 2007.

[c] *Primers* utilizados nos ensaios de *n*-PCR e de sequenciamento.

Em evidência as bases degeneradas.

Tabela 14. Protocolos dos ensaios de PCR e *n*-PCR da região *env* para a detecção de DNA proviral do HTLV-2 de pacientes coinfectados pelo HIV-1 de Londrina e região (sul) e de São Paulo (sudeste).

Condições da reação		**HTLV-2 - *env*[a]**		
		PCR		***n*-PCR**
Reagentes				
GoTaq Colorless Master Mix 2X		12,5 μL		25 μL
Primer Forward 10 pmol/μL		1 μL		1,5 μL
Primer Reverse 10 pmol/μL		1 μL		1,5 μL
H_2O		8 μL		17 μL
DNA *input*		2,5 μL		5 μL
Volume final		25 μL		50 μL
Condições de ciclagem		94° C – 4 min		94° C – 4 min
	35 ciclos	94° C – 1 min 40° C – 1 min 72° C – 2 min	35 ciclos	94° C – 1 min 60° C – 1 min 72° C – 2 min
		72° C – 10 min		72° C – 10 min
		8° C - ∞		8° C - ∞

[a] adaptado de MORIMOTO *et al*., 2007.

4.3.1.6 HTLV-2 – *tax*

Os protocolos estabelecidos para a região *tax* do genoma proviral do HTLV-2 foram baseados em protocolo previamente descrito (EIRAKU *et al*., 1996). Com eles foi possível amplificar por PCR e *n*-PCR e sequenciar 25 isolados, sendo 19 de Londrina e região e seis de São Paulo. As **Tabelas 15**, **16** e **17** descrevem os protocolos adaptados para região *tax* do HTLV-2.

Tabela 15. *Primers* utilizados nos ensaios de PCR e *n*-PCR da região *tax* para detecção de DNA proviral do HTLV-2 de pacientes coinfectados pelo HIV-1 de Londrina e região (sul) e de São Paulo (sudeste).

Ensaio Molecular	*Primer*	Sequência 5' – 3' e tamanho do produto	Posição[a]
PCR *tax*[b]	pX101 *Forward*	GGC AAT CTC CTA AAA TAG TCT (21 pb)	7155-7175
	Px106 *Reverse*	GGG CCG TGG TTT CAG TTC CTA (21 pb)	8306-8326
***n*-PCR *tax*[b]**	pX103 *Forward*	TTA CAA TCC TGT CTC CTC TCA (21 pb)	8306-8326
	Px106 *Reverse*	GGG CCG TGG TTT CAG TTC CTA (21 pb)	8306-8326

[a] Posição dos nucleotídeos dos *primers* fornecida pelo alinhamento com o protótipo Mo (linhagem celular infectada pelo HTLV-2; número de acesso no GenBank é M10060). pb: pares de bases.

[b] Adaptado de EIRAKU *et al*., 1996.

Tabela 16. Protocolos dos ensaios de PCR e *n*-PCR da região *tax* para a detecção de DNA proviral do HTLV-2 de pacientes coinfectados pelo HIV-1 de Londrina e região (sul) e de São Paulo (sudeste).

Condições da reação	**HTLV-2 - *tax*[a]**	
	PCR	***n*-PCR**
Reagentes		
GoTaq Colorless Master Mix 2X	12,5 µL	25 µL
Primer Forward 10 pmol/µL	1 µL	1,5 µL
Primer Reverse 10 pmol/µL	1 µL	1,5 µL
H_2O	8 µL	17 µL
DNA *input*	2,5 µL	5 µL
Volume final	25 µL	50 µL
Condições de ciclagem	94° C – 5 min 35 ciclos: 94° C – 40 seg; 52,5° C – 30 seg; 72° C – 40 seg 72° C – 10 min 8° C - ∞	

[a] Adaptado de EIRAKU *et al*., 1996.

Tabela 17. *Primers* utilizados no sequenciamento da região *tax* de DNA proviral do HTLV-2 de pacientes coinfectados pelo HIV-1 de Londrina e região (sul) e de São Paulo (sudeste).

Ensaio Molecular	*Primer*	Sequência 5' – 3' e tamanho do produto	Posição[a]
Sequenciamento *tax*[b]	Px103 *Forward*[c]	TTA CAA TCC TGT CTC CTC TCA (21 pb)	8306-8326
	Px105 *Forward*	GCT YTC CCC ACC CAT GAC ATG (21 pb)	7680-7603
	LS1 *Forward*	GAA TAC ACC AAC ATC CCT GTC (21 pb)	8140-8160
	Px102 *Reverse*	TGT GTG TAG GAA CAT TTT GTA (21 pb)	7795-7815
	Px106 *Reverse*[c]	GGG CCG TGG TTT CAG TTC CTA (21 pb)	8306-8326

[a] Posição dos nucleotídeos dos *primers* fornecida pelo alinhamento com o protótipo Mo (linhagem celular infectada pelo HTLV-2; número de acesso no GenBank é M10060). pb: pares de bases.

[b] Adaptado de EIRAKU *et al*., 1996.

[c] *Primers* utilizados nos ensaios de *n*-PCR e de sequenciamento.

Em evidência as bases degeneradas.

Para a recuperação de alguns casos de *tax* do HTLV-2 que resultaram positivos na *n*-PCR, mas que geraram sequências ruins onde não foi possível a edição, foi repetido o sequenciamento com os *primers* descritos na **Tabela 17** e usando três *primers* adicionais descritos a seguir (**Tabela 18**).

Tabela 18. *Primers* adicionais utilizados no sequenciamento da região *tax* de DNA proviral do HTLV-2 de pacientes coinfectados pelo HIV-1 de Londrina e região (sul) e de São Paulo (sudeste).

Ensaio Molecular	*Primer*	Sequência 5' – 3' e tamanho do produto	Posição[a]
Sequenciamento *tax*[b]	Px107 *Forward*	ACC CCA TGT CAT ATT CTG CCA (21 pb)	7713-7733
	Px108 *Reverse*	AGC CTT TAC TTG GGA TTG TTT (21 pb)	8265-8285
	Px104 *Reverse*	AAG TTC TTC TAA TCG TTT TAG (21 pb)	7771-7791

[a] Posição dos nucleotídeos dos *primers* fornecida pelo alinhamento com o protótipo Mo (linhagem celular infectada pelo HTLV-2; número de acesso no GenBank é M10060). pb: pares de bases.

[b] Adaptado de EIRAKU *et al*., 1996.

4.3.2 Tipagem e subtipagem viral por RFLP (polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição) para região LTR do HTLV-2

Usando um sistema de classificação que acomoda sítios de restrição descrito por SWITZER e por EIRAKU (SWITZER *et al*., 1995; EIRAKU *et al*., 1995), foram empregadas sete enzimas na análise da região LTR do HTLV-2 por RFLP (*Dra* II, *Ban* II, *Ava* II, *Sau* I, *Bgl* I, *Sac* II, e *Sma* I). A *n*-PCR foi usada para amplificar 666pb da região LTR (nt. 64-729) (MORIMOTO *et al*., 2007), e os produtos obtidos foram submetidos à RFLP (MORIMOTO, 2003) e ao sequenciamento como forma comparativa.

Para a avaliação das sequências, mapas de predição de endonuclease foram construídos usando as ferramentas Sequencher 4.7 e NEBcutter V2.0 (http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php) e foram comparados com os padrões de gel na RFLP, procurando por subgrupos de HTLV-2a e correlacionando com fatores de risco para transmissão/aquisição do HTLV.

4.3.3 Detecção e purificação de produtos da PCR para sequenciamento

Após a realização da *n*-PCR, os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose na concentração de 1,3% (0,9 gramas de agarose em 70 mL de tampão TBE (Tris-Borato EDTA) 0,5x concentrado), corado com *SYBR Safe* (7 µL) (Invitrogen - Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Os produtos de amplificação (4 µL) e o padrão de tamanho molecular *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen - Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 4 µL diluído 1:10, foram misturados ao *BlueJuice Gel Loading Buffer* (1 µL) (Invitrogen - Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), aplicados no gel de agarose e submetidos a uma corrente constante de 90V por 45 min. A solução-tampão eletrolítica para o preparo do gel foi a mesma que recobriu o gel na cuba de eletroforese (tampão de corrida). Os produtos de amplificação de DNA foram visibilizados como bandas no gel de agarose quando submetidos à luz ultravioleta em transluminador e fotodocumentados.

Algumas amostras foram submetidas a um processo de purificação utilizando o *kit ExoSAP-IT® For PCR Product Clean-Up* (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA), que utiliza duas enzimas hidrolíticas, *Exonuclease* I (*Exo* I) para digerir excesso de

primers e DNA de fita simples estranho, e *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) para degradar excesso de dNTPs provenientes da PCR. A *ExoSAP-IT* foi adicionada diretamente no produto da *n*-PCR e incubada a 37°C por 15 min. Após essa etapa, a *ExoSAP-IT* foi inativada pelo aquecimento a 80°C por 15 min. O material purificado foi novamente quantificado em gel de agarose e sequenciado. As sequências de DNA do material purificado e do não purificado apresentaram a mesma qualidade, e por isso a técnica de purificação deixou de ser realizada.

4.3.4 Reação de sequenciamento

Para a reação de sequenciamento foi utilizado o *DNA Sequencing Kit –Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction – ABI Prism®* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e 15 ng de DNA amplificado da *n*-PCR. A reação foi realizada utilizando 0,5 µL de *Big Dye Terminator 3.1* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 4 µL de tampão de sequenciamento 2,5x (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA),1,6 µL de *primer* na concentração de 1 pmol/µL e água ultra pura (Gibco, Gaithersburg, MD, USA) para um volume final de reação de 10 µL. Todas as reações de incorporação de rodaminas foram realizadas em placas de 96 poços (*Optical 96-well Reaction Plate*, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), sob as seguintes condições: 25 ciclos de: 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 6°C por 4 min.

4.3.5 Purificação da reação de sequenciamento

Após a reação de sequenciamento, foram realizadas duas técnicas diferentes de purificação para a retirada do excesso de dNTPs, de acordo com o sequenciador a ser usado:

- <u>Isopropanol 70%</u>: 40 µL de isopropanol a 70% foram adicionados a cada poço da placa. A placa foi centrifugada a 1.990 x g por 45 min; o isopropanol foi desprezado por inversão da placa e seguiu-se uma etapa de centrifugação da placa invertida a 150 x g por 1 min. O sedimento seco foi ressuspenso com 10 µL de formamida Hi-Di (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e as amostras foram sequenciadas em Sequenciador Automático *ABI* 3100 *Genetic Analyser* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

- Etanol/Acetado de Sódio: a mistura de 1 µL de acetado de sódio 3.0 M, pH 4.6, mais 25 µL de etanol a 100%, foi adicionada a cada poço da placa. A placa foi homogeneizada e permaneceu por 10 min no gelo, no escuro. Então, a placa foi centrifugada a 2000 x g por 20 min; o etanol/acetado de sódio foi desprezado por inversão da placa e seguiu-se uma etapa de centrifugação da placa invertida a 150 x g por 1 min. Foi adicionado 75 µL de etanol a 70% e a placa foi centrifugada a 2000 x g por 5 min; o etanol a 70% foi desprezado por inversão da placa e seguiu-se uma etapa de centrifugação da placa invertida a 150 x g por 1 min. O sedimento seco foi ressuspenso com 15 µL de formamida Hi-Di (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e as amostras foram sequenciadas em Sequenciador Automático *ABI 3130 Genetic Analyser* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

4.3.6 Análise molecular: Edição, Análise de subtipos do HTLV e Análises filogenéticas

4.3.6.1 Edição

Os arquivos obtidos do sequenciamento, denominados de cromatogramas contendo as informações da sequência de ácidos nucléicos, foram alinhados e editados, utilizando o programa Sequencher 4.7 (Gene Codes). As sequências finais obtidas pela edição foram salvas em formato *fasta*.

Os arquivos *fasta* foram checados para confirmar se todas as sequências eram de HTLV usando a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) disponível no website do NCBI (*National Center for Biotecnology Information*, http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), que compara cada sequência com todo o banco de dados do NCBI.

4.3.6.2 Análise de subtipos do HTLV

Os arquivos *fasta* de HTLV-1 e HTLV-2 gerados após a edição foram avaliados pela ferramenta Genotyping disponível no website do NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi) que realiza a análise de subtipos através da comparação por BLAST da sequência genética da amostra com cada uma das sequências de referência (ROZANOV *et al*., 2004). Para análise de subtipo do HTLV-1 baseado na região LTR foi usada também a ferramenta LASP HTLV-1 Subtyping disponível no website do REGA ou BioAfrica

(http://bioafrica.mrc.ac.za/rega-genotype/htmL/subtypinghtlv.htmL). Com ela o subtipo do HTLV-1 é determinado por meio da combinação de análises filogenéticas com métodos de *bootscanning* (DE OLIVEIRA *et al*., 2005; ALCANTARA *et al*., 2009).

4.3.6.3 Análise filogenética

Para a realização das análises filogenéticas, os arquivos *fasta* gerados após a edição, foram alinhados com um conjunto de sequências de HTLV disponíveis no banco de dados do GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank), usando a ferramenta ClustalW *Multiple-Sequence Alignment* do programa BioEdit *Sequence Alignment Editor* versão 7.0.5.3 (HALL, 2001). Os alinhamentos múltiplos foram corrigidos manualmente usando o programa BioEdit.

Os algoritmos de reconstrução filogenética *Neighbor Joining* – NJ ("aproximação de vizinhos") e *Maximum Likelihood* - ML (Máxima Verossimilhança) foram utilizados para as análises filogenéticas. O NJ é um método que identifica os vizinhos e atribue um valor às diferenças existentes entre duas sequências; é considerado eficiente e rápido. É um método de inferência filogenética considerado quantitativo, as diferenças entre as sequências são tratadas como uma só variável (SAITOU & NEI, 1987). Já o ML usa cálculos probabilísticos para encontrar a árvore que melhor explica a variação dado o conjunto de sequências, é considerado o melhor modelo de um ponto de vista teórico, porém exige muito esforço computacional. É um método de inferência filogenética considerado qualitativo, as diferenças entre as sequências são tratadas considerando inúmeras variáveis (FELSENSTEIN, 1981). Não há como pressupor ser um método melhor do que o outro, portanto os dois algoritmos foram avaliados. O método de NJ é adequado para estudar topologia, mas para obter mais precisão quanto ao tamanho dos ramos deve-se considerar o ML.

As árvores de NJ e ML foram construídas baseadas em modelos apropriados de substituição de nucleotídeos determinados pelo Modeltest v3.7 (POSADA & CRANDALL, 1998) , usando o programa PAUP versão 4.0.b10 (SWOFFORD, 2002). O índice de sustentabilidade dos ramos foi testado pelo método de *bootstrapping* com 1000 pseudo-réplicas. As árvores filogenéticas foram visualizadas com o programa *TreeView* versão 1.6.6 (PAGE, 1996). Valores de *bootstrap* acima de 65% e *zero length* (usando *likelihood ratio test*) com $p<0.001$ (**) e $p\leq0.05$ (*) foram

destacados nas árvores. As árvores foram enraizadas usando um grupo externo; para tanto não foi escolhido um grupo externo relacionado de forma muito distante com o grupo interno, pois poderia resultar em erros topológicos e, não foi escolhido um grupo externo relacionado ao interno de forma muito próxima, pois dessa forma o grupo externo não seria verdadeiramente representativo.

4.3.6.4 Análise de mutações

Para a realização da pesquisa de mutações foi utilizado o programa BioEdit *Sequence Alignment Editor* versão 7.0.5.3, no qual as sequências novas e as sequências de referência disponíveis no GenBank foram alinhadas e pesquisada presença de mutações e sua frequência. Ainda, este programa foi utilizado para transformar nucleotídeos em aminoácidos, e para buscar alterações de aminoácidos. O protótipo ATK foi usado como exemplo de subtipo para o HTLV-1a e, ele foi isolado de células do sangue periférico de um paciente com ATL do Japão (SEIKI *et al*., 1983). Os protótipos Mo e NRA foram usados como exemplos dos subtipos de HTLV-2a e HTLV-2b, respectivamente; o primeiro foi identificado em uma linhagem de células T derivadas de uma variante atípica de células leucemicas do paciente Mo e o segundo a partir de células T CD8+ de um paciente (NRA) com desordem linfoproliferativa, ambos nos EUA (LEE *et al*., 1993).

4.3.6.5 Análise de similaridade de nucleotídeos

Foi estimada a distância de nucleotídeos utilizando o programa MEGA4 – *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (TAMURA *et al*., 2007), dentro de um grupo de sequências e/ou entre diferentes grupos.

Resultados

5 RESULTADOS

Os protocolos adaptados e otimizados estabelecidos para as regiões LTR, *env* e *tax* do genoma proviral do HTLV-1 e do HTLV-2 foram apresentados sob a forma de tabelas na seção Métodos assim como o número de amostras que puderam ser amplificadas com estes protocolos e, os resultados obtidos com as sequências divididos em HTLV-1 (LTR, *env* e *tax*) e HTLV-2 (LTR, *env* e *tax*), sem necessariamente terem sido conduzidos nessa ordem.

5.1 HTLV-1

Dezessete amostras de DNA, sendo sete de isolados de Londrina e região, e dez de São Paulo foram analisadas e designadas: BRLO14-02, BRLO15-02, BRLO30-02, BRLO34-02, BRLO37-02, BRLO47-02, BRLO48-02, BRSP134-08, BRSP145-08, BRSP206-08, BRSP232-08, BRSP42-09, BRSP205-09, BRSP320-09, BRSP414-09, BRSP425-09 e BRSP01-10.

5.1.1 HTLV-1 – LTR

Usando os protocolos dos ensaios de PCR e *n*-PCR adaptados para região LTR do HTLV-1, com base na descrição de LAURENTINO *et al*., 2005, foi possível amplificar por PCR e *n*-PCR e sequenciar os 17 isolados com produtos de 731 pb.

Foram construídas árvores filogenéticas com um segmento de 692 pb (nt. 75-766 em relação ao protótipo internacional ATK) de 59 sequências de LTR do HTLV-1 disponíveis na base de dados GenBank, incluindo as 17 novas sequências de Londrina e região e de São Paulo. O melhor modelo evolutivo determinado pelo Modeltest v3.7 foi o GTR+G. As árvores filogenéticas de ML e NJ apresentaram topologias semelhantes, agrupando os 17 isolados no subtipo cosmopolita HTLV-1a, com valor de *bootstrap* de 87% e $p<0,001$. Além disso, todos os isolados foram agrupados dentro do subgrupo A Transcontinental (suportado por um $p<0,001$) em dois ramos da América Latina (A e B, suportado por um $p<0,001$ na análise de ML) (**Figura 3**).

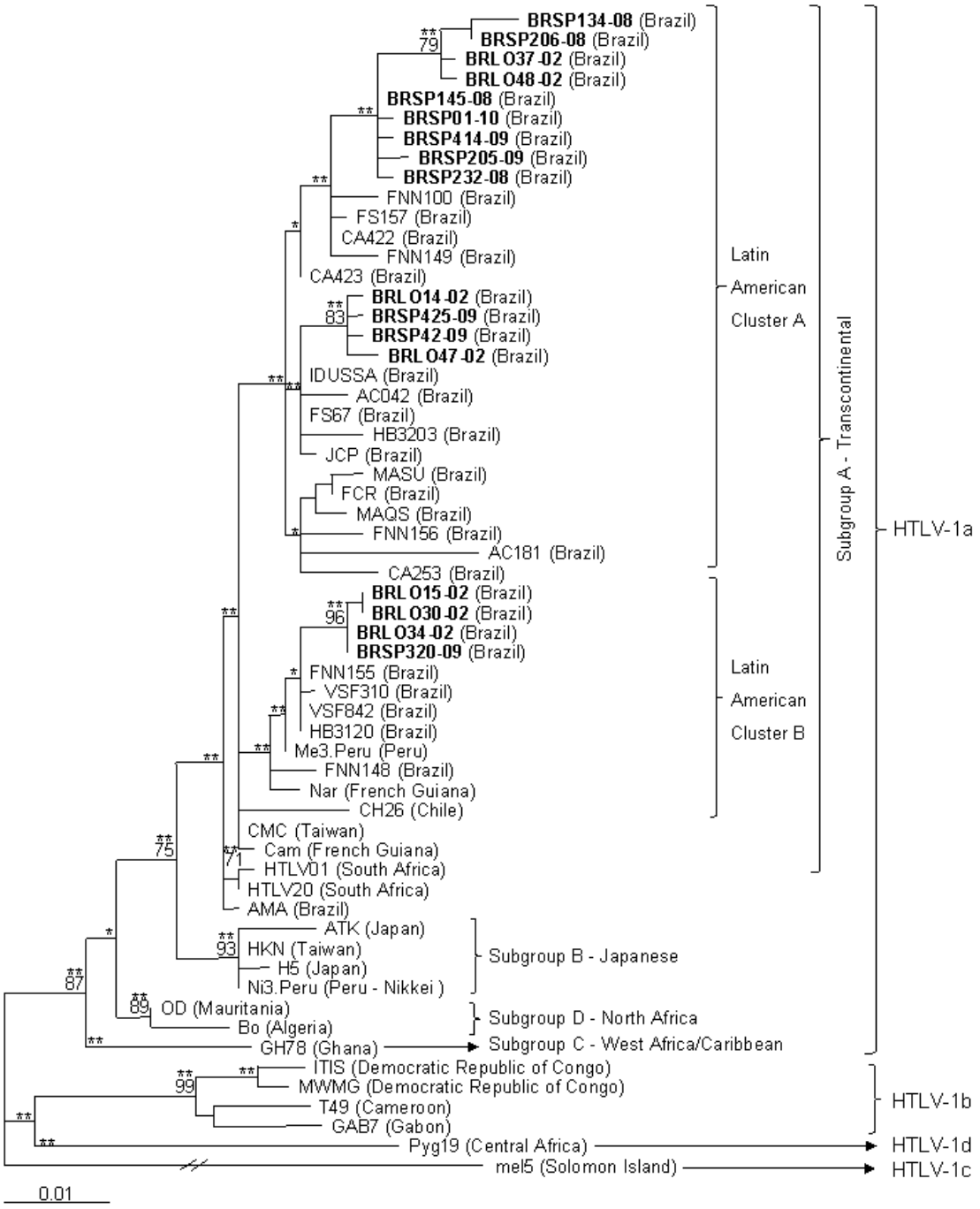


Figura 3. Árvore filogenética *Maximum Likelihood* da região LTR do HTLV-1 com 692 pb (posição 75-766 em relação ao protótipo internacional ATK) de 59 isolados, incluindo as 17 sequências de Londrina e região e de São Paulo (número de acesso no GenBank JF271836-JF271852) em negrito, construída usando o modelo evolutivo GTR+G, usando o PAUP v4b10. Valores de *bootstrap* acima de 70% e *zero length* com $p<0.001$ (**) e $p\leq0.05$ (*) estão retratados nos ramos. O isolado mel5 (HTLV-1c) foi usado como grupo externo.

A análise molecular das sequências de LTR do HTLV-1, usando o programa MEGA4, mostrou similaridade de nucleotídeos de 98,8% entre as sequências do estudo, 97,4% em comparação com o protótipo internacional ATK, e 90,3% em comparação com o protótipo internacional mel5 (HTLV-1c). As quatro sequências (BRLO15-02, BRLO30-02, BRLO34-02 e BRSP320-09) que apresentaram maior similaridade com o ATK agruparam separadamente na árvore de LTR ($p \leq 0,001$ e *bootstrap*=96%; cluster B), e possuem as substituições de nucleotídeos C386T e T594C. Todas, exceto estas quatro sequências apresentaram as substituições de nucleotídeos T500A, A549G, G676A, T766C e T767G (cluster A), em relação ao ATK, alinhadas usando a ferramenta ClustalW do programa BioEdit (MAGRI *et al*., 2011, 2012, **Anexos G** e **H**).

Além disso, a presença de mutações pontuais nos TRE-1 e TRE-2 da região LTR do HTLV-1, recentemente descritas na literatura como associadas com o aumento da carga proviral em indivíduos assintomáticos (NETO *et al*., 2011) foi pesquisada em 10 sequências de São Paulo do presente estudo (número de acesso no GenBank JF271843-JF271852) e mais 14 sequências novas de São Paulo (número de acesso no GenBank JX280947- JX280960). Das 24 sequências LTR de HTLV-1, a mutação G232A no TRE-1 foi detectada em 16 (66,7%) sequências e a mutação A184G no TRE-2 em 13 (54,2%). Além disso, 13 sequências (54,2%) tinham as duas mutações, três (12,5%) apresentaram apenas a mutação G232A no TRE-1, nenhuma tinha a mutação A184G no TRE-2 sozinha, e oito (33,3%) não tinham mutações (MAGRI *et al*., 2012c, **Anexo I**).

5.1.2 HTLV-1 - *env*

Usando os protocolos adaptados para região *env* do HTLV-1, com base na descrição de CATERINO-DE-ARAUJO *et al*., 2000, foi possível amplificar por PCR e *n*-PCR e sequenciar 16 isolados. Produtos de *env* de 705 pb foram sequenciados (nt. 5612-6318 em relação ao ATK) e os resultados obtidos corroboraram os da região LTR, ou seja, presença do subtipo Cosmopolita HTLV-1a. A **Figura 4** é representativa de uma amostra analisada pela ferramenta Genotyping-NCBI que mostra seu subtipo na cor vermelha.

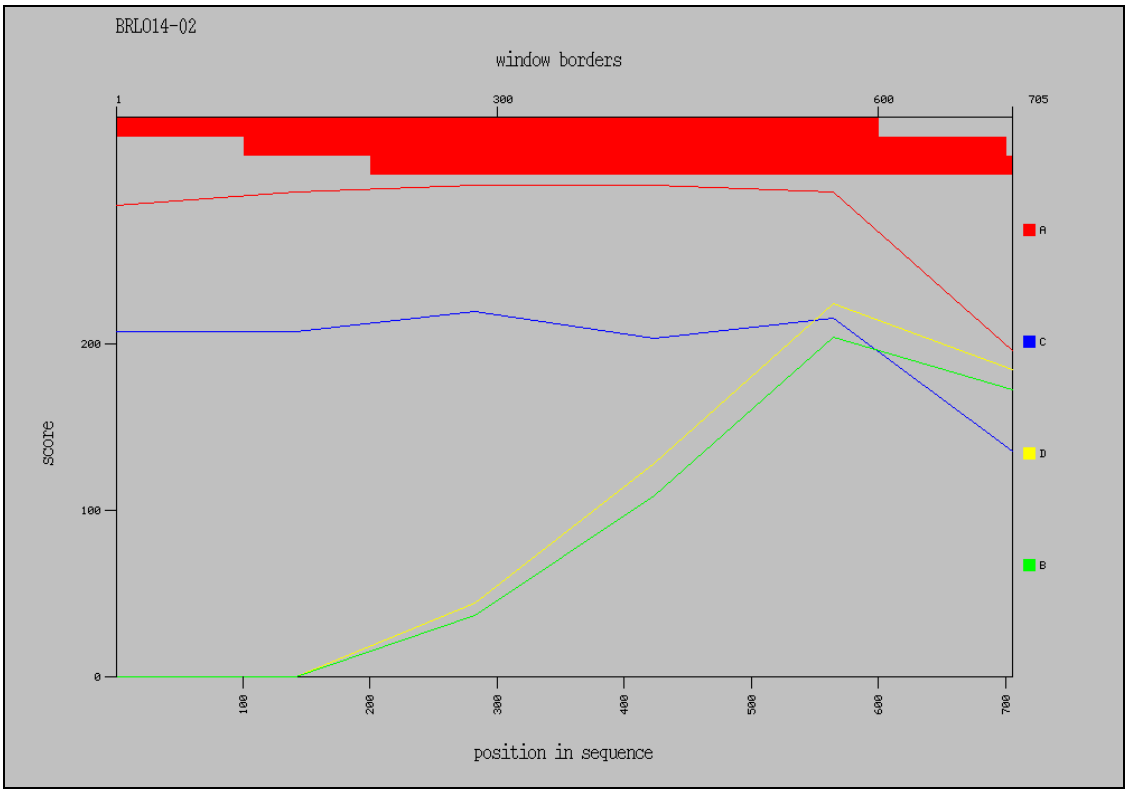


Figura 4. Subtipo do HTLV-1 gerado pela ferramenta Genotyping-NCBI a partir da sequência da região *env* da amostra BRLO14-02. A parte superior do gráfico mostra a sequência do presente estudo, com a cor vermelha referente ao seu subtipo (A), definido através da comparação com banco de dados de sequências do NCBI.

Foram construídas árvores filogenéticas com um segmento de 705 pb de 44 sequências de *env* do HTLV-1 disponíveis em GenBank, incluindo as 15 novas sequências de Londrina e região e de São Paulo (o isolado BRLO37-02 não entrou nessa análise pois sua sequência foi obtida posteriormente). O melhor modelo evolutivo foi o HKY+i+G. As árvores filogenéticas de ML e NJ apresentaram topologias semelhantes, agrupando os 15 isolados no subtipo HTLV-1a. Portanto, de acordo com as ferramentas Genotyping-NCBI e análise filogenética, todos os isolados do presente estudo, pertencem ao subtipo Cosmopolita HTLV-1a, apresentando valor de *bootstrap* de 80% e $p<0,001$ (**Figura 5**) (MAGRI *et al*., 2011, 2012a, **Anexos G** e **H**).

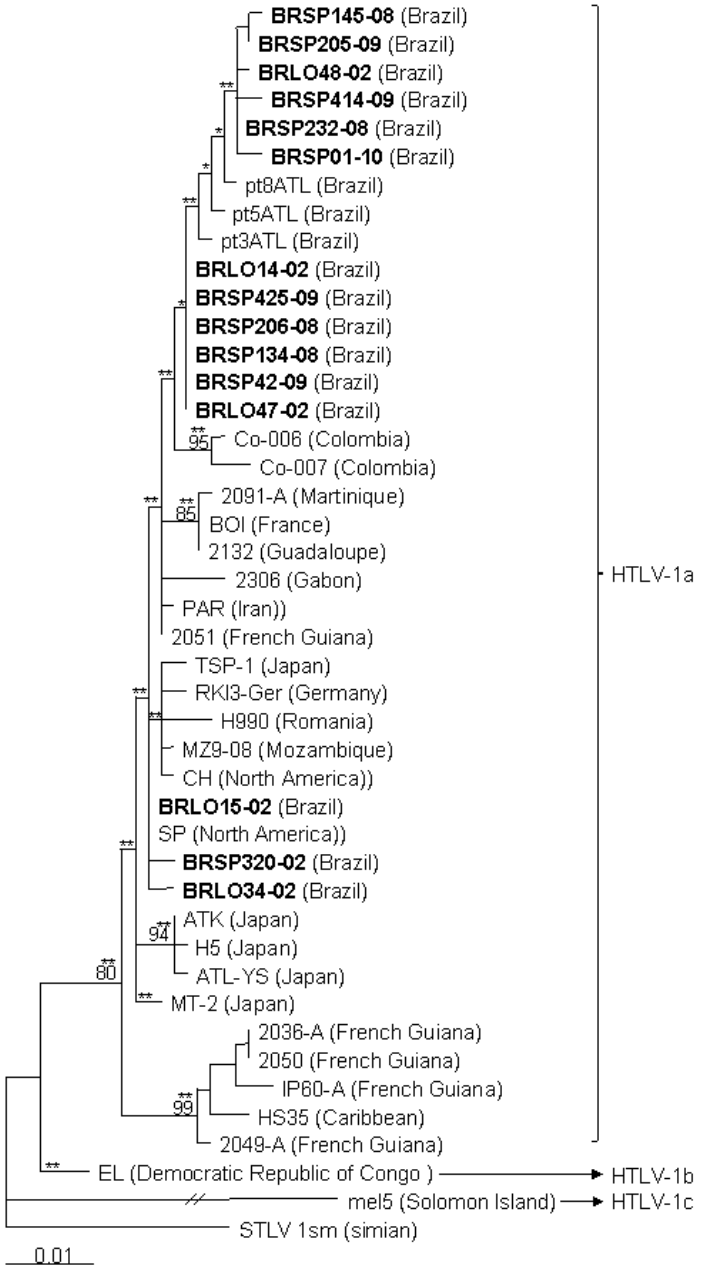


Figura 5. Árvore filogenética *Maximum Likelihood* da região *env* do HTLV-1 com 705 pb (posição 5614-6318 em relação ao protótipo internacional ATK) de 44 isolados, incluindo as 15 sequências de Londrina e região e de São Paulo (número de acesso no GenBank HM770426-HM770440) em negrito, construída usando o modelo evolutivo HKY+i+G, usando o PAUP v4b10. Valores de *bootstrap* acima de 70% e *zero length* com $p<0.001$ (**) e $p\leq0.05$ (*) estão retratados nos ramos. O isolado mel5 (HTLV-1c) foi usado como grupo externo.

A análise molecular das sequências de *env* do HTLV-1, usando o programa MEGA4, revelou similaridade de nucleotídeos de 99,5% entre as sequências

brasileiras, 99% em comparação com o ATK, e 91,6% em comparação com o protótipo internacional mel5 (HTLV-1c). As três sequências (BRLO15-02, BRLO34-02 e BRSP320-09) que apresentaram maior similaridade com o ATK agruparam separadamente na árvore ($p \leq 0{,}001$). Todas, exceto estas três sequências apresentaram as substituições de nucleotídeos T5637G, T5730C e A6120G, em relação ao ATK, alinhadas usando a ferramenta ClustalW. Seis (40%) sequências apresentaram a troca de aminoácido Valina para Isoleucina, V1981I (**Figura 6**) e agruparam juntas na árvore de *env* (BRLO48-02, BRSP145-08, BRSP205-09, BRSP232-08, BRSP414-09 e BRSP01-10). (MAGRI *et al*., 2011, 2012a, **Anexos F** e **G**)

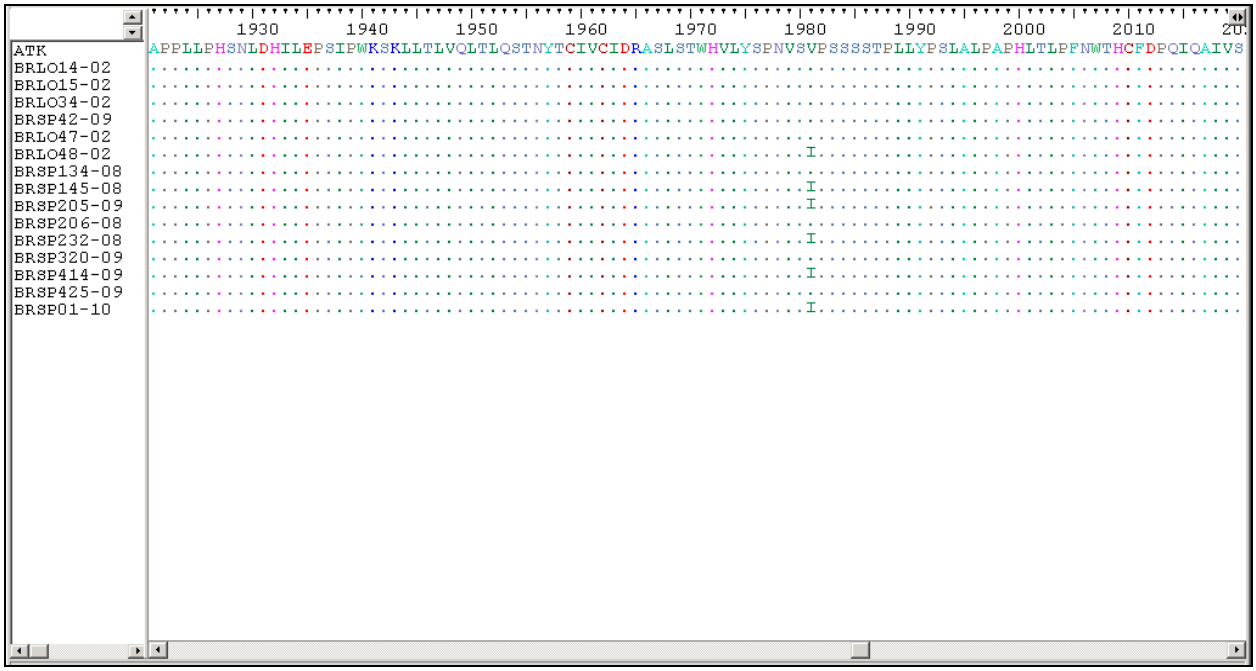


Figura 6. Alinhamento de aminoácidos da região *env* do HTLV-1 (705 pb) usando a ferramenta ClustalW do programa BioEdit 7.0.5.3, mostrando a substituição de Valina para Isoleucina (V-I) na posição 1981, em seis amostras do Paraná (BRLO) e de São Paulo (BRSP), em relação ao protótipo internacional Mo.

5.1.3 HTLV-1 - *tax*

Usando os protocolos adaptados para região *tax* do HTLV-1, com base em descrição de FURUKAWA *et al*., 2000, a *n*-PCR gerou um fragmento de 1119 pb.

Foi possível amplificar por PCR e *n*-PCR e sequenciar 13 isolados, sendo cinco de Londrina e região e oito de São Paulo.

As sequências de *tax* de 1059 pb (nt. 7324-8382 em relação ao protótipo ATK) quando analisadas pela ferramenta Genotyping-NCBI confirmaram que todas pertencem ao subtipo Cosmopolita HTLV-1a. A **Figura 7** mostra o resultado de uma amostra representativa do presente estudo.

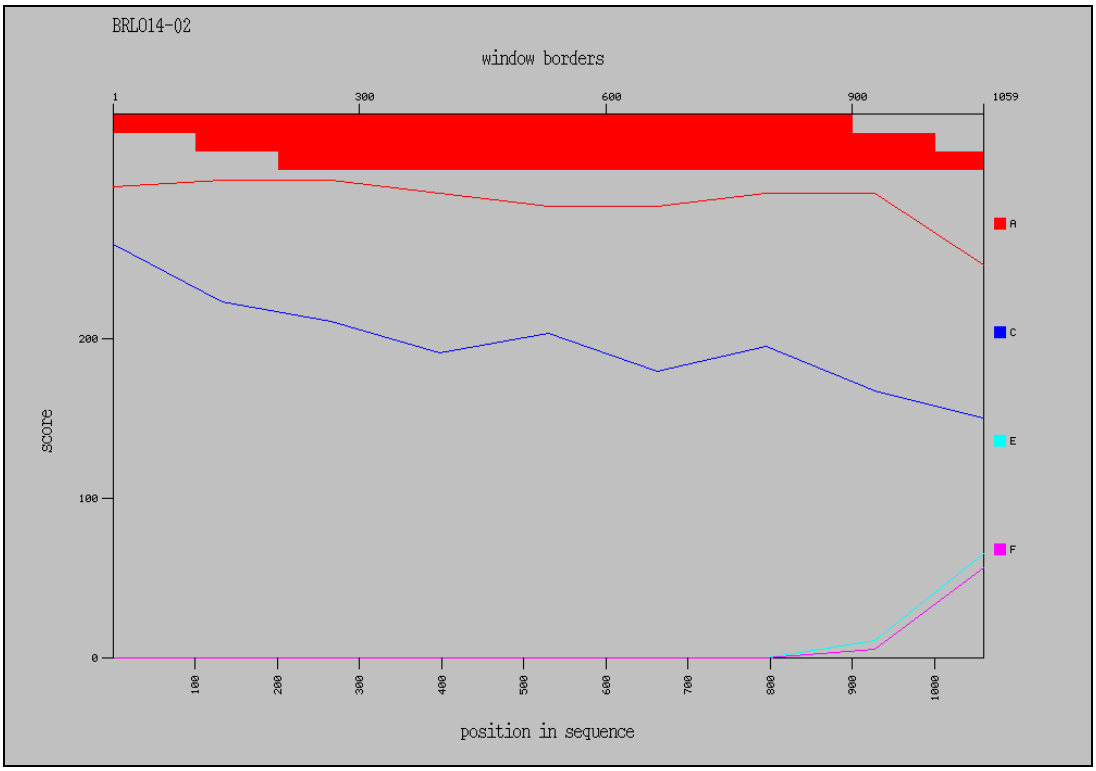


Figura 7. Subtipo do HTLV-1 gerado pela ferramenta Genotyping-NCBI a partir da sequência da região *tax* da amostra BRLO14-02. A parte superior do gráfico mostra a sequência do presente estudo, com a cor vermelha referente ao seu subtipo (A), definido através da comparação com banco de dados de sequências do NCBI.

Foram construídas árvores filogenéticas com um segmento de 977 pb de 49 sequências de *tax* do HTLV-1 disponíveis em GenBank, incluindo as 13 novas sequências de Londrina e região e de São Paulo. O melhor modelo evolutivo foi o TrN+G. As árvores filogenéticas de ML e NJ (**Figura 8**) apresentaram topologias semelhantes, agrupando os 13 isolados no subtipo HTLV-1a. Na árvore filogenética foi possível observar que todas os isolados do estudo pertencem ao genótipo *tax*A agrupados em dois *clusters* diferentes, o *cluster* A e *cluster* B da América Latina, surportados por valores de $p \leq 0.05$ (MAGRI *et al*., 2012b, **Anexo J**).

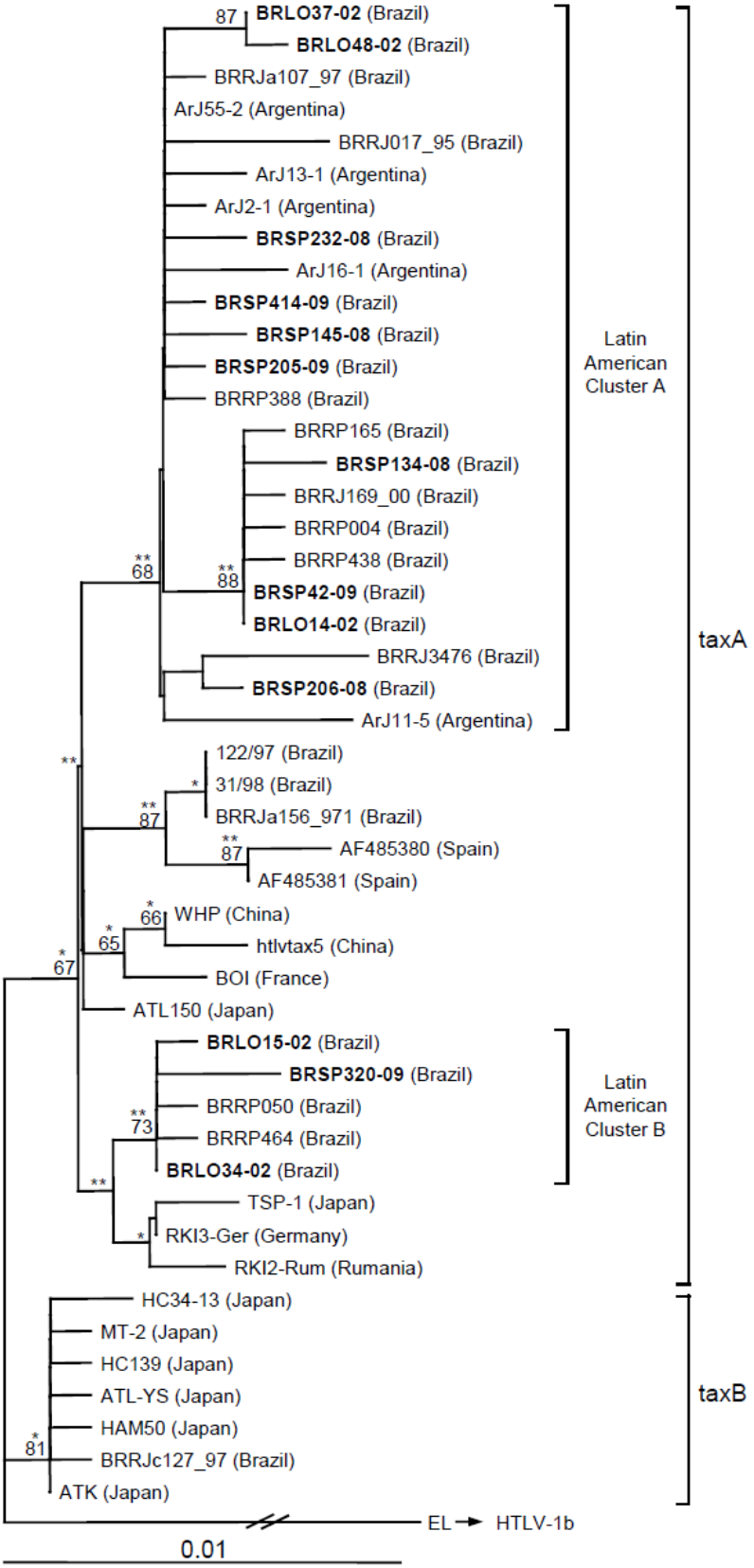


Figura 8. Árvore filogenética *Neighbor Joining* da região *tax* do HTLV-1 com 977 pb (posição 7378–8354 em relação ao protótipo internacional ATK) de 49 isolados,

incluindo as 13 sequências de Londrina e região e de São Paulo (número de acesso no GenBank JN887698-JN887710) em negrito, construída usando o modelo evolutivo TrN+G, usando o PAUP v4b10. Valores de *bootstrap* acima de 65% e *zero length* com $p<0.001$ (**) e $p\leq0.05$ (*) estão retratados nos ramos. O isolado EL (HTLV-1b) foi usado como grupo externo.

A análise molecular das sequências de *tax* do HTLV-1, usando o programa MEGA4, revelou similaridade de nucleotídeos de 99,5% entre todas as sequências do estudo, também quando elas foram estratificadas em dois grupos, um de Londrina e região e outro de São Paulo. A análise das sequências em relação ao protótipo internacional ATK mostrou semelhança de nucleotídeos de 99,2%.

Quando as sequências da região *tax* do HTLV-1 (1059 pb) foram analisadas quanto à presença de mutações em comparação com o ATK, foram detectadas substituições de nucleotídeos nas posições C7401T e T7914C com uma frequência de 76,9% (exceção *cluster* B da América Latina), e C7920T, C7982T, G8231A e A8367C com uma frequência de 100% (*cluster* A e B da América Latina). Essas substituições são apresentadas na **Tabela 8** e confirmam a presença da assinatura molecular encontrada em isolados do Brasil. Duas substituições de nucleotídeos resultaram em mutação não sinônima e, portanto, geraram mudança no aminoácido correspondente. Foram elas as substituições das posições C7982T e G8231A com as trocas de aminoácido A2661V e S2744N (**Tabela 8**) (MAGRI *et al*., 2012b, **Anexo J**).

A Tabela com todas as sequências de HTLV-1 do presente estudo depositadas em Genbank encontra-se no **Anexo K**.

Tabela 19. Comparação das sequências da região *tax* do HTLV-1, mostrando as substituições de nucleotídeos, as trocas de aminoácidos e suas posições nas 13 amostras provenientes das regiões Sul e Sudeste do Brasil, em relação ao protótipo internacional ATK.

Sequencia	Posição das substituições de nucleotídeos																											
	7401	7410	7431	7476	7527	7593	7722	7908	7914	7920	7953	7974	7980	7982	8001	8002	8066	8109	8128	8184	8191	8231	8232	8288	8295	8313	8366	8367
ATK	C	C	G	T	G	C	A	T	T	C	C	C	T	C	A	A	C	A	G	C	C	G	T	A	G	T	G	A
BRLO14-02	T								C	T		T		T								A				C		C
BRLO15-02					A					T				T	G							A			A			C
BRLO34-02										T				T	G							A			A			C
BRLO37-02	T						G		C	T				T				G				A						C
BRLO48-02	T						G		C	T				T				G	A			A						C
BRSP134-08	T		A	C					C	T		T		T								A				C		C
BRSP145-08	T								C	T	T			T								A		G				C
BRSP206-08	T								C	T				T							T	A	C					C
BRSP232-08	T	A							C	T			C	T								A					A	C
BRSP42-09	T								C	T		T		T								A				C		C
BRSP205-09	T								C	T				T		G						A						C
BRSP320-09						T		C		T				T	G		G					A			A			C
BRSP414-09	T								C	T				T						T		A						C
Trocas de aa														A→V		T→A	T→R		V→I			S→N		E→G			R→H	

Legenda: aa-Aminoácido

5.2 HTLV-2

Trinta e oito amostras de DNA, sendo 28 de isolados de Londrina e região, e dez de São Paulo foram analisadas e designadas: BRLO02-02, BRLO03-02, BRLO05-02, BRLO07-02, BRLO09-02, BRLO10-02, BRLO11-02, BRLO12-02, BRLO18-02, BRLO19-02, BRLO21-02, BRLO22-02, BRLO23-02, BRLO24-02, BRLO25-02, BRLO26-02, BRLO27-02, BRLO28-02, BRLO29-02, BRLO31-02, BRLO32-02, BRLO35-02, BRLO37-02, BRLO38-02, BRLO39-02, BRLO43-02, BRLO45-02, BRLO49-02, BRSP91-08, BRSP111-08, BRSP160-08, BRSP171-08, BRSP172-08, BRSP239-08, BRSP319-08, BRSP348-08, BRSP84-09 e BRSP130-09.

5.2.1 HTLV-2 - LTR

Os protocolos estabelecidos para a região LTR do genoma proviral do HTLV-2 foram baseados em protocolo previamente descrito (MORIMOTO *et al*., 2007). Com eles foi possível amplificar por PCR e *n*-PCR e sequenciar 23 isolados.

Produtos de 458 pb (nt. 181-638 em relação ao protótipo internacional Mo) foram obtidos e sequenciados. Os 23 isolados foram classificados como subtipo HTLV-2a. As árvores filogenéticas foram construídas primeiramente com 88 sequências de LTR do HTLV-2 disponíveis em GenBank, incluindo 18 novas sequências, sendo 14 de Londrina e região (PR) e quatro sequências de São Paulo do ano de 1994 (designadas SP17, SP281, SP305 e SP510). O melhor modelo evolutivo foi o HKY+i+G. As árvores filogenéticas de ML (**Figura 9**) e NJ apresentaram topologias semelhantes, agrupando os 18 isolados no subtipo HTLV-2a (MAGRI *et al*., 2010, **Anexo L**).

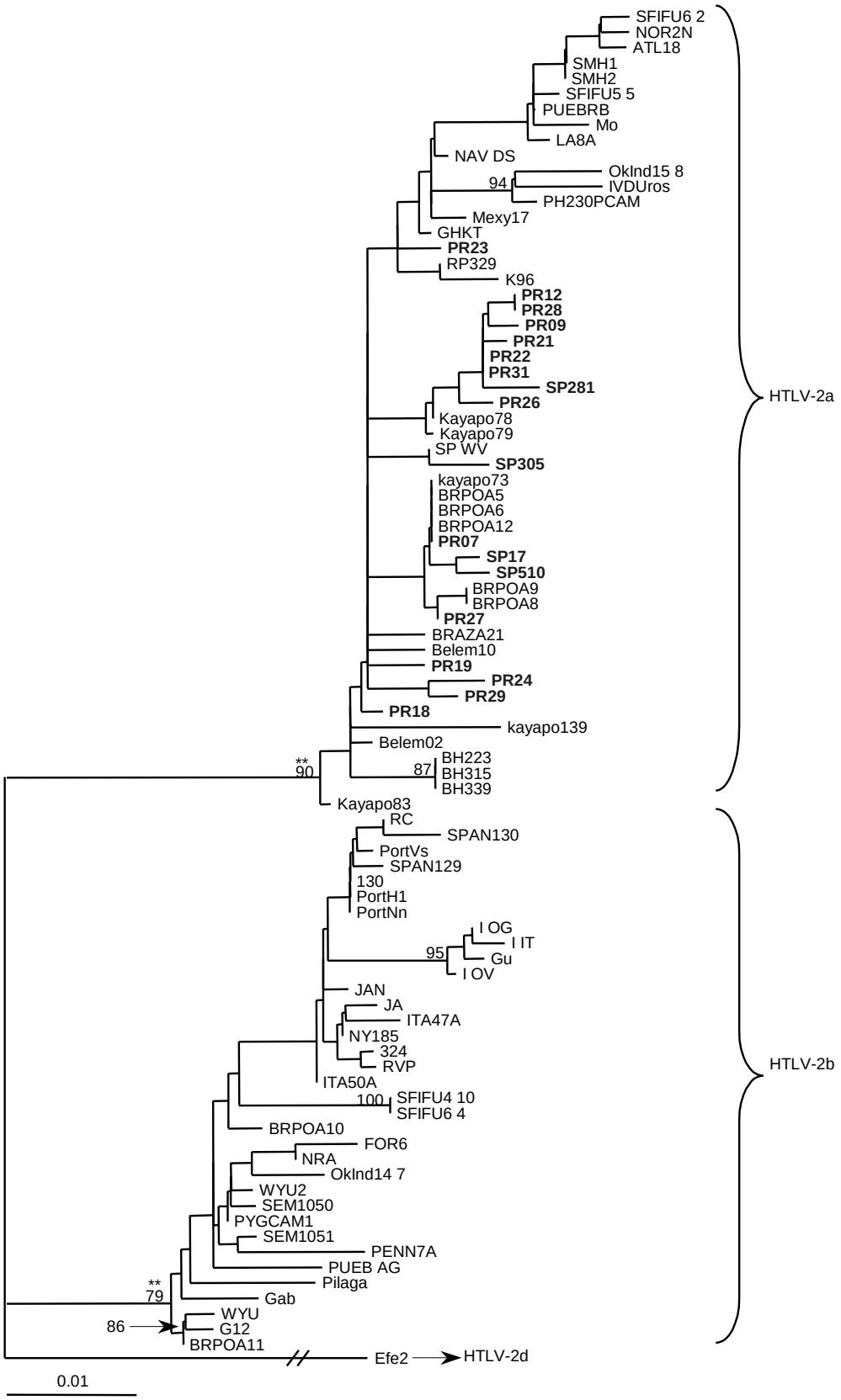


Figura 9. Árvore filogenética *Neighbor Joining* da região LTR do HTLV-2 com 458 pb (posição 181-638 em relação ao protótipo internacional Mo) de 88 isolados, incluindo as 18 sequências de Londrina e região (número de acesso no GenBank GU573730-

GU573743) e antigas de São Paulo em negrito, construída usando o modelo evolutivo HKY+i+G, usando o PAUP v4b10. Valores de *bootstrap* acima de 70% e *zero length* com $p<0.001$ (**) e $p\leq0.05$ (*) estão retratados nos ramos. O isolado Efe2 (HTLV-2d) foi usado como grupo externo.

As similaridades entre as 18 sequências de Londrina e região, e entre as sequências antigas de São Paulo foram de 99,2% e 99,0%, respectivamente. Análises comparativas entre as sequências de nucleotídeos de Londrina e região e as antigas de São Paulo revelaram que elas estão relacionadas, com similaridade de 98,9%. Essa mesma similaridade (98,9%) foi encontrada quando as sequências obtidas foram comparadas com o protótipo internacional Mo (HTLV-2a) (MAGRI *et al*., 2010, **Anexo L**).

Essas mesmas 18 sequências foram analisadas em comparação com a metodologia de RFLP. Os mapas de restrição de endonucleases dos produtos amplificados concordaram com os encontrados na RFLP. Houve quatro grupos, denominados de: a4Br, a5Br, a6Br, e a6Br', com base nas descrições de CATERINO-DE-ARAUJO *et al.*, 1997, SWITZER *et al.*, 1995, e EIRAKU *et al.*, 1995. Os fragmentos encontrados estão descritos na **Tabela 20**.

Tabela 20. Fragmentos (expressos em número de nucleotídeos) que resultaram da clivagem de produto de PCR de 458 pb da região LTR do HTLV-2 (nt. 181-638) dos isolados de Londrina e região (PR) e de São Paulo (SP).

	Código da Sequência			
	PR18, PR23, PR24, PR27, PR29, SP305, PR19	**PR7, PR17, SP510**	**PR9, PR12, PR21, PR22, PR28, PR31, SP281**	**PR26**
Enzimas de restrição	**Subgrupo**			
	HTLV-2a4	**HTLV-2a5Br**	**HTLV-2a6Br**	**HTLV-2a6Br'**
***Ava*II**	225/233	225/233	225/233	225/233
***Dra*II**	458	458	458	458
***Ban*II**	293/165	135/158/165	137/156/165	293/165
***Ava*II**	458	458	458	458
***Bsu*36I**	303/155	303/155	303/155	303/155
***Bgl*I**	450/8	450/8	450/8	450/8
***Sma*I**	340/118	340/118	458	458

Foi observada boa correlação entre os ramos das árvores filogenéticas (**Figura 10**), os grupos da RFLP e os mapas de restrição de endonucleases (**Figura 11**).

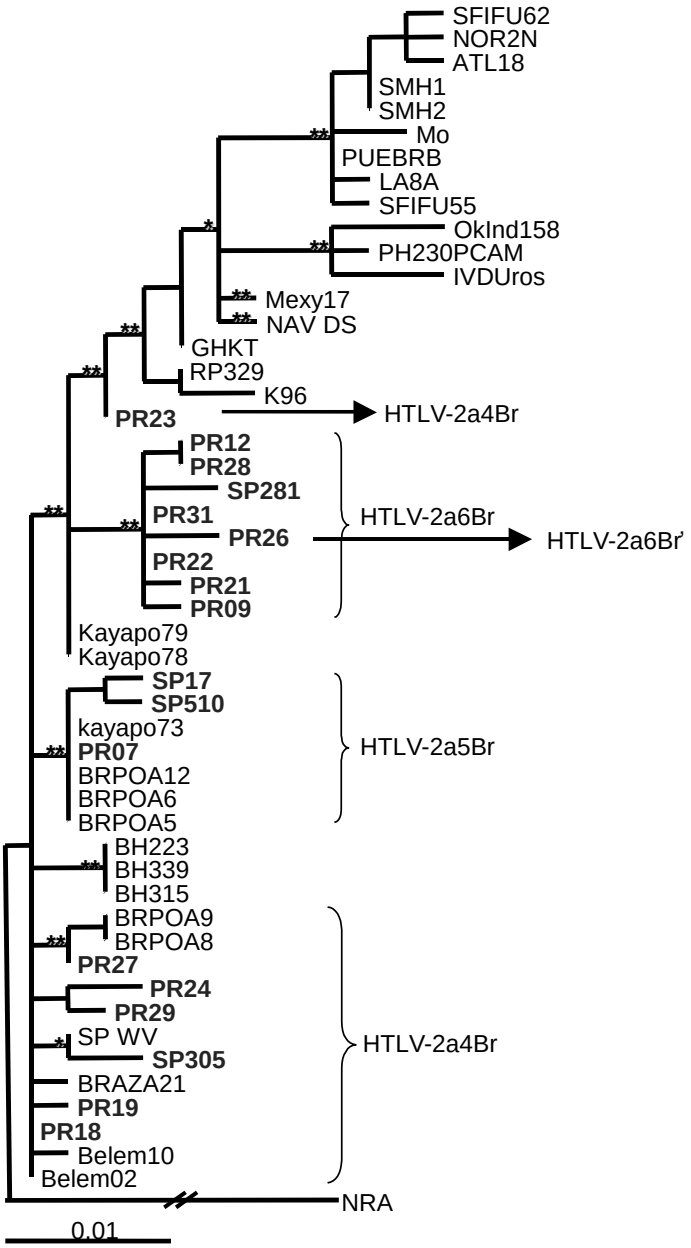


Figura 10. Árvore filogenética *Maximum Likelihood* da região LTR do HTLV-2 com 458 pb, (posição 181-638 em relação ao protótipo internacional Mo) de 51 isolados, incluindo as 18 sequências de Londrina e região (número de acesso no GenBank GU573730-GU573743) e antigas de São Paulo em negrito, construída usando o modelo evolutivo HKY+i+G, usando o PAUP v4b10. Valores de *zero length* com $p<0.001$ (**) e $p\leq0.05$ (*) estão retratados nos ramos. O isolado NRA (HTLV-2b) foi usado como grupo externo (MAGRI *et al*., 2010, **Anexo L**).

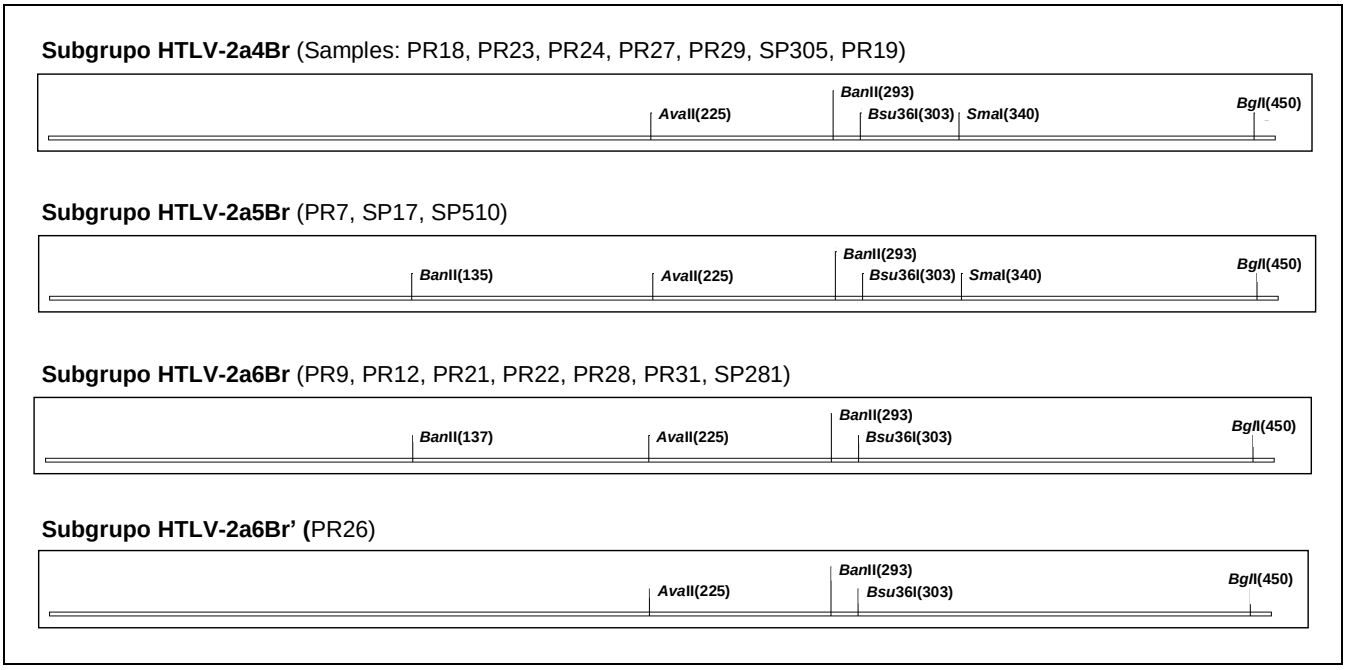


Figura 11. Mapas de restrição enzimática da região LTR do HTLV-2 (nt. 181-638) das sequências estudadas, usando as ferramentas Sequencher e NEBcutter.

Posteriormente, uma nova árvore agora com as sequências de 23 isolados foi construída corroborando os dados preliminares (**Figura 12**) (MAGRI *et al*., 2013, **Anexo M**).

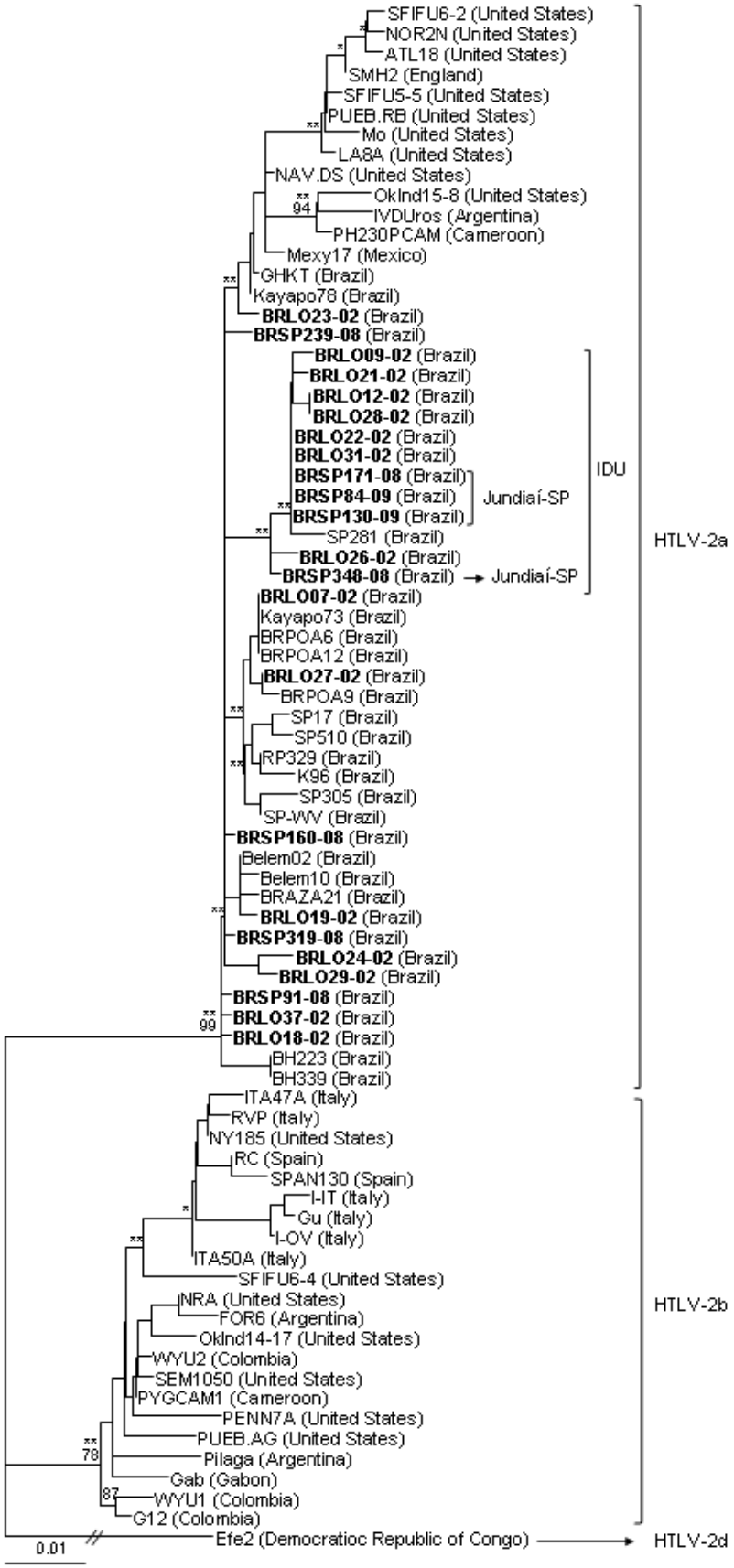


Figura 12. Árvore filogenética *Neighbor Joining* da região LTR do HTLV-2 com 458 pb (posição 181-638 em relação ao protótipo internacional Mo) de 77 isolados,

incluindo as 23 sequências de Londrina e região e de São Paulo (número de acesso no GenBank GU573730-GU573743 e JQ435902-JQ435910) em negrito, construída usando o modelo evolutivo HKY+i+G, usando o PAUP v4b10. Valores de *bootstrap* acima de 65% e *zero length* com $p<0.001$ (**) e $p\leq0.05$ (*) estão retratados nos ramos. O isolado Efe2 (HTLV-2d) foi usado como grupo externo (MAGRI *et al*., 2013, **Anexo M**).

5.2.2 HTLV-2 - *env*

Os protocolos estabelecidos para a região *env* do genoma proviral do HTLV-2 foram baseados em protocolos previamente descritos por EGAN *et al*., 1999, SHINDO *et al*., 2002 e MORIMOTO *et al*., 2007. Com eles foi possível amplificar por PCR e *n*-PCR e sequenciar 37 isolados, sendo 27 de Londrina e região e 10 de São Paulo.

As sequências de *env* de 1065 pb (nt. 5573-6637 em relação ao Mo) quando analisadas pela ferramenta Genotyping-NCBI confirmaram que todas pertencem ao subtipo HTLV-2a (provavelmente variante -2c) e apenas um isolado ao subtipo HTLV-2b (MAGRI *et al*., 2013, **Anexo M**). A **Figura 13** mostra o resultado de uma amostra representativa do subtipo -2a do presente estudo.

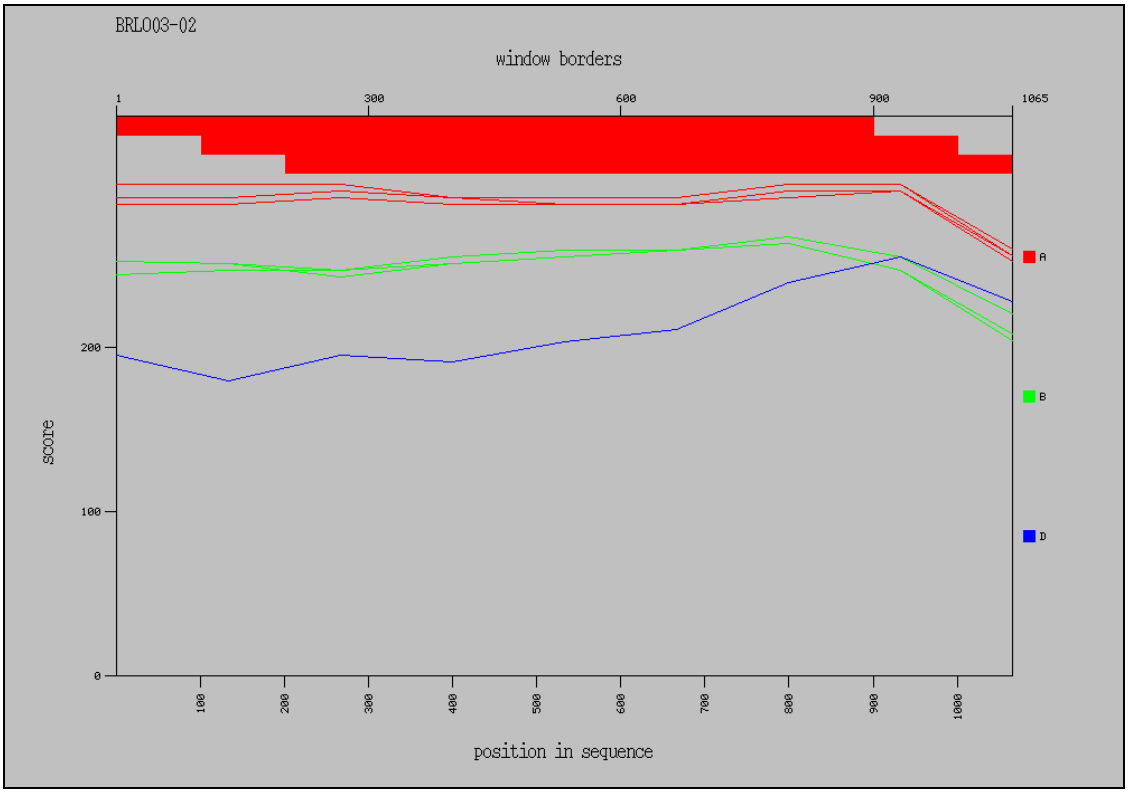


Figura 13. Subtipo do HTLV-2 gerado pela ferramenta Genotyping-NCBI a partir da sequência da região *env* da amostra BRLO03-02. A parte superior do gráfico mostra a sequência do presente estudo, com a cor vermelha referente ao seu subtipo (A), definido através da comparação com banco de dados de sequências do NCBI.

Foram construídas árvores filogenéticas com um segmento de 1065 pb de 50 sequências de *env* do HTLV-2 disponíveis na base de dados GenBank, incluindo 36 novas sequências de Londrina e região e de São Paulo. O melhor modelo evolutivo para a construção filogenética foi o HKY+i+G. As árvores filogenéticas de ML e NJ (**Figura 14**) apresentaram topologias semelhantes, agrupando 36 isolados no subtipo HTLV-2a (provavelmente variante -2c) e apenas um isolado no subtipo HTLV-2b (MAGRI *et al*., 2013, **Anexo M**).

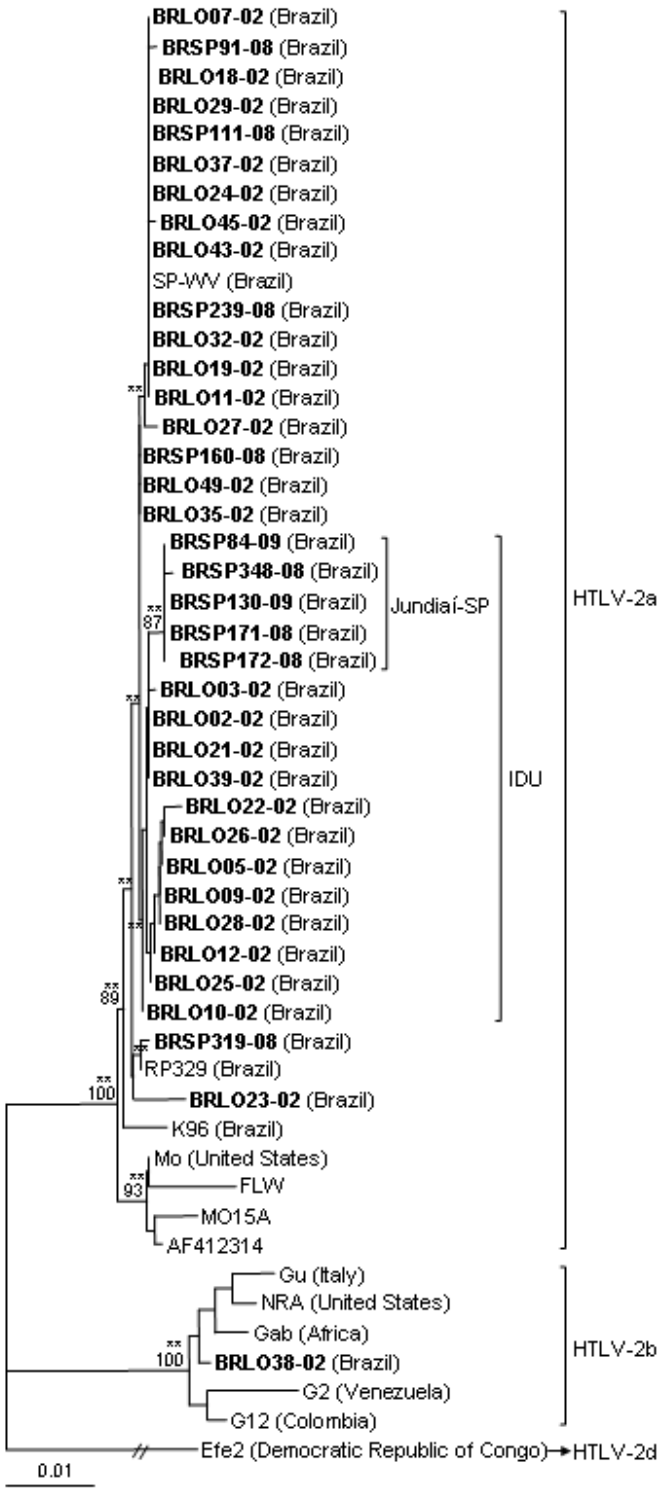


Figura 14. Árvore filogenética *Neighbor Joining* da região *env* do HTLV-2 *com* 1065 pb (posição 5573-6637 em relação ao protótipo internacional Mo) de 50 isolados, incluindo as 37 sequências de Londrina e região e de São Paulo (número de acesso no GenBank HM770390-HM770425 e JQ435911) em negrito, construída usando o modelo evolutivo HKY+i+G, usando o PAUP v4b10. Valores de *bootstrap* acima de 70% e *zero length* com $p<0.001$ (**) e $p\leq0.05$ (*) estão retratados nos ramos. O

isolado Efe (HTLV-2d) foi usado como grupo externo (MAGRI *et al*., 2013, **Anexo M**).

A análise das sequências em relação a dados epidemiológicos mostrou que existe uma associação de variantes virais e tipo de exposição ao vírus e o local de origem do paciente: UDEV (p<0,001) e com isolados de Jundiaí em São Paulo (*bootstrap*>70%, p<0,001).

A análise molecular das sequências parciais de *env* do HTLV-2, usando o MEGA4, revelou uma alta similaridade de nucleotídeos entre os isolados brasileiros (99,6%) e com o protótipo Mo (99,2%), em oposição ao protótipo NRA (HTLV-2b, com 95,7% de similaridade).

Quanto à presença de mutações, foram observadas seis trocas de nucleotídeos muito conservadas entre os isolados do estudo nas posições T5726C, A5794G, T6109C, C6226T, C6379T, e A6580G, com uma frequência de 100%, 97,2%, 91,6%, 100%, 100% e 100% em relação ao protótipo internacional Mo, respectivamente. Dessas substituições de nucleotídeos a única que era uma mutação não sinônima e, portanto, gerou mudança no aminoácido foi a da posição T5726C. Quando as sequências foram convertidas em aminoácido observou-se a troca S1909P (**Figura 15**).

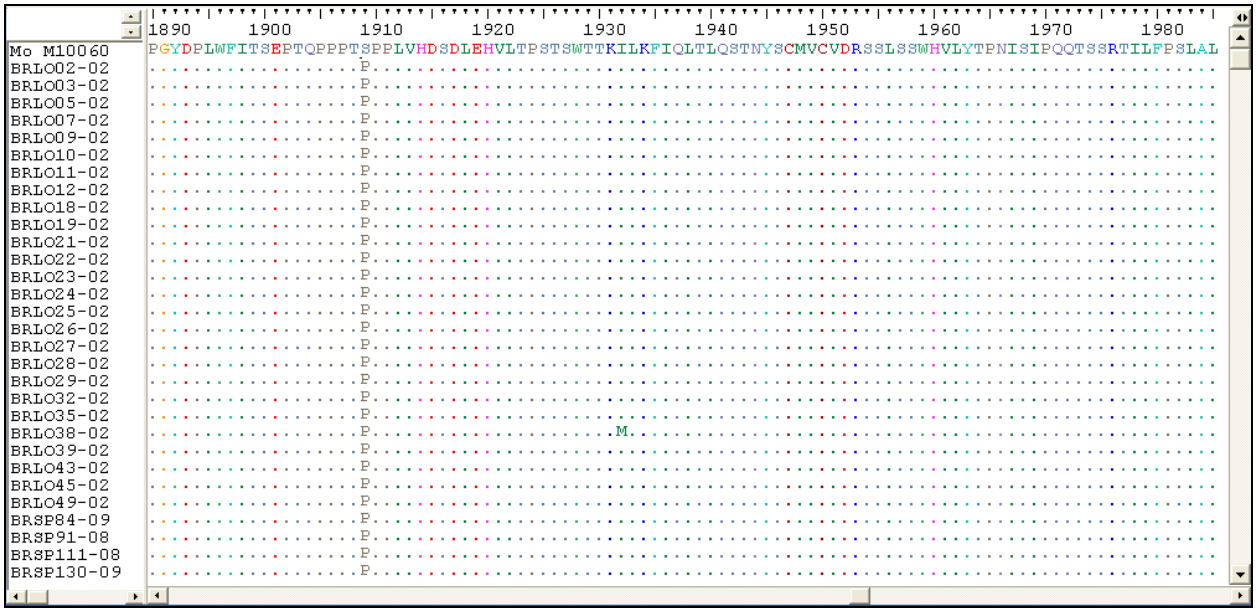


Figura 15. Alinhamento de aminoácidos de região *env* do HTLV-2 com 1065 pb usando a ferramenta ClustalW do programa BioEdit 7.0.5.3, mostrando a

substituição de Serina para Prolina (S-P) na posição 1909 em relação ao protótipo internacional Mo, nas amostras de Londrina e região (BRLO) e de São Paulo (BRSP).

5.2.3 HTLV-2 – *tax*

Os protocolos estabelecidos para a região *tax* do genoma proviral do HTLV-2 foram baseados em protocolos previamente descritos por EIRAKU *et al*., 1996. Com eles foi possível amplificar por PCR e *n*-PCR e sequenciar 25 isolados, sendo 19 de Londrina e região e seis de São Paulo.

Sequências de 1068 pb (nt. 7213-8280 em relação ao protótipo internacional Mo) foram analisadas com a ferramenta Genotyping-NCBI, e confirmaram que todos os isolados do presente estudo pertencem ao subtipo HTLV-2a, exceto o isolado BRLO38-02 que pertence ao subtipo HTLV-2b (MAGRI *et al*., 2013, **Anexo M**). A **Figura 16 a-)** mostra o resultado gerado pelo Genotyping-NCBI, de uma amostra representativa de *tax* do HTLV-2a, e a **Figura 16 b-)** mostra o resultado do isolado BRLO38-02 (HTLV-2b).

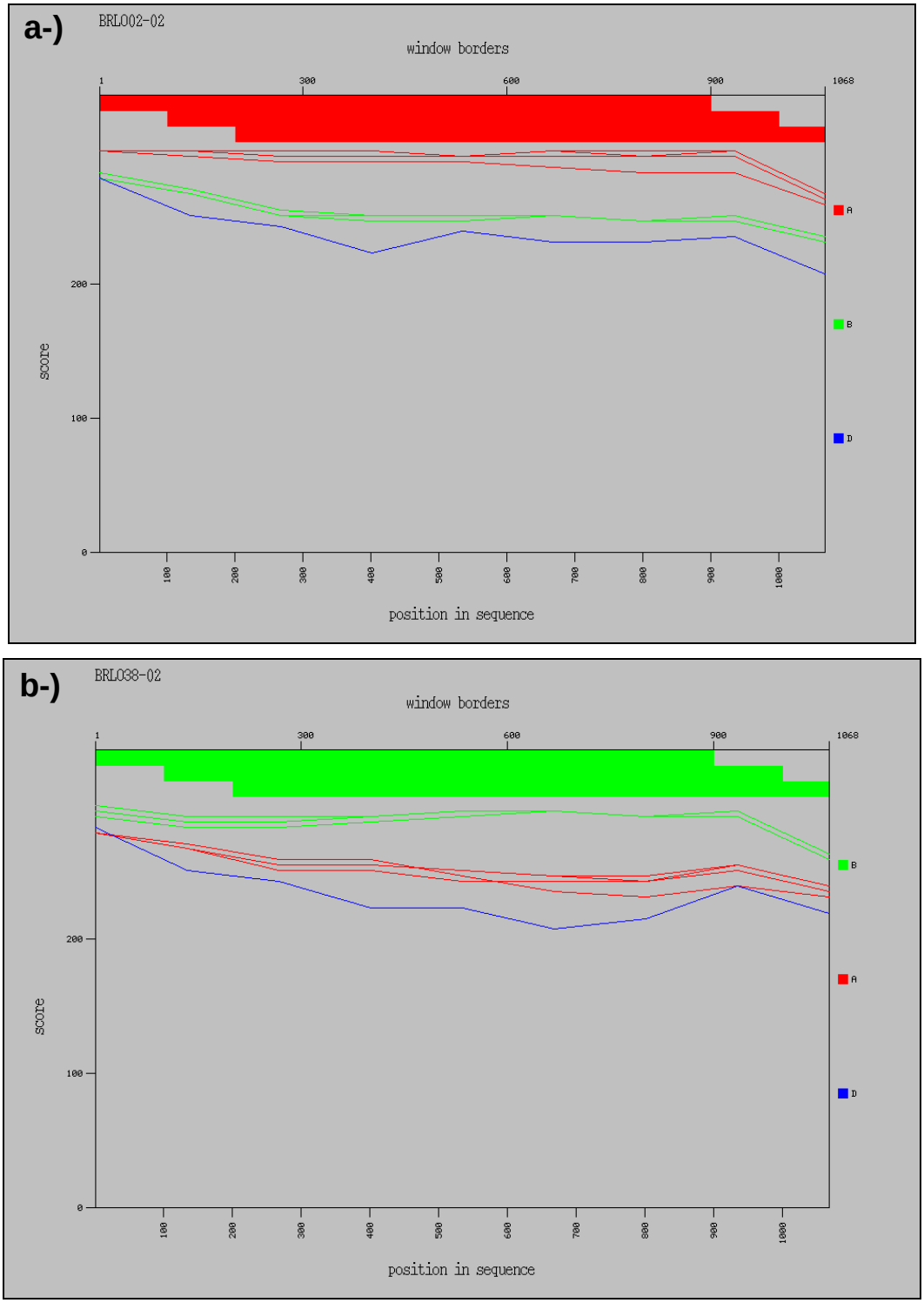


Figura 16. Subtipo do HTLV-2 gerado pela ferramenta Genotyping-NCBI a partir da sequência da região *tax* definido através da comparação com banco de dados de sequências do NCBI. Na parte superior **a-)** a sequência da amostra BRLO02-02, com a cor vermelha referente ao seu subtipo (A); na parte inferior **b-)** a amostra BRLO38-02 com a cor verde referente ao seu subtipo (B).

Foram construídas árvores filogenéticas com o segmento de 1068 pb de 43 sequências de *tax* do HTLV-2 disponíveis na base de dados GenBank, incluindo 25 novas sequências de Londrina e região e de São Paulo. O melhor modelo evolutivo para a construção filogenética foi o TrN+G. As árvores filogenéticas de ML (**Figura 17**) e NJ apresentaram topologias semelhantes, agrupando 24 isolados no subtipo HTLV-2a (variante -2c) e apenas um isolado no subtipo HTLV-2b (BRLO38-02) (MAGRI *et al*., 2013, **Anexo M**).

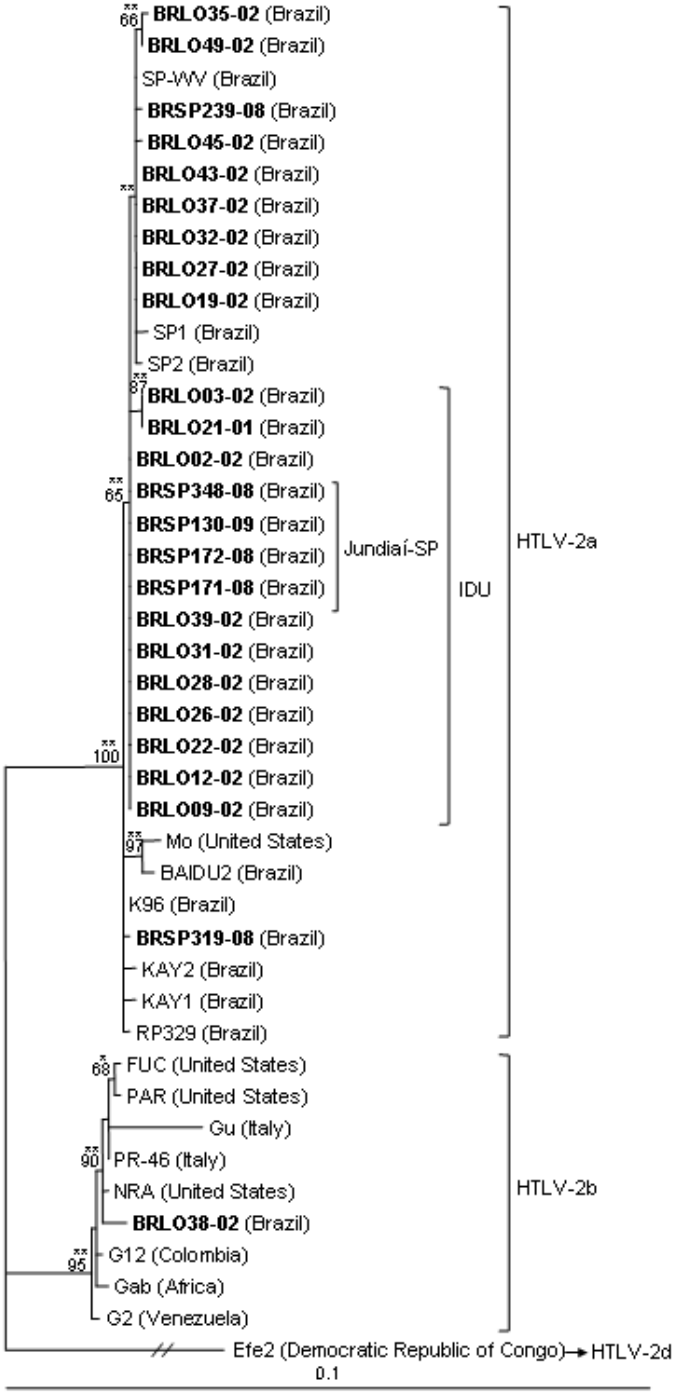


Figura 17. Árvore filogenética *Maximum Likelihood* da região *tax* do HTLV-2 com 1068 pb (posição 7213-8280 em relação ao protótipo internacional Mo) de 43 isolados, incluindo as 25 sequncias de Londrina e região e de São Paulo (número de acesso no GenBank JN887712-JN887736) em negrito, construída usando o modelo evolutivo TrN+G, usando o PAUP v4b10. Valores de *bootstrap* acima de 65% e *zero length* com $p<0.001$ (**) e $p\leq0.05$ (*) estão retratados nos ramos. O isolado Efe2 (HTLV-2d) foi usado como grupo externo. (MAGRI *et al*., 2013, **Anexo M**)

A análise molecular das sequências de *tax* do HTLV-2 subtipo a (todas exceto a BRLO38-02) usando o programa MEGA4, revelou similaridade de nucleotídeos de 99,9% entre as sequências do estudo, também quando elas foram estratificadas em dois grupos, um de Londrina e região e outro de São Paulo. A análise das sequências em relação ao protótipo internacional Mo mostrou semelhança de nucleotídeos de 99,3%. A similaridade entre a sequência BRLO38-02 em comparação com o NRA (HTLV-2b) foi de 99,5%.

Quanto à presença de mutações, as principais substituições de nucleotídeos observadas foram A7819G, A7991G, A7798G, G8053C, T8203A, com uma frequência de 100%, C7611T, T7686C e A7825G com uma frequência de 96%, 92% e 36% respectivamente, em relação ao protótipo internacional Mo. Dessas substituições de nucleotídeos cinco resultaram em mutação não sinônima e, portanto, geraram mudança no aminoácido. Foram elas as substituições das posições A7819G, A7825G, A7991G, G8053C e T8203A. Quando as sequências foram convertidas em aminoácido observaram-se as trocas T2607A, I2609V, Y2664C, E2685Q e a perda do *stop codon* 2735Q, o que caracteriza a Tax longa encontrada em isolados do Brasil, com 25 aminoácidos a mais (**Figuras 18** e **19**).

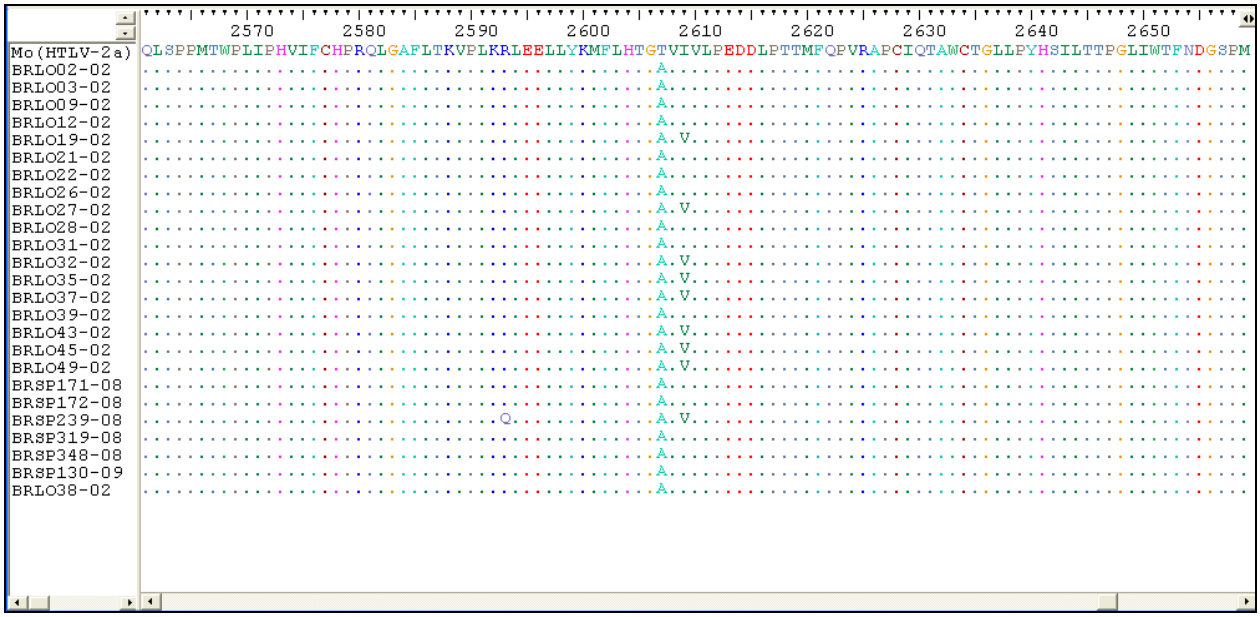


Figura 18. Alinhamento de aminoácidos da região *tax* do HTLV-2 com 1068 pb, usando a ferramenta ClustalW do programa BioEdit 7.0.5.3, mostrando as substituições de Treonina para Alanina (T→A) na posição 2607 e de Isoleucina para

Valina (I→V) na posição 2609, em 25 e 9, respectivamente, amostras de Londrina e região (BRLO) e de São Paulo (BRSP), em relação ao protótipo internacional Mo.

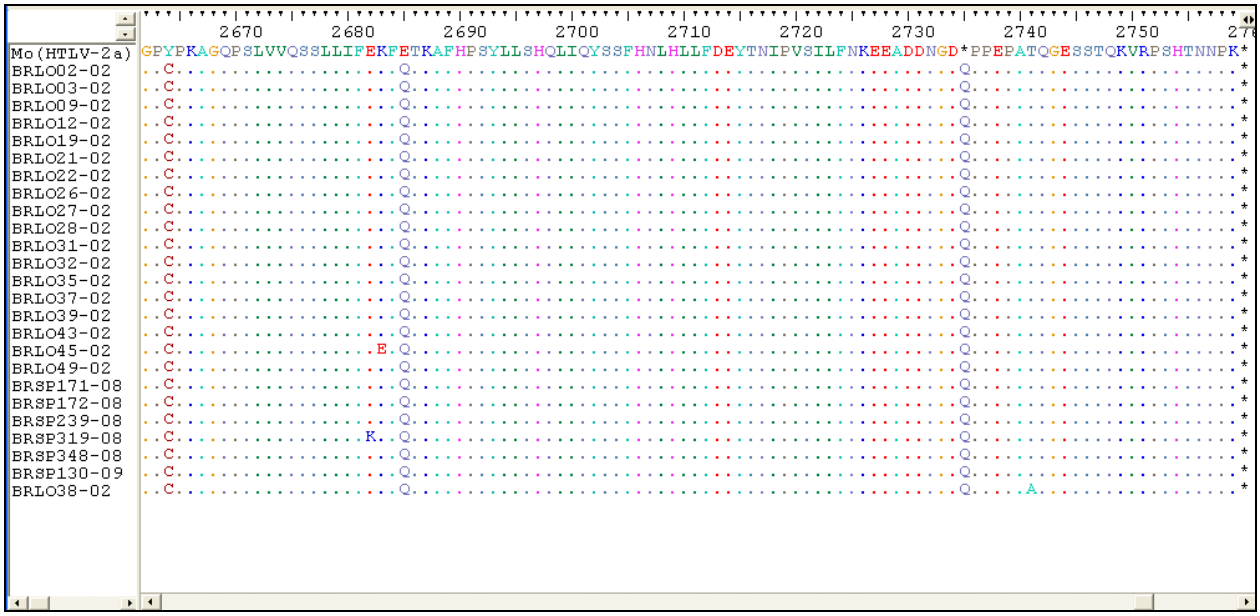


Figura 19. Alinhamento de aminoácidos da região *tax* do HTLV-2, usando a ferramenta ClustalW do programa BioEdit 7.0.5.3, mostrando as substituições de Tirosina para Cisteina (Y→C) na posição 2664, de Glutamato para Glutamina (E→Q) na posição 2685 e de *stop codon* para Glutamina (*stop codon*→Q) na posição 2735, que gerou um ganho de 25 aminoácidos na posição carboxi terminal, em todas as amostras de Londrina e região (BRLO) e de São Paulo (BRSP), em relação ao protótipo internacional Mo.

A sequência do isolado BRLO38-02 foi também alinhada com o protótipo internacional NRA que é do subtipo HTLV-2b. Foram observadas algumas trocas de nucleotídeos: T7554C, T7611C, T7902C, T8031C e G8142A. Não foi observada nenhuma troca de aminoácido.

A Tabela com todas as sequências de HTLV-2 do presente estudo depositadas em Genbank encontra-se no **Anexo N**.

Discussão

6 DISCUSSÃO

O presente estudo realizou a caracterização molecular de HTLV-1 e HTLV-2 (regiões LTR, *env* e *tax*), de isolados de pacientes coinfectados pelo HIV-1 de Londrina e região e de São Paulo (**Anexos G, H, I, J, L** e **M**).

Objetivando melhores resultados na amplificação por PCR e *n*-PCR e no sequenciamento dos isolados de HTLV-1 e HTLV-2 do presente estudo, foram utilizados alguns *primers* degenerados. Esta estratégia foi considerada importante também por outros pesquisadores, que relataram maiores taxas de sucesso na amplificação por PCR de um grande número de isolados virais, quando utilizados *primers* degenerados (LI *et al*., 2012). Além disso, procurou-se obter sequencias grandes para a realização de análises filogenéticas robustas, apesar de muitas sequências disponíveis na literatura serem relativamente pequenas. Foram também feitas alterações quanto à temperatura de pareamento dos *primers* e ciclagem. Todas estas alterações e adaptações não foram suficientes para amplificar 100% dos segmentos dos isolados de HTLV-1 e HTLV-2 do presente estudo. Uma possível explicação poderia ser a presença de mutações ainda não descritas em literatura no local de pareamento dos *primers*. Curiosamente e dando suporte a esta hipótese, a falha na amplificação de segmentos do genoma viral foi mais acentuada para o HTLV-2 nas regiões LTR e *tax*, cujos protocolos não usaram bases degeneradas e o número de sequências longas disponíveis em GenBank era pequeno. Mesmo assim, um grande número de sequências pôde ser obtido no presente trabalho.

O estudo da região LTR do HTLV-1 mostrou que existe alta similaridade entre os isolados e agrupamento em dois *clusters* da América Latina (suportados por $p<0,001$ na árvore ML da LTR). A semelhança de nucleotídeos entre as sequências de LTR do HTLV-1 foi de 98,8%. Esse achado corrobora os descritos na literatura onde semelhanças de 99,2% e 98,9%, respectivamente, foram detectadas em HTLV-1 isolados de indivíduos das cidades de Cruz das Almas e de Salvador (nordeste do Brasil), e de 99,3% e 97,3%, respectivamente, em HTLV-1 isolados de indivíduos das cidades de Fortaleza e de Rio Branco (norte do Brasil) (MAGALHÃES *et al*., 2008; MOTA-MIRANDA *et al*., 2008).

Ainda, estudos realizados nas regiões norte e nordeste do Brasil com isolados de HTLV-1 de indivíduos infectados pelo HIV, encontraram o subtipo HTLV-1a Cosmopolita circulando em quatro mulheres de Feira de Santana, estado da Bahia

(LAURENTINO *et al*., 2005), e em dois homens de Belém, estado do Pará (REGO *et al*., 2010).

Corroborando esses dados e os do presente estudo, análises filogenéticas de isolados de HTLV-1 de várias populações no Brasil confirmaram o HTLV-1a, subgrupo Transcontinental A como o prevalente no país (KASHIMA *et al*., 2006; MAGALHÃES *et al*., 2008; MOTA-MIRANDA *et al*., 2008), e sugerem que a introdução do HTLV-1 na população brasileira se deu na era pós-Colombiana inicialmente no estado da Bahia através do tráfico de escravos africanos entre os séculos dezesseis e dezessete, e talvez através de outras localidades da América Latina (ALCANTARA *et al*., 2006; MAGALHÃES *et al*., 2008; REGO *et al*., 2008; REGO *et al*., 2010). De fato, a maioria das sequências do presente estudo agruparam no *cluster* A da América Latina, apesar de algumas sequências agruparem no *cluster* B da América Latina, o que pode sugerir diferentes introduções do HTLV-1 no Brasil também em indivíduos coinfectados pelo HIV (tanto da região sul quanto da sudeste).

O HTLV-1 foi também detectado em outras regiões do Brasil, mas com uma porcentagem de casos menor do que no nordeste (CATALAN-SOARES *et al*., 2006). Apesar dos dados históricos indicarem que o movimento do tráfico de escravos foi proveniente da África Ocidental, onde apenas o subgrupo ocidental Africano (C) circula (ALCANTARA *et al*., 2006; MOTA *et al*., 2007), a caracterização molecular do HTLV-1 no Brasil mostrou que o subtipo Cosmopolita (a) do subgrupo transcontinental A é o mais prevalente. Um estudo sobre a base genética de brasileiros infectados pelo HTLV-1 confirmou a introdução deste vírus por pessoas da região sul da África (ALCANTARA *et al*., 2006).

Em vista do Brasil apresentar a maior população japonesa fora do Japão, quase 1,5 milhões, e desses, 1 milhão viverem em São Paulo (GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2012), pode-se supor a introdução do subgrupo japonês (B) do HTLV-1 nesta região geográfica. De fato, este subgrupo foi detectado em alguns indivíduos do sudeste do Brasil (KASHIMA *et al*., 2006), mas não no presente estudo, provavelmente por ter sido realizado com população infectada pelo HIV que não conta com um número expressivo de orientais infectados.

Em relação à presença de mutações pontuais na região LTR do HTLV-1, recentemente descritas na literatura como associadas com o aumento da carga proviral em indivíduos assintomáticos (NETO *et al*., 2011), o presente estudo

encontrou uma elevada frequência de sequências com mutação nos segmentos TRE-1 e TRE-2 em pacientes com a coinfecção HIV/HTLV-1 de São Paulo (MAGRI *et al*., 2012c). Não se sabe se estas sequências mutantes são decorrentes de uma vantagem seletiva do vírus durante a infecção cronica ou se elas denotam os tipos de HTLV-1 que circulam nesta região geográfica. Curiosamente, quando foram comparadas as sequências LTR do presente estudo e 112 sequências de outras regiões geográficas do Brasil e do mundo (disponíveis no GenBank), foi observado que as sequências com mutação nas regiões TRE-1 e TRE-2 foram detectadas principalmente no Brasil.

Ao contrário do que foi sugerido por NETO *et al*., 2011, pode-se supor que essas mutações pontuais na LTR podem ter um efeito protetor, uma vez que nenhum caso de doença associada ao HTLV-1 foi detectado nestes pacientes, embora um estudo longitudinal seja necessário para confirmar esta hipótese. Ainda, é relevante assinalar que todos os indivíduos do estudo foram submetidos à terapia antirretroviral, o que poderia interferir na seleção de retrovírus. Corroborando essa hipótese, MONTAGNE *et al*., 1990, ao estudarem o efeito de mutações pontuais nos domínios A, B e C do TRE-3 na região LTR do HTLV-1 observaram que a integridade do domínio B foi absolutamente necessária para mediar a ativação da Tax1 do elemento promotor/potenciador (enhancer) de 21 pb, enquanto que mutação dos domínios A e C reduziram o efeito da Tax1, e mutação em ambos, nos domínios A e C, anularam o efeito da Tax1 (MONTAGNE *et al*.,1990). Portanto, a integridade do TRE é indispensável para a indução do elemento promotor/potenciador (enhancer) e, consequentemente para a progressão da doença.

Analisando esses dados em conjunto, não se sabe se a carga proviral alta precede o aparecimento dessas sequências com mutações ou se isso é uma consequência da presença de tais sequências mutantes. Somente estudos longitudinais poderão ajudar a responder a esta pergunta. Finalmente, é importante ampliar esses dados para esclarecer o papel das mutações pontuais da LTR no TRE, e identificar marcadores que podem ter valor preditivo para o desenvolvimento das doenças associadas ao HTLV-1, principalmente em países onde a infecção pelo HTLV-1 é endêmica, como o Brasil.

Dando suporte à análise molecular anterior da região LTR, foram encontradas diversas substituições de nucleotídeos e algumas trocas de aminoácidos no *env* do

HTLV-1, sendo a mais frequente na posição V1981I. Estes achados caracterizam os isolados como pertencentes ao subtipo HTLV-1a Cosmopolita, subgrupo Transcontinental A, agrupados em dois *clusters* da América Latina (MAGRI *et al*., 2012a), os mesmos *clusters* foram detectados com a análise filogenética da região *tax*. Em relação às trocas de aminoácidos encontradas da região *env* do HTLV-1, mais especificamente na proteína gp46, estudo que comparou clones de indivíduos com HAM/TSP e assintomáticos não encontrou associação entre mutações e características clínicas (MOTA-MIRANDA *et al*., 2013).

Os protocolos aqui estabelecidos para região *tax* permitiram quase que o sequenciamento completo da região *tax* do HTLV-1 e do HTLV-2; em ambos os casos faltaram sequenciar apenas os três nucleotídeos iniciais da *tax*. Esses três nucleotídeos caracterizam o *start codon* da *tax* (aminoácido Metionina) e fazem *splicing*, sendo encontrados no início do envelope viral (LAIRMORE *et al*., 2011). Devido a esse fato, das sequências serem quase que a totalidade do gene da *tax*, foi possível realizar análises filogenéticas robustas.

Nos HTLV-1 foi encontrada assinatura molecular característica de isolados do Brasil (KASHIMA *et al.*, 2006). Todas as sequências do estudo pertencem ao genótipo *tax*A e agruparam em dois *clusters* diferentes dentro desse genótipo.

Esses achados reforçam a hipótese de pelo menos duas entradas desses vírus no Brasil (DOURADO *et al*., 2003; REGO *et al*., 2008; MAGALHÃES *et al*., 2008; ALCANTARA *et al*., 2006; MOTA *et al*., 2007; KASHIMA *et al*., 2006) também nos indivíduos coinfectados pelo HIV (MAGRI *et al*., 2012a, b).

A análise de nucleotídeos das sequências de *tax* do HTLV-1 em relação ao protótipo ATK mostrou semelhança de nucleotídeos de 99,2%. Curiosamente, a mesma análise de isolados do Chile mostrou 99,6% de similaridade em relação ao ATK (RAMIREZ *et al*., 2002). Pelos resultados obtidos e pelo fato de que o Brasil e Chile estão localizados na América Latina, pode-se expecular uma introdução por ancestral diferente nos dois países, ou mais recente do HTLV-1 no Brasil em relação ao Chile. Esse dado está em parte em consonância com a descrição de Sonoda e colaboradores que relataram que os HTLV-1 de Ameríndios do Chile e de uma múmia descoberta no deserto de Atacana (norte do Chile) se assemelhavam aos isolados de Ainu (sul do Japão) e aos isolados de mongoloides da Ásia, enquanto os isolados do Brasil se assemelhavam aos isolados de negros africanos (SONODA *et al*., 2011).

Embora existam poucos estudos de caracterização molecular da *tax* do HTLV-1 no Brasil, um estudo com um grande número de indivíduos (portadores sintomáticos e assintomáticos) de São Paulo e Rio de Janeiro caracterizou o gene *tax* inteiro e demonstrou uma assinatura molecular brasileira (cinco substituições de nucleótidos em relação ao protótipo ATK: C7401T, T7914C, C7920T, C7982T e G8231A) característica do genótipo *tax*A (KASHIMA *et al*., 2006). Outro estudo de São Paulo apresentou o mesmo padrão de mutações e uma falta de associação entre o genótipo da *tax* e progressão da doença (CASSEB *et al*., 2006). Corroborando esses dados, o presente estudo encontrou a presença dessa assinatura molecular também nos indivíduos coinfectados pelo HIV de Londrina e região e de São Paulo (MAGRI *et al*., 2012b). Portanto, foi possível caracterizar os HTLV-1 que circulam em pacientes com HIV de São Paulo e de Londrina e região como sendo do subtipo cosmopolita, subgrupo transcontinental A, *clusters* A e B da América Latina.

Quanto à caracterização da região LTR do HTLV-2, esta classificou as sequências em três subgrupos principais chamados a4, a5, e a6, de acordo com: • a RFLP descrita por SWITZER *et al*., 1995 e EIRAKU *et al*., 1995, • os mapas de restrição e • as árvores filogenéticas com sequências de 458 pb (MAGRI *et al*., 2010). Curiosamente, uma das sequências (BRLO23-02), embora classificada como subgrupo a4 pela RFLP, agrupou separado desse subgrupo na árvore filogenética, mas perto de outras sequências do Brasil; RP329 e K96 isoladas de um doador de sangue de Ribeirão Preto e um índio Kayapó da Amazônia, respectivamente (COVAS & KASHIMA, 2003). Ainda, um grupo do HTLV-2 do subgrupo a6 foi quase que exclusivamente composto por sequências de Londrina e região. Além disso, sequências de São Paulo do ano de 1994, não depositadas no GenBank, agruparam nos mesmos três grupos de HTLV-2a de Londrina e região.

Quando analisado o compartamento de risco desses pacientes, sequências de LTR de HTLV-2 classificadas como pertencendo ao subgrupo a4 (incluindo o BRLO23-02) foram encontradas em indivíduos com comportamento de risco sexual para adquirir retroviroses, enquanto sequências dos subgrupos a5 e a6 foram detectadas em UDEV.

Em conjunto, esses resultados se assemelham aos obtidos em estudos anteriores que agruparam os vírus brasileiros em um único clado de HTLV-2a, embora com considerável diversidade entre eles (SWITZER *et al*., 1995; EIRAKU *et*

al., 1995; MURPHY *et al*., 1998; LEWIS *et al*., 2000; SHINDO *et al*., 2002; COVAS & KASHIMA, 2003; NOVOA *et al*., 2007). Além disso, vários estudos realizados com sequências brasileiras de HTLV-2 apontaram a transmissão do vírus dos índios para os UDEV das áreas urbanas (BLACK *et al*., 1994; SWITZER *et al*., 1995; EIRAKU *et al*., 1995; HALL *et al*., 1996; MURPHY *et al*., 1998; ISHAK *et al*., 2003; LEWIS *et al*., 2000; SHINDO *et al*., 2002; COVAS & KASHIMA, 2003; NOVOA *et al*., 2007), mas a descoberta de um grupo quase que exclusivamente de UDEV (subgrupo a6) poderia representar uma via diferente de transmissão do vírus ou uma taxa evolutiva diferente, provavelmente menor. De acordo com a última hipótese, maiores taxas evolutivas e diversidade genética de HTLV-2 foram detectadas em UDEV da Europa quando comparados a populações endêmicas de índios (SALEMI *et al*., 1999a). Portanto, pode-se especular que o mesmo ocorra em UDEV de Londrina e região. Além disso, o presente estudo confirma a RFLP como método alternativo para a realização de estudos epidemiológicos de HTLV-2 em países com um cenário de poucos recursos financeiros.

Foram encontradas diversas substituições de nucleotídeos e algumas trocas de aminoácidos no *env*, de HTLV-2, sendo a mais frequente na posição S1909P. A caracterização molecular feita com a região *env* de HTLV-2 concordou com os resultados obtidos com a LTR, encontrando o subtipo 2a na maioria das amostras. O subtipo HTLV-2b foi encontrado em uma das amostras (BRLO38-02) do presente estudo, e esse fato se justifica, pois pertencia a indivíduo proveniente do Paraguai. Em consonância com esse achado, o subtipo HTLV-2b foi encontrado no estado do Rio Grande do Sul (RENNER *et al*., 2006) fronteira com países onde prevalece o HTLV-2b. Há de se esperar que com a abertura do Mercosul, esse vírus passe a disseminar pelo Brasil e isto justifica uma vigilância deste subtipo viral no país.

Já para a região *tax* do HTLV-2, houve troca de nucleotídeo que resultou na perda do *stop codon* na posição 2735 e no ganho de 25 aminoácidos, característica da Tax longa encontrada em isolados do Brasil, chamada de variante molecular HTLV-2c. A ocorrência da variante HTLV-2c no Brasil é intrigante e sua origem não está completamente esclarecida. Acredita-se que o HTLV-2 chegou ao Novo Mundo cerca de 15.000 anos atrás pela onda migratória humana (índios Paleo) que cruzou o estreito de Bering. Duas diferentes rotas migratórias paralelas, uma pela Cordilheira dos Andes ao longo da costa do Pacífico e outra pela região amazônica poderiam independentemente resultar no surgimento da variante HTLV-2c, talvez a

partir do protótipo 2a, ou pela introdução do 2c exclusivamente pela região amazônica (ISHAK *et al*., 2003).

As árvores filogenéticas do HTLV-2 (LTR, *env* e *tax*) mostraram a presença de um grupo composto quase exclusivamente de UDEV. Novamente, especula-se que estes clados poderiam representar a via de transmissão do vírus entre os UDEV ou uma taxa evolutiva do vírus pouco diferente, como descrito em UDEV europeus (MAGRI *et al*., 2010, 2013; SALEMI *et al*., 1999a). Além disso, o clado na árvore filogenética da região *env*, que contêm isolados virais de uma região geográfica específica (cidade de Jundiaí distante 60 quilometros da cidade de São Paulo), e os clados das mesmas sequências nas árvores filogenéticas da LTR e *tax*, junto ao clado dos UDEV, nos permitem supor que o comportamento de risco para a aquisição de retrovírus nos pacientes de Jundiaí foi o uso de drogas injetáveis. Ainda, um único sub-clado monofilético próximo aos UDEV sugere a disseminação *in situ* de um clado local.

Em relação à taxa evolutiva do HTLV-2, Salemi e colaboradores calibraram um relógio molecular da região LTR do HTLV-2 e estimaram uma taxa de fixação entre $1{,}08 \times 10^{-4}$ e $2{,}7 \times 10^{-5}$ de substituições de nucleotídeos por sítio por ano para os subtipos 2a e 2b de UDEV europeus, e concluiram que esta taxa é muito baixa entre vírus RNA (SALEMI *et al*., 1998b). Por exemplo, o HIV-1 (região *env*) foi medido até $1{,}6 \times 10^{-2}$ substituições por sítio por ano (HAHN *et al*., 1986).

Prevalências elevadas do HTLV-2 têm sido descritas em grupos isolados geograficamente, esses grupos podem ter uma dinâmica viral e evolutiva diferentes (SALEMI *et al*., 1998; BIGGAR *et al*., 1996; LEMEY *et al*., 2005). Curiosamente, análise filogenética de sequências da LTR de índios Kayapó do Brasil, agrupou as sequências em um “filogrupo” denominado A-II, em que sequências de uma prostituta mexicana e de duas prostitutas de Gana e Camarões agruparam juntas (SWITZER *et al*., 1996). Este achado pode sugerir que o HTLV-2a pode ter evoluído de um ancestral comum na África muito antes dos ancestrais dos Kayapós infectados com HTLV-2a introduzirem este subtipo nas Américas.

Corroborando essa hipótese, Mauclère e colaboradores propuseram que o HTLV-2 surgiu na África, e então algumas cepas deixaram este continente durante a migração humana e se tornaram os ancestrais do HTLV-2a/c ou HTLV-2b. Além disso, eles também especularam que as populações ancestrais de HTLV-2b podem ter migrado pela Ásia e depois separado em subgrupos: alguns foram para a

América, e outros voltaram para a África. Finalmente, o vírus restante tornou-se o subtipo HTLV-2d (MAUCLÈRE *et al*., 2011). Outros estudos concordaram que o HTLV-2 foi originalmente trazido da Ásia para as Américas durante a migração das populações asiáticas sobre o estreito Bering (BIGGAR *et al.*, 1996; SUZUKI *et al*., 1998; SALEMI *et al*., 1999b). Estes dados e os dados do Mauclère reforçam a hipótese da entrada do HTLV-2 nas Américas pelo estreito de Bering há muito tempo atrás.

Na Europa, acredita-se que o subtipo 2a foi introduzido aos UDEV pela Europa Oriental e o 2b pela Europa Ocidental em pelo menos dois periodos separados (SALEMI *et al*., 1999b). Na Espanha, por exemplo, o HTLV-2b continua a ser o subtipo prevalente apesar de hoje em dia novos casos dessa infecção estarem diminuindo (ABAD *et al*., 2011). Já no Brasil, todos os dados apontam para a presença da variante molecular HTLV-2c nos índios de tribos nativas, com disseminação posterior à população urbana durante a sua formação. Isso ocorreu pelo contato inter-étnico durante o evento intenso da miscigenação, através de relações sexuais, e é mantido nos índios principalmente pela amamentação (BIGGAR *et al*., 1996; EIRAKU *et al*., 1996; SWITZER *et al*., 1996; ALCANTARA *et al*., 2003; ISHAK *et al*., 2003).

Uma vez demonstrada a ausência dos subtipos HTLV-2b e HTLV-2a do protótipo norte-americano na população do presente estudo, sugere-se que estes indivíduos infectados pelo HIV tiveram pouca interação com pessoas ou derivados de sangue de outras áreas geográficas, e também com pessoas coinfectadas com HIV/HTLV-2 de fora do Brasil. Além disso, pode-se especular sobre diferentes rotas e origens do HIV e do HTLV-2 no Brasil, provavelmente infecção anterior pelo HTLV-2 entre os UDEV e depois pelo HIV (MAGRI *et al*., 2013).

Quanto às rotas de migração dos HTLV-1/2, segundo Gremillion, o HTLV-1 pode ter sido transmitido e disseminado juntamente com o povoamento da América do Norte e do Sul que começou muito antes das migrações transiberianas (GREMILLION, 2008). Curiosamente, Kanzaki e Casseb hipotetizaram sobre a presença de outros Deltaretrovírus (HTLV-3 e HTLV-4) entre isolados de ameríndios considerados como população de etnia mista e macacos do Novo Mundo no Brasil, provavelmente devido a vestígios de migrações da Austrália-Melanésia e da África para o continente Americano (KANZAKI & CASSEB, 2008). Esses autores sugeriram

a presença destes retrovírus em virtude do alto número de soros com padrão indeterminado na análise pelo *Western Blot*.

Análises de DNA mitocondrial humano, que é passado da mãe para os filhos sem ser combinado com o código genético do pai, permitem traçar rotas de migração humana (NATIONAL GEOGRAPHIC SOCIETY). Curiosamente, estas rotas se assemelham com as possíveis rotas de migração dos HTLV-1/2. Os humanos seguiam para regiões onde os recursos alimentares eram abundantes. A teoria predominante e sustentada por evidencias científicas é a de que os humanos deixaram a África e seguiram pela costa, sendo que a primeira onda de migração cruzou o Oriente Médio, foi para o sul da Ásia e, seguiu para a Austrália. Outras ondas saíram do norte em direção à Europa, mas seu alcance foi limitado por uma placa de gelo que se estendia na parte norte da Europa continental. Uma placa de gelo formou uma ponte entre a Sibéria e o Alasca que foi chamada de estreito de Bering. Os primeiros humanos andaram, mudando para a costa oeste da América do Norte. A migração humana se espalhou pela América do Sul e seguiu para o que hoje é o leste dos Estados Unidos e Canadá (GRABIANOWSKI, 2007). No **Anexo O** encontra-se um mapa ilustrativo da teoria da migração humana desenvolvido pelo MITOMAP (banco de dados de genoma mitocrondrial humano) e o mapa de disseminação do HTLV-1 descrito por Sonoda e colaboradores (SONODA *et al*., 2011). Digno de nota, os mapas se completam e corroboram a existência e disseminação de HTLV-1/2 em momentos históricos diferentes e em populações diversas. Apesar do presente estudo não ter tido o objetivo de estudar rotas de migração de HTLV, a vigilância de subtipos virais que circulam no Brasil usando sequências de segmentos longos do genoma viral, poderá auxiliar no traçado dessas rotas no futuro.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

- As diversas análises realizadas no presente estudo corroboraram dados da literatura do Brasil, nos quais as análises filogenéticas confirmam como subtipos prevalentes o HTLV-1a, subgrupo Transcontinental A, e o HTLV-2a (variante -2c) circulando no país também nos indivíduos coinfectados pelo HIV.
- O uso das ferramentas disponíveis na área da Bioinformática possibilitou a aplicação robusta de métodos estatísticos na caracterização e monitoramento dos HTLV-1/2 do presente estudo.
- Os resultados obtidos permitiram especular sobre duas entradas do HTLV-1 no Brasil e sobre a disseminação do HTLV-2c em grupos distintos quanto ao comportamento de risco e região geográfica.
- Foram detectadas assinaturas moleculares características dos HTLV-1 e HTLV-2 isolados no Brasil, com destaque para a região *tax.* Para o HTLV-1 houve a detecção do genótipo brasileiro *tax*A e para o HTLV-2 a Tax longa caracterítica da variante HTLV-2c. Houve também a confirmação da troca do aminoácido S→P na posição 1909 no *env* dos HTLV-2c.
- A ausência de subtipos de HTLV-2 prevalentes em outros países nos indivíduos coinfectados pelo HIV do presente estudo sugere que a introdução desses retrovirus no Brasil não ocorreu ao mesmo tempo.
- Finalmente, o estabelecimento e a otimização de métodos laboratoriais realizado neste estudo possibilitaram uma melhor compreensão da diversidade genômica, filogenia molecular, taxas de mutação, e idéias sobre a origem e disseminação dos HTLV-1/2 em populações vulneráveis, coinfectadas pelo HIV.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, M.; DRONDA, F.; DOMINGUEZ, E.; MORENO, S.; VALLEJO, A. HTLV-2b among HIV type 1-coinfected injecting drug users in Spain. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v.27, p.579-583, 2011.

ALCANTARA, L.C.; SHINDO, N.; VAN DOOREN S.; SALEMI, M.; COSTA, M.C.; KASHIMA, S.; COVAS, D.T.; VANDAMME, A.M.; GALVÃO-CASTRO, B. Brazilian HTLV type 2a strains from intravenous drug users (IDUs) appear to have originated from two sources: Brazilian Amerindians and European/North American IDUs. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v.19, p.519–523, 2003.

ALCANTARA, L.C.; DE OLIVEIRA, T.; GORDON, M.; PYBUS, O.; MASCARENHAS, R.E.; SEIXAS, M.O.; GONÇALVES, M.; HLELA, C.; CASSOL, S.; GALVÃO-CASTRO, B. Tracing the origin of Brazilian HTLV-1 as determined by analysis of host and viral genes. **AIDS***,* v.20, n.5, p.780–782, 2006.

ALCANTARA, L.C.J.; CASSOL, S.; LIBIN, P.; DEFORCHE, K.; PYBUS, O.G.; VAN RANST, M.; GALVÃO-CASTRO, B.; VANDAMME, A.-M.; DE OLIVEIRA, T. A standardized framework for accurate, high-throughput genotyping of recombinant and non-recombinant viral sequences. **Nucleic Acids Research**, v.37 (Web Server issue), p.W634-642, 2009.

ASQUITH, B.; MOSLEY, A.J.; HEAPS, A.; TANAKA, Y.; TAYLOR, G.P.; McLEAN, A.R.; BANGHAM, C.R.M. Quantification of the virus-host interaction in human T lymphotropic virus I infection. **Retrovirology**, v.2, p.75, 2005.

BAGHERI, F.; PATEL, K.; SAMOURJIAN, E.; PATHAK, N.; SHAMALOV, V.; GINTAUTAS, J.; SANTUCCI, T. Further evidence that HTLV protects against HIV progression. **Infections in Medicine**, v.1, p.5, 2008.

BARRIOS, C.S.; CASTILLO, L.; GIAM, C.Z.; WU, L.; BEILKE, M. Inhibition of HIV-1 replication by HTLV-1/2 Tax proteins in vitro. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v.29, p.1061-1067, 2013.

BEILKE, M.A.; THEALL, K.P.; O'BRIEN, M.; CLAYTON, J.L.; BENJAMIN, S.M.; WINSOR, E.L.; KISSINGER, P.J. Clinical outcomes and disease progression among patients coinfected with HIV and human T lymphotropic vírus types 1 and 2. **Clinical Infectious Diseases**, v.39, n.2, p.256-263, 2004.

BEILKE M.A. Retroviral Coinfections: HIV and HTLV: Taking stock of more than a quarter century of research. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v.28, n.2, p.139-147, 2012.

BIGGAR, R.J.; TAYLOR, M.E.; NEEL, J.V.; HJELLE, B.; LEVINE, P.H.; BLACK, F.L.; SHAW, G.M.; SHARP, P.M.; HAHN, B.H. Genetic variants or human T lymphotropic virus type II in American indian groups. **Virology**, v.216, p.165-173, 1996.

BISWAS, H.H.; KAIDAROVA, Z.; GARRATTY, G.; GIBBLE, J.W.; NEWMAN, B.H.; SMITH, J.W.; ZIMAN, A.; FRIDEY, J.L.; SACHER, R.A.; MURPHY, E.L.; for the HTLV Outcomes Study (HOST). Increased all-cause and cancer mortality in HTLV-II infection. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v.54, n.3, p.290-296, 2010.

BITTENCOURT, A.L. Vertical transmission of HTLV-I/II: a review. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.40, p.245-251, 1998.

BITTENCOURT, A.L.; PRIMO, J.; OLIVEIRA, M.F.P. Manifestations of the human T-cell lymphotropic virus type I infection in childhood and adolescence. **Jornal de Pediatria**, v.82, n.6, p.411-420, 2006.

BLACK, F.L.; BIGGAR, R.J.; NEEL, J.V.; MALONEY, E.M.; WATERS, D.J. Endemic transmission of HTLV type II among Kayapo Indians of Brazil. **AIDS Research and Human Retroviroses**, v.10, p.1165-1171, 1994.

BOXUS, M.; TWIZERE, J.C.; LEGROS, S.; DEWULF, J.F.; KETTMANN, R.; WILLEMS, L. The HTLV-1 Tax interactome. **Retrovirology**, v.5, p.76, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria 1.376, de nov. 1993. Diário Oficial da União, Brasília, 2 de dez. 1993. [Aprova alterações na Portaria n. 721/GM, de 9 de ago. 1989, que aprova normas técnicas para coleta, processamento e transfusão de sangue, componentes e derivados, e da outras providências].

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. Guia do manejo clínico do HTLV / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de DST e Aids. – Brasília: Ministério da Saúde, 2003. 52 p.: il.: – (Série A. Normas e Manuais Técnicos) – (Série Manuais; n.º 3 – CN-DST e Aids

BRITES, C.; ALENCAR, R.; GUSMÃO, R.; PEDROSO, C.; NETTO, E.M.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; BADARÓ, R. Co-infection with HTLV-1 is associated with a shorter survival time for HIV-1-infected patients in Bahia, Brazil. **AIDS**, v.15, n.15, p.2053-2055, 2001.

BRITES, C.; SAMPAIO, J.; OLIVEIRA, A. HIV/human T-cell lymphotropic virus coinfection revisited: impact on AIDS progression. **AIDS Reviews***,* v.11, n.1, p.8-16, 2009.

BRITES, C.; GOYANNA, F.; FRANÇA, L.G.; PEDROSO, C.; NETTO, E.M.; AADRIANO, S.; SAMPAIO, J.; HARRINGTON, W.Jr. Coinfection by HTLV-I/II is associated with an increased risk of strongyloidiasis and delay in starting antiretroviral therapy for AIDS patients. **Brazilian Journal of Infectious Diseases***,* v.15, n.1, p.6-11, 2011.

CARNEIRO-PROIETTI, A.B.; CATALAN-SOARES, B.C.; PROIETTI, F.A.; GIPH (Interdisciplinary HTLV-I/IIResearch Group). Human T cell lymphotropic viruses (HTLV-I/II) in South America: Should it be a public health concern? **Journal of Biomedical Science***,* v.9, p.587–595, 2002.

CARVALHO, M.M.N.; NOVAES, A.E.; CARVALHO, E.M.; ARAÚJO, M.I. Doenças reumáticas auto-imunes em indivíduos infectados pelo HTLV-1. **Revista Brasileira de Reumatologia,** v.46, n.5, p.334-339, 2006.

CASSEB, J.; CATERINO-DE-ARAUJO, A.; HONG, M.A.; SALOMÃO, S.; GALLO, D.; HENDRY, R.M.; DUARTE, A.J.S. Prevalence of HTLV-I and HTLV-II infections among HIV-1-infected asymptomatic individuals in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.39, n.4, p.213-215, 1997.

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

CATALAN-SOARES, B.; CARNEIRO-PROIETTI, A.B.; PROIETTI, F.A.; Interdisciplinary HTLV Research Group. Heterogeneous geographic distribution of human T-cell lymphotropic viruses I and II (HTLV-I/II): Serological screening prevalence rates in blood donors from large urban area in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.21, n.3, p.926–931, 2005.

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

CATERINO-DE-ARAUJO, A.; FAVERO, A.; SANTOS-FORTUNA, E.; SULEIMAN, J.; CHIECO-BIANCHI, L.; CALABRÒ, M.L. HTLV-I/HTLV-II coinfection in AIDS patient from São Paulo, Brazil. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v.16, p.715–719, 2000.

COLLINS, J.A.; HERNANDEZ, A.V.; HIDALGO, J.A.; SALAZAR, R. HTLV-I infection is not associated with a higher risk of death in Peruvian HIV-infected patients. **Revista do Instituto de Mededicina Tropical de São Paulo***,* v.51, n.4, p.197-201, 2009.

COSTA, E.A.S.; MAGRI, M.C.; CATERINO-DE-ARAUJO, A. The best algorithm to confirm the diagnosis of HTLV-1 and HTLV-2 in at-risk individuals from São Paulo, Brazil. **Journal of Virological Methods**, v.173, p.280–286, 2011.

COVAS, D.M.; KASHIMA, S. Complete nucleotide sequences of the genomes of two Brazilian specimens of human T lymphotropic virus type 2 (HTLV-2). **AIDS Research and Humam Retroviruses**, v.19, n.8, p.689–697, 2003.

DE–ARAUJO, A.C.; CASSEB, J.S.R.; NEITZERT, E.; DE SOUZA, M.L.; MAMMANO, F.; DEL MISTRO, A.; DE ROSSI, A.; CHIECO-BIANCHI, L. HTLV-I and HTLV-II infections among HIV-1 seropositive patients in São Paulo, Brazil. **European Journal of Epidemiology**, v.10, n.2, p.165–171, 1994.

DE OLIVEIRA, T.; DEFORCHE, K.; CASSOL, S.; SALMINEM, M.; PARASKEVIS, D.; SEEBREGTS, C.; SNOECK, J.; VAN RENSBURG, E.J.; WENSING, A.M.J.; VAN DE VIJVER, D.A.; BOUCHER, C.A.; CAMACHO, R.; VANDAMME, A.-M. An automated genotyping system for analysis of HIV-1 and other microbial sequences. **Bioinfomatics**, v.21, n.19, p.3797-3800, 2005.

DOONEIEF, G.; MARLINK, R.; BELL, K.; MARDER, K.; RENJIFO, B.; STERN, Y.; MAYEUX, R. Neurologic consequences of HTLV-II infection in injection-drug users. **Neurology**, v.46, n.6, p.1556-1560, 1996.

DOUCERON, E.; KAIDAROVA, Z.; MIYAZATO, P.; MATSUOKA, M.; MURPHY, E.L.; MAHIEUX, R. HTLV-2 APH-2 expression is correlated with proviral load but APH-2 does not promote lymphocytosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v.205, p.82–86, 2012.

DOURADO, I.; ALCANTARA, L.C.; BARRETO, M.L.; TEIXEIRA, M.G.; GALVÃO-CASTRO, B. HTLV-I in the general population of Salvador, Brazil: a city with African ethnic and sociodemographic characteristics. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v.34, p.527-531, 2003.

EDLICH, R.F.; ARNETTE, J.A.; WILLIAMS, F.M. Global epidemic of human T-cell lymphotropic virus type-I (HTLV-I). **The Journal of Emergency Medicine***,* v.18, p.109-119, 2000.

EGAN, J.F.; O'LEARY, B.; LEWIS, M.J.; MULCAHY, F.; SHEEHY, N.; HASEGAWA, H.; FITZPATRICK, F.; O'CONNOR, J.J.; O'RIORDAN, J.; HALL, W.W. High rate of human T lymphotropic virus type IIa infection in HIV type 1-infected intravenous drug abusers in Ireland. **AIDS Research and Human Retroviruses***,* v.15, n.8, p.699-705, 1999.

EIRAKU, N.; MONKEN, C.; KUBO, T.; ZHU, S.W.; RIOS, M.; BIANCO, C.; HJELLE, B.; NAGASHIMA, K.; HALL, W.W. Nucleotide sequence and restriction fragment length polymorphism analysis of the long terminal repeat of human T cell leukemia virus type II. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v.11, p.625-636, 1995.

EIRAKU, N.; NOVOA, P.; FERREIRA, M.C.; MONKEN, C.; ISHAK, R.; FERREIRA, O.C.; ZHU, S.W.; LORENCO. R.; ISHAK, M.; AZVEDO, V.; GUERREIRO, J.; POMBO-DE-OLIVEIRA, M.; LOUREIRO, P.; HAMMERSCHLAK, N.; IJICHI, S.; HALL, W.W. Identification and characterization of new and distinct molecular subtype of human T-cell lymphotropic vírus type 2. **Journal of Virology**, v.70, n.3, p.1481-1392, 1996.

ETZEL, A.; SHIBATA, G.Y.; ROZMAN, M.; JORGE, M.L.S.G.; DAMAS, C.D.; SEGURADO, A.A.C. HTLV-1 and HTLV-2 infections in HIVinfected individuals from Santos, Brazil: Seroprevalence and risk factors. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes***,* v.26, p.185–190, 2001.

FELBER, B.K.; PASKALIS, H.; KLEINMAN-EWING, C.; WONG-STALL, F.; PAVLAKIS, G.N. The pX protein of HTLV-I is a transcriptional activator of its long terminal repeats. **Science**, v.229, p.675-679, 1985.

FELSENSTEIN, J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. **Journal of Molecular Evolution**, 17:368-376, 1981.

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

FRANCHINI, G. Molecular mechanisms of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I infection. **Blood**, v.86, p.3619-39, 1995.

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. **The Journal of Infectious Diseases***,* v.182, p.1343-1349, 2000.

GABBAI, A.A.; BORDINI, J.O.; VIEIRA–FILHO, J.P.B.; KURODA, A.; OLIVEIRA, A.S.B.; CRUZ, M.V.; RIBEIRO, A.A.F.; DELANEY, S.R.; HENRARD, D.R.; ROSARIO, J.; ROMAN, G.C. Selectivity of human T lymphotropic vırus type-1 (HTLV-1) and HTLV-2 infection among different populations in Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.49, p.664-671, 1993.

GALVÃO-CASTRO, B.; LOURES, L.; RODRIQUES, L.G.; SERENO, A.; FERREIRA, O.C.; FRANCO, L.G.; MULLER, M.; SAMPAIO, D.A.; SANTANA, A.; PASSOS, L.M.; PROIETTI, F. Distribution of human T-lymphotropic virus type I among blood donors: a nationwide Brazilian study. **Transfusion**, v.37, n.2, p.242-243, 1997.

GADELHA, S.R; ALCANTARA, L.C.; COSTA, G.C.; ACOSTA, A.X.; RIOS, D.; KASHIMA, S.; COVAS, D.T.; GALVÃO-CASTRO, B. Correlation between polymorphisms at interleukin-6 but nota t interleukin-10 promoter and the risk of human T lymphotropic virus type I-associated myelopaty/tropical spastic paraparesis em Brazilian individuals. **Journal of Medical Virology**, v.80, n.12, p.2141-2146, 2008.

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

GESSAIN, A.; CASSAR, O. Epidemiological aspects and world distribution of HTLV-1 infection. **Frontiers in Microbiology**, v.3, article 388, 2012.

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO. 1908-2008 100 Anos. Imigração Japão Brasil. Disponível em: http://www.saopaulo.sp.gov.br/imigracaojaponesa/historia.php. Acesso em: 16 mar. 2012.

GRABIANOWSKI, E.D. HowStuffWorks - Como funciona a migração humana". Publicado em 27 de dezembro de 2007 (atualizado em 20 de maio de 2008). Disponível em: http://ciencia.hsw.uol.com.br/migracao-humana3.htm. Acesso em: 11 jan. 2013.

GREMILLION, D.H. Pre Siberian Human Migration to the Americas: Possible validation by HTLV-1 mutation analysis. **Archaeography Photoblog**, 2008. Disponível em: http://traumwerk.stanford.edu/archaeolog/2008/09/pre_siberian_ human_migration_t.html. Acesso em: 03 jan. 2013.

HAHN, B.H.; SHAW, G.M.; TAYLOR, M.E.; REDFIELD, R.R.; MARKHAM, P.D.; SALAHUDDIN, S.Z.; WONG-STAAL, F.; GALLO, R.C.; PARKS, E.S.; PARKS, W.P. Genetic variation in HTLV-III/LAV over time in patients with AIDS or at risk for AIDS. **Science**, v.232, p.1548-1535, 1986.

HALIN, M.; DOUCERON, E.; CLERC, I.; JOURNO, C.; KO, N.L.; LANDRY, S.; MURPHY, E.L.; GESSAINS, A.; LEMASSON, I.; MESNARD, J.M.; BARBEAU, B.; MAHIEUX, R. Human T-cell leukemia virus type 2 produces a spliced antisense transcript encoding a protein that lacks a classic bZIP domain but still inhibits Tax2-mediated transcription. **Blood**, v.114, p.2427-2438, 2009.

HALL, W.W.; KUBO T; IJICHI S; TAKAHASHI H; ZHU SW. Human T-cell leukemia virus type II (HTLV-II): Emergence of an important newly recognized pathogen. **Seminars in Virology**, v.5, p.165-178, 1994.

HALL, W.W.; ISHAK, R.; ZHU, S.W.; NOVOA, P.; EIRAKU, N.; TAKAHASHI, H.; FERREIRA, M.C.; AZEVEDO, V.; ISHAK, M.O.; FERREIRA, O.C.; MONKEN, C.; KURATA, T. Human T lymphotropic virus type II (HTLV-II): Epidemiology, molecular properties, and clinical features of infection. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology**, v.13, p.S204-S214, 1996.

HALL, T. BioEdit version 5.0.6. North Carolina State University, Department of Microbiology, 2001.

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

IÑIGUEZ, A.M.; GASTALDELLO, R.; OTSUKI, K.; BALANGERO, M.; COSTA, F.C.; REMONDEGUI, C.; VICENTE, A.C.P.; GALLEGO, S. Correlation of HTLV-1 Tax genetic diversity with HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis progression and HTLV-1a genotypes in an HTLV-1 endemic region in Argentina. **Journal of Medical Virology**, v.82, n.8, p.1438-1441, 2010.

ISHAK, R.; HARRINGTON, W. J.; AZEVEDO, V. N.; EIRAKU, N.; ISHAK, M. O. G.; GUERREIRO, J. F.; SANTOS, S. E. B.; KUBO, T.; MONKE, C.; ALEXANDER, S.; HALL, W. W. Identification of human T-cell lymphotropic virus type IIa infection in the Kayapo, an indigenous population of Brazil. **AIDS Research and Human Retroviruses,** v.11, p.813-821, 1995.

ISHAK, M.Q.; ISHAK, R.; VALLINOTO, A.C.R.; AZEVEDO, V.N.; ISHAK, M.Q. Epidemiological aspects of retrovirus (HTLV) infection among Indian populations in the Amazon region of Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.19, p.901-914, 2003.

KALYANARAMAN, V.S.; SARNGADHARAN, M.G.; ROBERT–GUROFF, M.; MIYOSHI, I.; GOLDE, D.; GALLO, R.C. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. **Science**, v.218, p. 571-573, 1982.

KANNAGI, M.; SHIDA, H.; IGARASHI, H.; KURUMA, K.; MURAI, H.; AONO, Y.; MARUYAMA, I.; OSAME, M.; HATTORI, T.; INOKO, H. Target epitope in the Tax protein of human T-cell leukemia vírus type I recognized by class I major histocompatibility complex-restricted cytotoxic T cells. **Journal of Virology**, v.66, p.2928-2933, 1992.

KANZAKI, LIB; CASSEB, J. Human T-lymphotropic viruses evolution possibly explained by primate Deltaretrovirus geographical segregation. **Retrovirology: Research and Treatment**, v.1, p.15-20, 2008.

KASHIMA, S.; ALCANTARA, L.C.; TAKAYANAGUI, O.M.; CUNHA, M.A.; CASTRO, B.G.; POMBO-DE-OLIVEIRA, M.S.; ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. Distribution of human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) subtypes in Brazil: Genetic characterization of LTR and Tax region. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v.22, n.10, p.953-959, 2006.

LAIRMORE, M.D.; ANUPAM, R.; BOWDEN, N.; HAINES, R.; HAYNES, R.A.; RATNER, L.; GREEN, P.L. Molecular determinants of human T-lymphotropic virus type 1 transmission and spread. **Viruses**, v.3, n.7, p.1131-1165, 2011.

LAURENTINO, R.V.; LOPES, I.G.L.; AZEVEDO, V.N.; MACHADOI, L.F.A; MOREIRAII, M.R.C; LOBATOIII, L.; ISHAKI, M.O.G.; ISHAKI, R.; VALLINOTO, A.C.R. Molecular characterization of human T-cell lymphotropic virus coinfecting human immunodeficiency virus 1 infected patients in the Amazon region of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.100, n.4, p.371-376, 2005.

LEE, H.; IDLER, K.B.; SWANSON, P.; APARICIO, J.J.; CHIN, K.K.; LAX, J.P.; NGUYEN, M.; MANN, T.; LECKIE, G.; ZANETTI, A.; MARINUCCI, G.; CHEN, I.S.Y.; Rosenblatt, J.D. Complete nucleotide sequence of HTLV-II isolate NRA: comparison of envelope sequence variation of HTLV_II isolates from U.S. blood donors and U.S. and Italian IV drug users. **Virology**, v.196, p.57-69, 1993.

LEMEY, P.; PYBUS, O.G.; VAN DOOREN, S.; VANDAMME, A.M. A Bayesian statistical analysis of human T-cell lymphotropic virus evolutionary rates. **Infection, Genetics Evolution**, v.5, p.291-298, 2005.

LEWIS, M.J.; NOVOA, P.; ISHAK, R.; ISHAK, M.; SALEMI, M.; VANDAMME, A.M.; KAPLAN, M.H.; HALL, W.W. Isolation, cloning, and complete sequence of a phenotypically distinct Brazilian isolate of human T-lymphotropic virus type II (HTLV-II). **Virology**, v.271, n.1, p.142-154, 2000.

LEWIS, M.J.; SHEEHY, N.; SALEMI, M.; VANDAMME, A.M.; HALL, W.W. Comparison of CREB- and NK-B-mediated transactivation by human T lymphotropic virus type II (HTLV-II) and type I (HTLV-I) Tax proteins. **Virology**, v.295, p.182-189, 2002.

LI, H.C.; BIGGAR, R.J.; MILEY, W.J.; MALONEY, E.M.; CRANSTON, B.; HANCHARD, B. Provirus load in breast milk and risk of mother-to-child transmission of human T lymphotropic virus type I. **Journal of Infectious Diseases**, v.190, n.7, p.1275-1278, 2004.

Li, K.; Shrivastava, S.; Brownley, A.; Katzel, D.; Bera, J.; Nguyen, A.T.; Thovarai, V.; Halpin, R.; Stockwell, T.B. Automated degenerate PCR primer design for high-throughput sequencing improves efficiency of viral sequencing. **Virology Journal**, v.9, p.261, 2012.

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

MAGALHÃES, T.; MOTA-MIRANDA, A.C.; ALCANTARA, L.C.; OLAVARRIA, V.; GALVÃO-CASTRO, B.; RIOS-GRASSI, M.F. Phylogenetic and molecular analysis of HTLV-1 isolates from a medium sized town in northern of Brazil: Tracing a common origin of the virus from the most endemic city in the country. **Journal of Medical Virology**, v.80, n.11, p.2040–2045, 2008.

MAGRI, M.C.; MORIMOTO, H.K.; BRIGIDO, L.F.M.; RODRIGUES, R.; CATERINO-DE-ARAUJO, A. Long terminal repeat sequence analysis of HTLV-2 molecular variants identified in Southern Brazil. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v.26, p.1327-1331, 2010.

MAGRI, M.C.; BRIGIDO, L.F.M.; RODRIGUES, R.; MORIMOTO, H.K.; FERREIRA, J.L.P.; CATERINO-DE-ARAUJO, A. Phylogenetic and similarity analysis of HTLV-1 isolates from HIV-coinfected patients from the south and southeast regions of Brazil. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v.28, n.1, p.110-114, 2012a.

MAGRI, M.C.; BRIGIDO, L.F.M.; RODRIGUES, R.; MORIMOTO, H.K.; CATERINO-DE-ARAUJO, A. Tax gene characterization of human T-lymphotropic virus type 1 strains from brazilian HIV-coinfected patients. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v.28, n.12, p.1775-1778, 2012b.

MAGRI, M.C.; BRIGIDO, L.F.M.; MORIMOTO, H.K.; CATERINO-DE-ARAUJO, A. Human T cell lymphotropic virus type 2a strains among HIV type 1-coinfected patients from Brazil have originated mostly from Brazilian Amerindians. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v.29, p.1010-1018, 2013.

MAGRI, M.C.; COSTA, E.A.S.; CATERINO-DE-ARAUJO, A. LTR point mutations in the Tax-responsive elements of HTLV-1 isolates from HIV/HTLV-1-coinfected patients. **Virology Journal**, v.9, p.184, 2012c.

MANNS, A.; WILKS, R.J.; MURPHY, E.L.; HAYNES, G.; FIGUEROA, J.P.; BARNETT, M.; HANCHARD, B.; BLATTNER, W.A. A prospective study of transmission by transfusion of HTLV-I and risk factors associated with seroconversion. **International Journal of Cancer**, v.51, n.6, p.886-891, 1992.

MARBAN, C.; McCABE, A.; BUKONG, T.N.; HALL, W.W.; SHEEHY, N. Interplay between the HTLV-2 Tax and APH-2 proteins in the regulation of the AP-1 pathway. **Retrovirology**, v.9, p.98, 2012.

MATSUOKA, M.; JEANG, K,T. Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. **Nature Reviews Cancer**, v.7, p.270-90, 2007.

MAUCLÈRE, P.; AFONSO, P.V.; MEERTENS, L.; PLANCOULAINE, S.; CALATTINI, S.; FROMENT, A.; VAN BEVEREN, M.; DE THÉ, G.; QUINTANA-MURCI, L.; MAHIEUX, R.; GESSAIN, A. HTLV-2B strains, similar to those found in several Amerindian tribes, are endemic in central African Bakola Pygmies. **The Journal of Infectious Diseases**, v.203, p.1316-1323, 2011.

MEEKINGS, K.N.; LEIPZIG, J.; BUSHMAN, F.D.; TAYLOR, G.P.; BANGHAM, C.R. HTLV-1 integration into transcriptionally active genomic regions is associated with proviral expression and with HAM/TSP. **PLoS Pathogens**, v.4, n.3, p.e1000027, 2008.

MENNA–BARRETO, M.; BENDER, A.L.; BONATTO, S.L.; FREITAS, L.B.; SALZANO, F.M.; TSUNETO, L.T.; PETZL-ERLER, M.L. Human Tcell lymphotropic virus type II in Guaranı´ Indians, Southern Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.21, p.1947-1951, 2005.

MIURA, T.; FUKUNAGA, T.; IGARASHI, T.; YAMASHITA, M.; IDO, E.; FUNAHASHI, S.; ISHIDA, T.; WASHIO, K.; UEDA, S.; HASHIMOTO, K.; YOSHIDA, M.; OSAME, M.; SINGHAL, B.; ZANINOVIC, V.; CARTIER, L.; SONODA, S.; TAJIMA, K.; INA, Y.; GOJOBORI, T.; HAYAMI, M. Phylogenetic subtypes of human T-lymphotropic virus type I and their relations to anthropological background. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.91, p.1124-1127, 1994.

MONTAGNE, J.; BERAUD, C.; CRENON. I.; LOMBARD-PLATET, G.; GAZZOLO, L.; SERGEANT, A.; JALINOT, P. Tax1 induction of the HTLV-I 21 bp enhancer requires cooperation between two cellular DNA-binding protein. **EMBO Journal**, v.9, n.3, p.957-964, 1990.

MONTANHEIRO, P.A.; OLIVEIRA, A.C.; POSADA-VERGARA, M.P.; MILAGRES, A.C.; TAUIL, C.; MARCHIORI, P.E.; DUARTE, A.J.; CASSEB, J. Human T-cell lymphotropic vírus type 1 (HTLV-1) proviral DNA load among asyntomatic patients and patients with HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.38, p.1643-1647, 2005.

MORIMOTO, H.K. **Infecção pelos vírus linfotrópicos de células T humanas dos tipos I (HTLV-I) e II (HTLV-II) em indivíduos portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) em Londrina e região, Paraná.** 2008. 171 f. (Dissertação). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo (SP), 2003.

MORIMOTO, H.K.; CATERINO-DE-ARAUJO, A.; MORIMOTO, A.A.; REICHE, E.M.V.; UEDA, L.T.; MATSUO, T.; STEGMANN, J.W.; REICHE, F.V. Seroprevalence and risk factors for human T-cell lymphotropic virus type 1 and 2 infection in human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients attending AIDS Referral Center Health Units in Londrina and other communities in Paraná, Brazil. **AIDS Research and Human Retroviruses***,* v.21, n.4, p.256-262, 2005.

MORIMOTO, H.K.; MORIMOTO, A.A.; REICHE, E.M.V.; UEDA, L.T; MATSUO, T.; REICHE, F.V.; CATERINO-DE-ARAUJO, A.. Difficulties in the diagnosis of HTLV-2 infection in HIV/AIDS patients from Brazil: Comparative performances of serologic and molecular assays, and detection of HTLV-2b subtype. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.49, p.225-230, 2007.

MOTA, A.C.A.; VAN DOOREN, S.; FERNANDES, F.M.C.; PEREIRA, S.A.; QUEIROZ, A.T.L.; GALLAZZI, V.O.; VANDAMME, A.-M.; GALVÃO-CASTRO, B.; ALCANTARA, L.C.J. The close relationship between South African and Latin American HTLV type 1 strains corroborated in a molecular epidemiological study of the HTLV type 1 isolates from a blood donor cohort. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v.23, n.4, p.503–507, 2007.

MOTA-MIRANDA, A.C.; ARAÚJO, S.P.; DIAS, J.P.; COLIN, D.D.; KASHIMA, S.; COVAS, D.T.; TAVARES-NETO, J.; GALVÃO-CASTRO, B.; ALCANTARA, L.C. HTLV-1 infection in blood donors from the Western Brazilian Amazon region: Seroprevalence and molecular study of viral isolates. **Journal of Medical Virology**, v.80, n.11, p.1966-1971, 2008.

MOTA-MIRANDA, A.C.A; BARRETO, F.K; AMARANTE, M.F.C.; BATISTA, E.; MONTEIRO-CUNHA, J.P.; FARRE, L.; GALVÃO-CASTRO, B.; ALCANTARA, L.C.J. Molecular characterization of HTLV-1 gp46 glycoprotein from health carriers and HAM/TSP infected individuals. **Virology Journal**, v.10, p.75, 2013.

MURPHY, E.L. The clinical epidemiology of human T-lymphotropic virus type II (HTLV-II). **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology**, v.13, n.1. p.S215-S219, 1996.

MURPHY, E.L.; MAHIEUX, R.; DE THÉ, G.; TEKAIA, F.; AMETI, D.; HORTON, J.; GESSAIN, A. Molecular epidemiology of HTLV-II among United States blood donors and intravenous drug user: An age-cohort effect for HTLV-II RFLP type a. **Virology**, v.242, p.425-434, 1998.

NAGAI, M.; USUKU, K.; MATSUMOTO, W.; KODAMA, D.; TAKENOUCHI, N.; MORITOYO, T.; HASHIGUCHI, S.; ICHINOSE, M.; BANGHAM, C.R.; IZUMO, S.; OSAME, M. Analysis of HTLV-I proviral load in 202 HAM/TSP patients and 243asymptomatic HTLV-I carriers: high proviral load strongly predisposes to HAM/TSP. **Journal of Neurovirology***,* v.4, n.6, p.586-593, 1998.

NAMEN–LOPES, M.S.S.; MARTINS, M.L.; DRUMMOND, P.C.; LOBATO, R.R.; Interdisciplinary HTLV Research Group; CARNEIRO–PROIETTI, A.B.F. Lookback study of HTLV-1 and 2 seropositive donors and their recipients in Belo Horizonte, Brazil. **Transfusion Medicine**, v.19, p.180–188, 2009.

NATIONAL GEOGRAPHIC SOCIETY. Geno 2.0: The greatest journey ever told. Your Story. Our Story. The Human Story. Disponível em: http://www.genographic.com Acesso em: 11 jan. 2013.

NETO, W.K.; DA-COSTA, A.C.; OLIVEIRA, A.C.S.; MARTINEZ, V.P.; NUKUI, Y.; SABINO, E.; SANABANI, S.S. Correlation between LTR point mutations and proviral load levels among human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) asymptomatic carriers. **Virology Journal***,* v.8, p.535, 2011.

NOVOA, P.; OLIVEIRA, A.C.P.; POSADA–VERGARA, M.P.; DUARTE, A.J.S.; CASSEB, J. Molecular characterization of human T-cell lymphotropic virus type 2 (HTLV-II) from people living in urban areas of Sao Paulo city: Evidence of multiple subtypes circulation. **Journal of Medical Virolology**, v.79, p.182–187, 2007.

NYBORG, J.K.; DYNAN, W.S.; CHEN, I.S.Y.; WACHSMAN, W. Binding of host-cell factors to DNA sequences in the long terminal repeat of human T-cell leukemia virus type I: Implications for viral gene expression (DNase I-protection assay/trans-activation/p'0"/protein-DNA interactions). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.85, p.1457-1461, 1988.

OKOCHI, K.; SATO, H.; HINUMA, Y. A retrospective study on transmission of adult T cell leukemia virus by blood transfusion: seroconversion in recipients. **Vox Sanguinis**, v.46, n.5, p.245-253, 1084.

ORLAND, J.R.; ENGSTROM, J.; FRIDEY, J.; SACHER, R.A.; SMITH, J.W.; NASS, C.; GARRATTY, G.; NEWMAN, B.; SMITH, D.; WANG, B.; LOUGHLIN, K.; MURPHY, E.L.; for the HTLV Outcomes Study (HOST). Prevalence and clinical features of HTLV neurologic disease in the HTLV outcomes study. **Neurology***,* v.61, p.1588-94, 2003.

PAGE, R.D.M. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. **Computer Applications in the Biosciences***,* v.12, p.357-358, 1996.

POIESZ, B.J.; RUSCETTI, F.W.; GAZDAR, A.F.; BUNN, P.A.; MINNA, J.D.; GALLO, R.C. Detection and isolation of type C retrovírus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. **Proceedings of the National Academy os Science of the United States of America**, v.77, p.7415-7419, 1980.

POSADA, D.; CRANDALL, K.A. Modeltest: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**, v.14, n.9, p.817-818, 1998.

POSADA-VERGARA, M.P.; MONTANHEIRO, P.; FUKUMORI, L.M.; BONASSER, F.; DUARTE, A.J.; OLIVEIRA, A.C.P.; CASSEB, J. Clinical and epidemiological aspects of HTLV-II infection in São Paulo, Brazil: presence of tropical spastic paraparesis/HTLVassociated myelopathy (TSP/HAM) simile diagnosis in HIV-1-co-infected subjects. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.48, p.207-210, 2006.

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

PROIETTI, A.B.F.C. Cadernos Hemominas - HTLV. 5. ed. Minas Gerais: Belo Horizonte: Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais. v.XV, 2010.

RAMIREZ, E.; CARTIER, L.; VILLOTA, C.; FERNANDEZ, J. Genetic characterization and phylogeny of human T-cell lymphotropic virus type I from Chile. **Virus Research***,* v.84, p.135-149, 2002.

RATNER, L.; PHILPOTT, T.; TROWBRIDGE, D.B. Nucleotide sequence analysis of isolates of human T-lymphotropic virus type I of diverse geographical origins. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v.7, n.11, p.923–941, 1991.

REGO, F.F.A.; ALCANTARA, L.C.; MOURA, J.P.; MIRANDA, A.C.; PEREIRA, O.S.; GONÇALVES, M.S.; GALVÃO-CASTRO, B. HTLV type 1 molecular study in Brazilian villages with African characteristics giving support to the post-Columbian introduction hypothesis. **AIDS Research and Human Retroviruses***,* v.24, n.5, p.673–677, 2008.

REGO, F.F.A.; MOTA-MIRANDA, A.; SANTOS, E.S.; GALVÃO-CASTRO, B.; ALCANTARA, L.C. Seroprevalence and molecular epidemiology of HTLV-1 isolates from HIV coinfected women in Feira de Santana, Bahia, Brazil. **AIDS Research and Human Retroviruses***,* v.26, n.12, p.1333-1339, 2010.

RENNER, J.D.P.; LAURINO, J.P.; MENNA–BARRETO, M.; SCHMITT, V.M. Molecular evidence of HTLV-II subtype B among an urban population living in South Brazil. **AIDS Research and Human Retroviruses***,* v.22, p.301–306, 2006.

ROSENBLATT, J. D.; GIORGI, J. V.; GOLDE, D. W.; EZRA, J. B.; WU, A.; WINGER, C. D.; GLASPY, J.; WACHSMAN, W.; CHEN, I. S. Y. Integrated human T-cell leukemia virus II genome in CD8+ T cells from a patient with "atypical" hairy cell leukemia: Evidence for distinct T and B cell lymphoproliferative disorders. **Blood**, v.71, p.363-369, 1988.

ROUCOUX, D.F.; MURPHY, E.L. The epidemiology and disease outcomes of human T-lymphotropic virus type II. **Aids Reviews**, v.6, n.3, p.144-154, 2004.

ROZANOV M, Plikat U, Chappey C, Kochergin A, Tatusova T. A web-based genotyping resource for viral sequences. **Nucleic Acids Research**, v.32 (Web Server issue), p.W654-W659, 2004

SAITOU, N. & NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstruction phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, 4:406-425, 1987.

SALEMI, M.; VAN DOOREN, S.; AUDENAERT, E.; DELAPORTE, E.; GOUBAU, P.; DESMYTER, J.; VANDAMME, A,M. Two new human T-lynphotropic virus type I phylogenetic subtypes in seroindeterminates, a Mbuti pygmy and a Gabonese, have closest relatives among African STLV-I strains. **Virology,** v.246, n.2, p.277-287, 1998a.

SALEMI, M.; VANDAMME, A.M.; GRADOZZI, C.; VAN LAETHEM, K.; CATTANEO, E.; TAYLOR, G.; CASOLI, C.; GOUBAU, P.; DESMYTER, J.; BERTAZZONI, U. Evolutionary rate and genetic heterogeneity of human T-cell lymphotropic virus type II (HTLV-II) using isolates from European injecting drug users. **Journal of Molecular Evolution**, v.46, p.602-611, 1998b.

SALEMI, M.; LEWIS, M.; EGAN, J.F.; HALL, W.W.; DESMYTER, J.; VANDAMME, A.–M. Different population dynamics of human T-cell lymphotropic virus type II in intravenous drug users compared with endemically infected tribes. **Proceedings of the National Academy os Science of the United States of America**, v.96, p.13253-13258, 1999a.

SALEMI, M.; VANDAMME, A.M.; DESMYTER, J.; CASOLI, C.; BERTAZZONI, U. The origin and evolution of human T-cell lymphotropic virus type II (HTLV-II) and the relationship with its replication strategy. **Gene**, v.234, p.11-21, 1999b.

SATOU, Y.; YASNAGA, J.; YOSHDA, M.; MATSUOKA, M. HTLV-I basic leucine zipper factor gene mRNA supports proliferation of adult T cell leukemia cells. **Proceedings of the National Academy os Science of the United States of America**, v.103, p.720-725, 2006.

SATOU, Y.; MATSUOKA, M. HTLV-1 and the host immune system: how the virus disrupts immune regulation, leading to HTLV-1 associated diseases. **Journal of Clinical and Experimental Hematopathology***,* v.50, n.1, p.1-8, 2010.

SCHECHTER, M.; HARRISON, L.H.; HALSEY, N.A.; TRADE, G.; SANTINO, M.; MOULTON, L.H.; QUINN, T.C. Coinfection with human T-cell lymphotropic virus type I and HIV in Brazil. **Journal of the American Medical Association**, v.271, n.5, p.353-357, 1994.

SEGURADO, A.A.C.; BIASUTTI, C.; ZEIGLER, R.; RODRIGUES, C.; DAMAS, C.D.; JORGE, M.L.S.G.; MARCHIORI, P.E. 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**, v.97, n.3, p.329-333, 2002.

SEIKI, M.; HATTORI, S.; HIRAYAMA, Y.; YOSHIDA, M. Human adult T-cell leukemia: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. **Proceedings of the National Academy os Science of the United States of America***,* v.80, p.3618-3622, 1983.

SHIMOTOHNO, K.; TAKAHASHI, Y.; SHIMIZU, N.; GOJOBORI, T.; GOLDE, D.W.; CHEN, I. S.Y. Complete nucleotide sequence of an infectious clone of human T-cell leukemia virus type II: An open reading frame for the protease gene**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.82, p.3101-3105, 1985.

SHINDO, N.; ALCANTARA, L.C.; VAN DOOREN, S.; SALEMI, M.; COSTA, M.C.; KASHIMA, S.; COVAS, D.T.; TEVA, A.; PELLEFRINI, M.; BRITO, I.; VANDAMME, A.M.; GALVÃO-CASTRO, B. Human retroviruses (HIV and HTLV) in Brazilian Indians: Seroepidemiological study and molecular epidemiology of HTLV type 2 isolates. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v.18, n.1, p.71-77, 2002.

SLATTERY, J. P.; FRANCHINI, G.; GESSAIN, A. Genomic evolution, patterns of global dissemination, and interspecies transmission of human and simian T-cell leukemia/lymphotropic viruses. **Genome Research**, v.9, p.525-540, 1999.

SONODA, S.; LI, H.C.; TAJIMA, K. Ethnoepidemiology of HTLV-1 related diseases: ethnic determinants of HTLV-1 susceptibility and its worldwide dispersal. **Cancer Science**, v.102, n.2, p.295-301, 2011.

SOARES, R.M.G.; MORAES, H.V. Manifestações oculares observadas em indivíduos infectados por HTLV-I no Rio de Janeiro. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v.63, n.4, p.293-298, 2000.

SUZUKI, Y.; GOJOBORI, T. The origin and evolution of the human T-cell lymphotropic virus type I and II. **Virus Genes**, v.16, p.69-84, 1998.

SWITZER, W.M.; PIENIAZEK, D.; SWANSON, P.; SAMDAL, H.H.; SORIANO, V.; KHABBAZ, R.F.; KAPLAN, J.E.; LAL, R.B.; HENEINE, W. Phylogenetic relationship and geographic distribution of multiple human T-cell lymphotropic virus type II subtypes. **Journal of Virology**, v.69, p.621-632, 1995.

SWITZER, W.M.; BLACK, F.L.; PIENIAZEK, D.; BIGGAR, R.J.; LAL, R.B.; HENEINE, W. Endemicity and phylogeny of the Human T cell lymphotropic vírus type II subtype A from the Kayapo Indians of Brazil: Evidence for limited regional dissemination. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v.12, p.635-640, 1996.

SWITZER, W.M.; SALEMI, M.; QARI, S.H.; JIA, H.; GRAY, R.R.; KATZOURAKIS, A. Ancient, independent evolution and distinct molecular features of the novel human T-lymphotropic virus type 4. **Retrovirology**, v.6, p.1-9, 2009.

SWOFFORD, D.L. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods). V*ersion 4.0.b10. Sunderland, MA: Sinauer Associates,* 2002.

TAKAHASHI, H., ZHU, S.W.; IJICHI, S.; VAHLNE, A.; SUZUKI, H.; HALL, W.H. Nucleotide sequence analysis of human T cell leukemia virus, type II (HTLV-II) isolates. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v.9, p.721-732, 1993.

TAKEDA, S.; MAEDA, M.; MORIKAWA, S.; TANIGUCHI, Y.; YASUNAGA, J.; NOSAKA, K.; TANAKA, Y.; MATSUOKA, M. Genetic and epigenetic inactivation of tax gene in adult T-cell leukemia cells. **International Journal of Cancer***,* v.109, n.4, p.559-567, 2004.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v.24, p.1596-1599, 2007.

TANAKA, Y.; TANAKA, R.; HOSHINO, H. Identification of a novel neutralization epitope on envelope gp46 antigen of human T-cell-leukemia virus-type-II (HTLV-II). **International Journal of Cancer**, v.59, n.5, p.655-660, 1994.

TATTERMUSCH, S.; SKINNER, J.A.; CHAUSSABEL, D.; BANCHEREAU, J.; BERRY, M.P.; McNAB, F.W.; O'GARRA, A.; TAYLOR, G.P.; BANGHAM, C.R.M.. Systems biology approaches reveal a specific interferon-inducible signature in HTLV-1 associated myelopathy. **PLoS Pathogens**, v.8, n.1, p.e1002480, 2012.

TAYLOR, G.P. The Human T Cell Lymphotropic Viruses. In: ZUCKERMAN, A.J.; BANATVALA, J.E.; PATTISON, J.R.; GRIFFITHS, P.D.; SCHOUB, B.D. **Principles and Practice of Clinical Virology**. 5. ed. John Wiley & Sons Ltd, New Jersey, 2004. cap.25A, p.759-777.

UNAIDS. Global Report – UNAIDS report for the global Aids epidemic – 2010. Disponível em: http://www.unaids.org/globalreport/HIV_prevalence_map.htm. Acesso em: 19 jan. 2012.

URETA-VIDAL, A.; GESSAIN, A.; YOSHIDA, M.; TEKAIA, F.; GARIN, B.; GUILLEMAIN, B.; SCHULZ, T.; FARID, R.; DE THÉ, G. Phylogenetic classification of human T cell leukemia/lymphoma virus I genotypes in five major molecular and geographical subtypes. **Journal of General Virology**, v.75, p.3655-3666, 1994.

VAN DOOREN, S.; SALEMI, M.; VANDAMME, A. M. Dating the origin of the human T-cell lymphotropic virus type-I (HTLV-I) subtypes. **Molecular Biology and Evolution**, v.18, p.661-671, 2001.

VANDAMME, A. M.; SALEMI, M.; VAN BRUSSEL, M.; LIU, H.-F.; LAETHEM, K. V.; RANST, M. V.; MICHELS, L.; DESMYTER, J.; GOUBAU, P. 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**, v.72, p.4327-4340, 1998.

WATTEL, E.; VARTANIAN, J.P.; PANNETIER, C.; WAIN-HOBSON, S. Clonal expansion of human T-cell leukemia virus type I-infected cells in asymptomatic and symptomatic carriers without malignancy. **Journal of Virology**, v.69, n.5, p.2863-2868, 1995.

WILSON, K.N.; MAERZ, A.L.; POUMBOURIOS, P. Evidence that the transmembrane domain proximal region of the humam T-cell leukemia virus type 1 fusion glycoprotein gp21 has distinct roles in the prefusion and fusion-activated states. **The Journal of Biological Chemistry**, v.276, n.52, p.49466-49475, 2001.

WOLFE, N.D.; HENEINE, W.; CARR, J.K.; GARCIA, A.D.; SHANMUGAM, V.; TAMOUFE, U.; TORIMIRO, J.N.; PROSSER, A.T.; LEBRETON, M.; MPOUDI-NGOLE, E.; MCCUTCHAN, F.E.; BIRX, D.L.; FOLKS, T.M.; BURKE, D.S.; SWITZER, W.M. Emergence of unique primate t-lymphotropic viruses among central African bush meat hunters. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.102, n.2, p.7994-7999, 2005.

YAMANO, Y.; NAGAI, M.; BRENNAN, M.; MORA, C.A.; SOLDAN, S.S.; TOMARU, U.; TAKENOUCHI, N.; IZUMO, S.; OSAME, M.; JACOBSON, S. Correlation of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) mRNA with proviral DNA load, virus-specific CD8(+) T cells, and disease severity in HTLV-1-associated myelopathy (HAM/TSP). **Blood**, v.99, n.1, p.88-94, 2002.

YAMASHITA M, VERONESI, R.; MENNA-BARRETO, M.; HARRINGTON, W.Jr.; SAMPIO, C.; BRITES, C.; BADARÓ, R.; ANDRADE-FILHO, A.S.; OKHURA, S.; IGARASHI, T.; TAKEHISA, J.; MIURA, T.; CHAMONE, D.; BIANCHINI, O.; JARDIM, C.; SONODA, S.; HAYAMI, M. Molecular epidemiology of human T-cell leukemia virus type I (HTLV-1) Brazil: The predominant HTLV-1s in South America differ from HTLV-l of Japan and Africa, as well as those of Japanese immigrants and their relatives in Brazil. **Virology**, v.261, n.1, p.59-69, 1999.

YARA, S.; FUJITA, J.; DATE, H. Transmission of human T-lymphotropic virus type I by bilateral living-donor lobar lung transplantation. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery***,* v.138, n.1, p.255-256, 2009.

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

YOSHIDA, M. Multiple viral strategies of HTLV-1 for dysregulation of cell growth control. **Annual Review of Immunology**, v.19, p.475-496, 2001.

ZUNT, J.R.; TAPIA, K.; THIEDE, H.; LEE, R.; HAGAN, H. HTLV-2 infection in injection drug users in King County, Washington. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v.38, n.8, p.654-663, 2006.

Anexos

ANEXOS

Anexo A - Carta de concordância em participar da pesquisa e utilizar o material biológico.

Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 10 de agosto de 2007.

DECLARAÇÃO

Declaro a quem possa interessar que eu, Helena Kaminami Morimoto, RG No. 1.418.364/7 - SSP-PR, Professora do Depto de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Estadual de Londrina, Paraná, autorizo a Dra Adele Caterino de Araujo, PqC VI da Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo a utilizar amostras de DNA e soro obtidos de pacientes co-infectados pelo HIV/HTLV-I e HIV/HTLV–II do norte do Paraná, para trabalho em colaboração sobre infecção por HTLVs que inclui o seqüenciamento e a padronização de técnicas diagnósticas úteis para serem usadas no Brasil.

Este estudo colaborativo teve início com minha Dissertação de Mestrado defendida em 2003 na FCF-USP, sob orientação da Professora Adele Caterino de Araujo. Pela impossibilidade de permanência e continuidade do trabalho em São Paulo, autorizo a professora Adele a delegar esta nova etapa do trabalho a outro aluno de Pós-Graduação sob sua orientação.

Esclareço que o material biológico destes pacientes encontra-se na Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz e que os consentimentos informados estão sob minha guarda/responsabilidade, em Londrina, Paraná. A Resolução 196/96 e os princípios de bioética fundamentados de autonomia (respeito ao paciente), beneficência (fazer o bem), não maleficência (não fazer o mal) e equidade de justiça são de conhecimento dos profissionais envolvidos na condução do projeto. Os materiais biológicos foram colhidos de acordo com as normas estabelecidas pela Portaria No 59 do Ministério da Saúde.

A condução e a divulgação desse estudo têm como propósito solucionar problemas relacionados ao diagnóstico de infecção, principalmente por HTLV-II, no Brasil e que fornecerá resultados para as Instituições envolvidas (publicações em revistas internacionais).

Sem mais,

Helena Kaminami Morimoto
Docente da disciplina de Imunologia

Campus Universitário: Rodovia Celso Garcia Cid (PR 445), Km 380 - Fone (43) 371-4000 PABX - Fax 328-4440 - Caixa Postal 6.001 - CEP 86051-990 - Internet http://www.uel.br
Hospital Universitário/Centro de Ciências da Saúde: Av. Robert Koch, 60 - Vila Operária - Fone (43) 371-2000 PABX - Fax 337-4041 e 337-7495 - Caixa Postal 791 - CEP 86038-440
LONDRINA - PARANÁ - BRASIL

Form. Código 11.764 - Formato A4 (210x297).

Anexo B - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO PROJETO

Protocolo CEP nº 494
Parecer CEP nº 07/12012009

Senhora Pesquisadora
Profa. Dra. Adele Caterino de Araújo,

I - Identificação

Projeto de Pesquisa:	Vírus linfotrópicos de células T humanas dos tipos 1 e 2 (HTLV-1 e HTLV-2). Estudo de segmentos do genoma proviral obtidos de pacientes com HIV/Aids de Londrina e região.
Pesquisador Responsável:	Adele Caterino de Araújo
Instituição:	FCF-USP e Instituto Adolfo Lutz
Área Temática Especial:	
Patrocinadores:	CNPq

II - Sumário Geral do Protocolo

Os pesquisadores pretendem nesta etapa do projeto, seqüenciar partes do genoma proviral de HTLV-1 e HTLV-2 (regiões LTR,*pol*, *env* e *tax*) com vistas a subtipar os vírus que circulam na região de Londrina, PR, e comparar os resultados com os de outras localidades. Também pretendem clonar e expressar a rgp46-II (proteína do HTLV-2) para uso em testes diagnósticos.

Os autores pretendem utilizar 39 amostras anteriormente (projeto 148 CEP da FCF/USP, em 2002) coletadas e armazenadas desde então com a pesquisadora. A Dra Helena Kaminami Morimoto (que utilizou as amostras em 2002/2003 no seu mestrado, e é professora na Universidade Estadual de Londrina), presta declaração neste projeto, informando que mantem os TCLE obtidos dos pacientes na ocasião e que constava no projeto inicial também esta etapa de trabalho.

Os objetivos do presente estudo são:

-confirmar a hipótese de que os resultados indeterminados do WB (produzido com cepas isoladas de casos japoneses e norte-americanos) se devem a diferenças nos componentes antigênicos dos vírus que circulam Brasil em relação aos usados na composição dos "kits" diagnósticos.

-sequenciar partes do genoma proviral de HTLV-1 e HTLV-2 (regiões LTR,*pol*, *env* e *tax*) com vistas a subtipar os vírus que circulam na região de Londrina, PR, compará-los aos protótipos usados na composição do WB 2.4, com ênfase para a rgp46-1 (MTA) e rgp-II (K55).

-Dependendo dos resultados obtidos, propor a clonagem e expressao da rgp46-II de isolados brasileiros para ser usada no preparo de tiras de imunoblot (IB) ou dot-ELISA para serem usadas como teste confirmatório da infecção por HTLV-2 no Brasil.

Tipo de estudo: Amostragem de casos isolados (retrospectivo)

Av. Prof. Lineu Prestes, nº 580, Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone / Fax: (11) 3813-6093 - e-mail: cepfcf@usp.br

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

III – SITUAÇÃO DO PROTOCOLO: APROVADO

Cabe ao pesquisador:

- Comunicar ao CEP a ocorrência de efeitos colaterais e ou de reações não esperadas;
- Comunicar ao CEP eventuais modificações no projeto aguardando a apreciação e aprovação do CEP;
- Comunicar e justificar a interrupção do projeto;
- Apresentar relatórios: parcial (após 50% da execução do projeto) e final.

São Paulo, 6 de abril de 2009.

Profa. Dra. Mariza Landgraf
Vice-Coordenadora em exercício
Comitê de Ética em Pesquisa
FCF/USP

Anexo C - Aprovação das modificações no projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comitê de Ética em Pesquisa

Ofício CEP/FCF/77/2010

São Paulo, 12 de julho de 2010.

Ilmo(a). Sr(a).
Profa. Dra. Adele Caterino de Araujo
FBC

Senhor(a) Pesquisador(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 08 de julho de 2010, APROVOU as alterações do projeto intitulado "Vírus linfotrópicos de células T humanas dos tipos 1 e 2 (HTLV-1 e HTLV-2). Estudo de segmentos do genoma proviral obtidos de pacientes com HIV/Aids de Londrina e região" (Protocolo CEP nº 494) apresentada por Vossa Senhoria.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, nº 580, Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: 3091-3622, Fone / Fax: (11) 3091-3677 - e-mail: cepfcf@usp.br

Anexo D - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
Comitê de Ética em Pesquisa - CEPIAL
Av. Dr. Arnaldo, 355 – Sala 83 - Cerqueira César - 01246-902
Fone: 3068-2859 e-mail: cepial@ial.sp.gov.br

São Paulo, 23 de junho de 2010.

Parecer: **035 /2010**

Titulo do Projeto: **"Vírus linfotrópicos de células T humanas dos tipos 1 e 2 (HTLV 1 e HTLV- 2). Estudo de segmentos do genoma proviral obtidos de pacientes com HIV/Aids de Londrina e região".**

Pesquisador Responsável: Adele Caterino de Araujo

Instituição: Instituto Adolfo Lutz

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz – CEPIAL analisou e deliberou em reunião de 22 de junho de 2010, de acordo com a Resolução CNS nº 196, de 10 de outubro de 1996 e suas resoluções complementares, o projeto acima na categoria **APROVADO.**

- *O projeto de pesquisa foi enquadrado na categoria APROVADO, após revisão ética da inclusão de amostras de São Paulo e alteração de titulo para "Vírus linfotrópicos de células T humanas dos tipos 1 e 2 (HTLV-1 e HTLV-2). Estudo de segmentos do genoma proviral obtidos de pacientes com HIV/Aids de São Paulo e de Londrina e região", com anuência do autor.*

Em conformidade com o item IX.2 da Resolução CNS nº 196/96 - cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final ; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo, sob sua guarda, por 5 anos, os dados da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar, perante o CEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados. Os relatórios parciais deverão ser encaminhados a cada seis meses a partir do inicio da pesquisa.

Luz Marina Trujillo
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
Instituto Adolfo Lutz – CEPIAL

1ª via – coordenador
2ª via - CEPIAL
LMT/dvmp

Anexo E - Aprovação do Conselho Técnico Científico do Instituto Adolfo Lutz.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
CTC / IAL

Projeto nº 0049D-2010

Vírus linfotrópicos de células T humanas do tipo 1 e 2(HTLV-1 e HTLV-2). Estudo de segmentos do genoma proviral obtidos de pacientes com HIV/AIDS de Londrina e região

Coordenação: Adele Caterino de Araujo

Senhora Coordenadora,

Comunicamos que o projeto supra citado foi **cadastrado** no Conselho Técnico Científico do Instituto Adolfo Lutz, após aprovação quanto o mérito científico pela CCD/BM e após aprovação quanto aos aspectos éticos pela Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto Adolfo Lutz/CEPIAL.

ADRIANA BUGNO
Presidente do CTC/IAL

São Paulo, 18 de Agosto de 2010

1ª via: CTC/IAL
2ª via: Coordenador

Anexo F - Bases degeneradas e seus respectivos símbolos, utilizados para otimização de alguns dos *primers* do presente estudo.

Bases degeneradas	Símbolos
A+C+G+T	N
A+C+G	V
A+T+G	D
T+C+G	B
A+T+C	H
A+T	W
C+G	S
T+G	K
A+C	M
C+T	Y
A+G	R

Anexo G - Resumo publicado em revista internacional: MAGRI *et al*., *Retrovirology*, v.8, n.1, p.A68, 2011. (DOI: 10.1089/AID.2011.0117)

Magri *et al. Retrovirology* 2011, **8**(Suppl 1):A68
http://www.retrovirology.com/content/8/S1/A68

RETROVIROLOGY

MEETING ABSTRACT **Open Access**

Phylogenetic and similarity analysis of HTLV-1 isolates from HIV-coinfected patients from the South and Southeast regions of Brazil

Mariana C Magri[1,2*], Helena K Morimoto[3], João L P Ferreira[1], Rosangela Rodrigues[1], Luis F M Brigido[1], Adele Caterino-de-Araujo[1,2]

From 15th International Conference on Human Retroviruses: HTLV and Related Viruses
Leuven and Gembloux, Belgium. 5-8 June 2011

Background

HTLV-1 is endemic in Brazil (0.07-15.9%) and HIV/HTLV-1-coinfection has been detected, mostly in the North and Northeast regions. This study characterized HTLV-1 isolates from HIV-coinfected patients from Southern and Southeastern Brazil.

Material and methods

DNA from 17 HIV/HTLV-1-co-infected patients; 5 from the South and 12 from Southeast were amplified by nested-PCR (env and LTR) and sequenced. HTLV subtyping was performed by NCBI-Genotyping and REGA-Subtyping tools websites and by phylogenetic methods using Paup4 and MEGA4.

Results

Env sequences (705-bp) from 15 isolates and LTR sequences (731-bp) from 17 isolates were obtained. Molecular analysis of env and LTR sequences disclosed respectively, nucleotide similarities of 99.5% and 98.8% within sequences, 99% and 97.4% with ATK, and 91.6% and 90.3% with Mel5. Four sequences that showed the highest similarities with ATK clustered separately in the trees ($p \leq 0.001$ for env and LTR, bootstrap=96% for LTR); they had C386T and T594C nucleotide substitutions in LTR sequences. All except these four sequences had mutations T5637G, T5730C, A6120G in env and T500A, A549G, G676A, T766C, T767G in LTR sequences. Six sequences presented the amino acid change V1981I and clustered together in the env tree. All isolates belonged to Cosmopolitan HTLV-1a subtype.

Conclusions

These data show that Cosmopolitan HTLV-1a subtype is also frequent in HIV-coinfected patients from Southern and Southeastern Brazil, suggesting spreading of HTLV-1 in the country. The mutations observed should be monitored in the context of molecular epidemiology.

Acknowledgements

Support: CAPES (PhD fellowship to MCM), CNPq (PD felowship to ACA #303328/2009-6 and grant #481040/2007-2), IAL (grant #39/07).

Author details

[1]Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brazil. [2]Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP, São Paulo, SP, Brazil. [3]Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brazil.

Published: 6 June 2011

doi:10.1186/1742-4690-8-S1-A68
Cite this article as: Magri *et al.*: Phylogenetic and similarity analysis of HTLV-1 isolates from HIV-coinfected patients from the South and Southeast regions of Brazil. *Retrovirology* 2011 **8**(Suppl 1):A68.

* Correspondence: marimagri@ig.com.br
[1]Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brazil
Full list of author information is available at the end of the article

BioMed Central

© 2011 Magri et al; licensee BioMed Central Ltd. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/2.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Anexo H - Artigo publicado: MAGRI *et al.*, *AIDS Research and Human Retroviruses*, v.28, p.110-114, 2012a. (DOI: 10.1089/aid.2011.0117)

AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES
Volume 28, Number 1, 2012
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/aid.2011.0117

Phylogenetic and Similarity Analysis of HTLV-1 Isolates from HIV-Coinfected Patients from the South and Southeast Regions of Brazil

Mariana Cavalheiro Magri,[1,2] Luis Fernando de Macedo Brigido,[1] Rosangela Rodrigues,[1] Helena Kaminami Morimoto,[3] João Leandro de Paula Ferreira,[1] and Adele Caterino-de-Araujo[2,4]

Abstract

HTLV-1 is endemic in Brazil and HIV/HTLV-1 coinfection has been detected, mostly in the northeast region. Cosmopolitan HTLV-1a is the main subtype that circulates in Brazil. This study characterized 17 HTLV-1 isolates from HIV coinfected patients of southern ($n=7$) and southeastern ($n=10$) Brazil. HTLV-1 provirus DNA was amplified by nested PCR (*env* and LTR) and sequenced. *Env* sequences (705 bp) from 15 isolates and LTR sequences (731 bp) from 17 isolates showed 99.5% and 98.8% similarity among sequences, respectively. Comparing these sequences with ATK (HTLV-1a) and Mel5 (HTLV-1c) prototypes, similarities of 99% and 97.4%, respectively, for *env* and LTR with ATK, and 91.6% and 90.3% with Mel5, were detected. Phylogenetic analysis showed that all sequences belonged to the transcontinental subgroup A of the Cosmopolitan subtype, clustering in two Latin American clusters.

The human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) was first described in 1980, and infects about 10–20 million people worldwide. Since then several epidemiological, clinical, and laboratory studies have been conducted around the world.[1] The most frequent subtype circulating in the world is the HTLV-1a (Cosmopolitan).[2] In South America, the prevalence of HTLV infection ranges from 0.1% to 5% in the general population.[2] Brazil emerges as first in the number of HTLV-infected individuals in the world, estimated at 2.5 million. HTLV-1 infection is detected mostly in northeastern Brazil, probably as a consequence of the slave trade during the seventeenth, eighteenth, and nineteenth centuries,[3] and HIV/HTLV-1 coinfection in this region is more frequent than HIV/HTLV-2 coinfection.

The HTLV-1 retrovirus has a conserved genome, with only 0.1% to 6.9% genetic diversity among strains. The *env* and long terminal repeat (LTR) regions have the highest variability,[4] and are useful for viral subtype characterization. Mostly individuals remain asymptomatic, but this infection may cause a wide spectrum of diseases, including leukemia (adult T cell leukemia/lymphoma, ATL) and neurodegenerative disorders (HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis, HAM/TSP).[1] In Brazil, the majority of HTLV-1 molecular characterization studies were conducted in patients presenting ATL and HAM/TSP and in asymptomatic blood donors. Studies of HTLV-1 in HIV-coinfected patients are limited and are attributed to HTLV-1a, the main strain also circulating in HIV/HTLV-1-coinfected individuals.[3,5–8]

The present study was conducted to add information concerning HTLV-1 strains that circulate in HIV-coinfected patients from the south and southeast regions of Brazil, thought to have more cases of HIV/HTLV-2 coinfection.[9,10] Seventeen HIV/HTLV-1-coinfected patients attending Aids Reference Centers, seven (one woman and six men) from Londrina-LO (south), and 10 (seven women and three men) from São Paulo-SP (southeast), were enrolled in this analysis. HTLV genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes (PBLs). Nested polymerase chain reaction (n-PCR) was performed to amplify a 763-bp *env* and 766-bp LTR region of HTLV-1, using protocols previously described (Tables 1 and 2)[6,11] in which some primers have undergone minor nucleotide modifications and thermal cycling conditions were adjusted. *Env* and LTR amplified products were sequenced in an ABI 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems, USA), with the same primers used in the n-PCR.

[1]Laboratório de Retrovirus, Centro de Virologia, Instituto Adolfo Lutz, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, São Paulo, S.P., Brazil.
[2]Faculdade de Ciências Farmacêuticas–Universidade de São Paulo, São Paulo, S.P., Brazil.
[3]Departmento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR., Brazil.
[4]Centro de Imunologia, Instituto Adolfo Lutz, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, São Paulo, S.P., Brazil.

TABLE 1. PRIMERS EMPLOYED IN POLYMERASE CHAIN REACTION ASSAYS (*env* AND LTR)

Molecular assay	*Primer*	*Sequence 5′–3′ and product size*	*Position*[a]
PCR *env*[b]	D498 forward	ATG GGT AAG TTT CTB GCC (18 bp)	5202–5219
	D500 reverse	TTA CAG GGA TGA CTB AGG (18 bp)	6668–6651
n-PCR *env*[b]	LUI 7 forward	CCG TCT CCA GYC CMT MCT GGA (21 bp)	5547–5567
	LUI 8 reverse	CCT CGT CTR TTY TGG GCW GCA (21 bp)	6309–6289
PCR LTR[c]	LTR-I.03 forward	GGC TTA GAG CCT CCC AGT GA (20 bp)	57–76
	LTR-I.02 reverse	CGC GGA ATA GGG CTA GCG CT (20 bp)	864–845
n-PCR LTR[c]	LTR-I.03 forward	GGC TTA GAG CCT CCC AGT GA (20 bp)	57–76
	LTR-I.04 reverse	GCC TAG GGA ATA AAG GGG CG (20 bp)	822–803

[a]Primer nucleotide position is provided as aligned with ATK (HTLV-1-infected cell line; GenBank Accession number J02029). bp, base pairs; n-PCR, nested polymerase chain reaction.
[b]Adapted from Caterino-de-Araujo *et al.*[11]
[c]Adapted from Laurentino *et al.*[6]
Primers were employed to detect HTLV-1 provirus DNA in peripheral blood leucocytes of HIV coinfected patients from the south (Londrina-LO) and the southeast (São Paulo-SP) regions of Brazil.

All sequencing chromatograms obtained were assembled and manually edited with Sequencher 4.7 software. Multiple alignments were performed using the Clustal W multiple-sequence alignment tool from BioEdit Sequence Alignment Editor version 7.0.5.3 software, with a reference set available in the GenBank database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank). HTLV-1 subtyping was primarily screened by NCBI-Genotyping (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi) and REGA-Subtyping (http://www.bioafrica.net/rega-genotype/html/subtypinghtlv.html) tools websites. Neighbor-joining (NJ) and maximum-likelihood (ML) phylogenetic trees were constructed based in appropriate nucleotide substitution models determined by Modeltest v3.7 (TrN + G model for *env* and GTR + G model for LTR), using PAUP v4b10 software. Bootstrapping was performed using the stepwise addition algorithm for 1.000 replicates. The Mel5 (HTLV-1c) sequence was used as the outgroup. *MEGA*4 software was used to estimate nucleotide distances.

Env sequences (705 bp) from 15 isolates and LTR sequences (731 bp) from 17 isolates were obtained. Molecular analysis of *env* and LTR sequences disclosed, respectively, nucleotide similarities of 99.5% and 98.8% among sequences, 99% and 97.4% with ATK, and 91.6% and 90.3% with Mel5.

Phylogenetic analysis of a segment of 705 bp of 44 HTLV-1 *env* sequences available in the GenBank database including the 15 new sequences from the south and southeast regions of Brazil were used to construct the *env* phylogenetic tree (Fig. 1). A segment of 692 bp of 59 HTLV-1 LTR sequences available in GenBank including the 17 new sequences of this study was used to construct the LTR phylogenetic tree (Fig. 2).

Four sequences that showed the highest similarities with ATK clustered separately in the trees ($p \leq 0.001$ for *env* and LTR, bootstrap = 96% for LTR); they had C386T, T594C and

TABLE 2. PCR ASSAYS (*env* AND LTR) PROTOCOL

	HTLV-1 env[a]		*HTLV-1 LTR*[b]	
Reaction conditions	*PCR*	*n-PCR*	*PCR*	*n-PCR*
Reagents				
Tris-EDTA Buffer 10×	5 μl	5 μl	5 μl	5 μl
$MgCl_2$ 50 mM	1.5 μl	1.5 μl	2.5 μl	2.5 μl
dNTP 10 mM	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl
Taq DNA polymerase 5 U/μl	0.5 μl	0.5 μl	0.5 μl	0.5 μl
Primer forwaed 10 pmol/μl	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl
Primer reverse 10 pmol/μl	1 μl	1 μl	1 μl	1 μl
H_2O	35 μl	35 μl	34 μl	34 μl
DNA input	5 μl	5 μl	5 μl	5 μl
Final volume	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl
Thermal cycling conditions	95°C—5 min		94°C—5 min	
	35 cycles { 95°C—1 min		35 cycles { 94°C—1 min	
	55°C—2 min		57°C—1 min	
	72°C—3 min		72°C—2 min	
	72°C—7 min		72°C—7 min	
	8°C—∞		8°C—∞	

[a]Adapted from Caterino-de-Araujo *et al.*[11]
[b]Adapted from Laurentino *et al.*[6]
Protocol for detecting HTLV-1 provirus DNA in peripheral blood leukocytes of HIV co-infected patients from the south (Londrina-LO) and the southeast (São Paulo-SP) regions of Brazil.

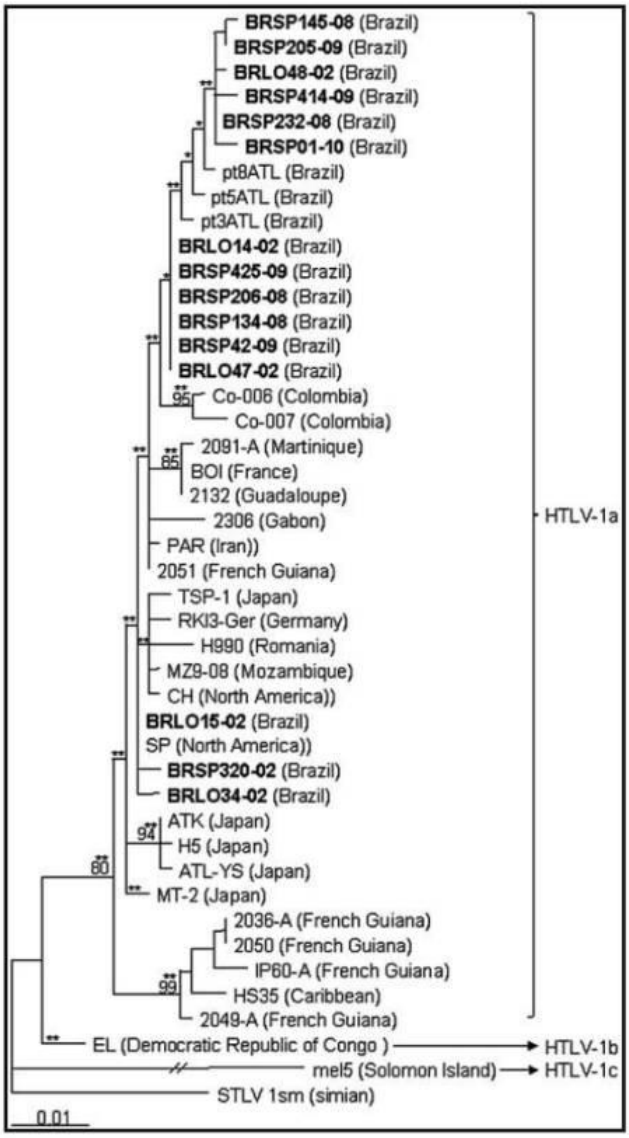


FIG. 1. Phylogenetic tree constructed by the maximum-likelihood method using the PAUP v4b10 software for the partial *env* region of 705 bp (position 5614–6318 relative to the ATK prototype) of HTLV-1 of 44 isolates, including sequences from the south and southeast regions of Brazil (GenBank AN HM770426-HM770440) in bold, generated with the TrN + G model. Bootstrap values above 70% and zero length using the likelihood ratio test with $p < 0.001$ (**) and $p \leq 0.05$ (*) in key branches are depicted. The HTLV-1 Mel5 isolate was used as the outgroup.

C595T nucleotide substitutions in the LTR region (BRLO14-02, BRLO30-02, BRLO34-02, and SP320-09). All except these four sequences had mutations T5637G, T5730C, and A6120G in *env* and T500A, A549G, G676A, T766C, and T767G in the LTR regions. Six sequences presented the amino acid change V1981I and clustered together in the *env* tree (BRLO48-02, BRSP145-08, BRSP205-09, BRSP232-08, BRSP414-09, and BRSP01-10).

According to the NCBI-Genotyping and the REGA-Subtyping websites all isolates from the present study belonged to the Cosmopolitan HTLV-1a subtype, the same subtype detected by phylogenetic analysis (bootstrap value of 80% for *env* and 87% for LTR, and a $p < 0.001$ for both). In addition, all isolates belonged to the Transcontinental subgroup A (supported by a $p < 0.001$) and clustered in two Latin American clusters (A and B) in the LTR tree (supported by a $p < 0.001$ in ML analyses).

These phylogenetic results are in accordance with the results obtained in HTLV-1 strains characterized from the north and northeast regions of Brazil. In fact, nucleotide similarities in LTR sequences of 99.2% and 98.9%, respectively, were detected in strains isolated from individuals from Cruz das Almas and Salvador cities (southeastern Brazil), and of 99.3% and 97.3%, respectively, in strains isolated from individuals from Fortaleza and Rio Branco cities (northern Brazil).[12,13]

Molecular analysis of HTLV-1 isolates from HIV-1/HTLV-1-coinfected individuals from northern Brazil disclosed the Cosmopolitan HTLV-1a subtype circulating in four women from Feira de Santana, state of Bahia,[6] and in two men from Belém, state of Para.[7] Corroborating these and the present study, phylogenetic analysis of HTLV-1 isolates from several populations in Brazil confirms HTLV-1a, Transcontinental subgroup A as the most prevalent in the country,[8,12,13] and suggests a post-Columbian introduction of HTLV-1 into the Brazilian population in the state of Bahia and maybe in other places in Latin America.[3,7,12,14]

Indeed, the majority of the sequences from this study clustered into Latin American Cluster A, although some sequences clustered in Latin American Cluster B. The well-divided clusters of Latin American could suggest different introductions of HTLV-1 in Brazil, and also in HIV/HTLV-1-coinfected individuals (both from the south and southeast regions). Still, the high level of similarities among sequences leads us to speculate on a recent introduction of HTLV-1 in Brazil.

In conclusion, these data show that the Cosmopolitan HTLV-1a subtype is also frequent in HIV coinfected patients from southern and southeastern Brazil, suggesting spreading of HTLV-1 in the country. The mutations observed should be monitored in the context of molecular epidemiology. Moreover, this is the first study of the molecular characterization of HTLV-1 sequences from Londrina, southern Brazil, providing insight into the HTLV-1 dynamic epidemic in this country.

Sequence Data

The GenBank accession numbers for the HTLV-1 sequences included in the phylogenetic study are as follows: ***env***: ATK (J02029), TSP-1 (M86840), MT-2 (M37747), HS35(D13784), CH (M69044), 2036-A (AY604874), pt3ATL (U81866), pt5ATL (U81867), pt8ATL (U81868), 2306 (AY604896), MZ9-08 (HM770441), EL (M67514), Co-006 (AF405343), Co-007 (AF405344), 2049-A (AY604875), 2050 (AY604876), 2051 (AY604877), 2091-A (AY604885), 2132 (AY604887), BOI (L36905), ATL-YS (U19949), H5 (M37301), H990 (U81862), IP60-A (AY604934), PAR (AY604935), RK13-Ger (AF042071), SP (M69044), Mel5 (L02534), STLV-1-sm (U94516); **LTR**: ATK (J02029), pyg19 (L76310), IT IS (Z32527), MWMG (Z31662), T49 (L76305), GAB7 (L76311), GH78 (D23693), OD (U12805), BO (U12804), Ni3.Peru (Y16485), H5 (M37299), HTLV01 (DQ005556), HTLV20 (DQ005564), CH26 (D23690), FNN148 (DQ005548), Nar (AF063820), Me3.Peru (Y16480), FNN155

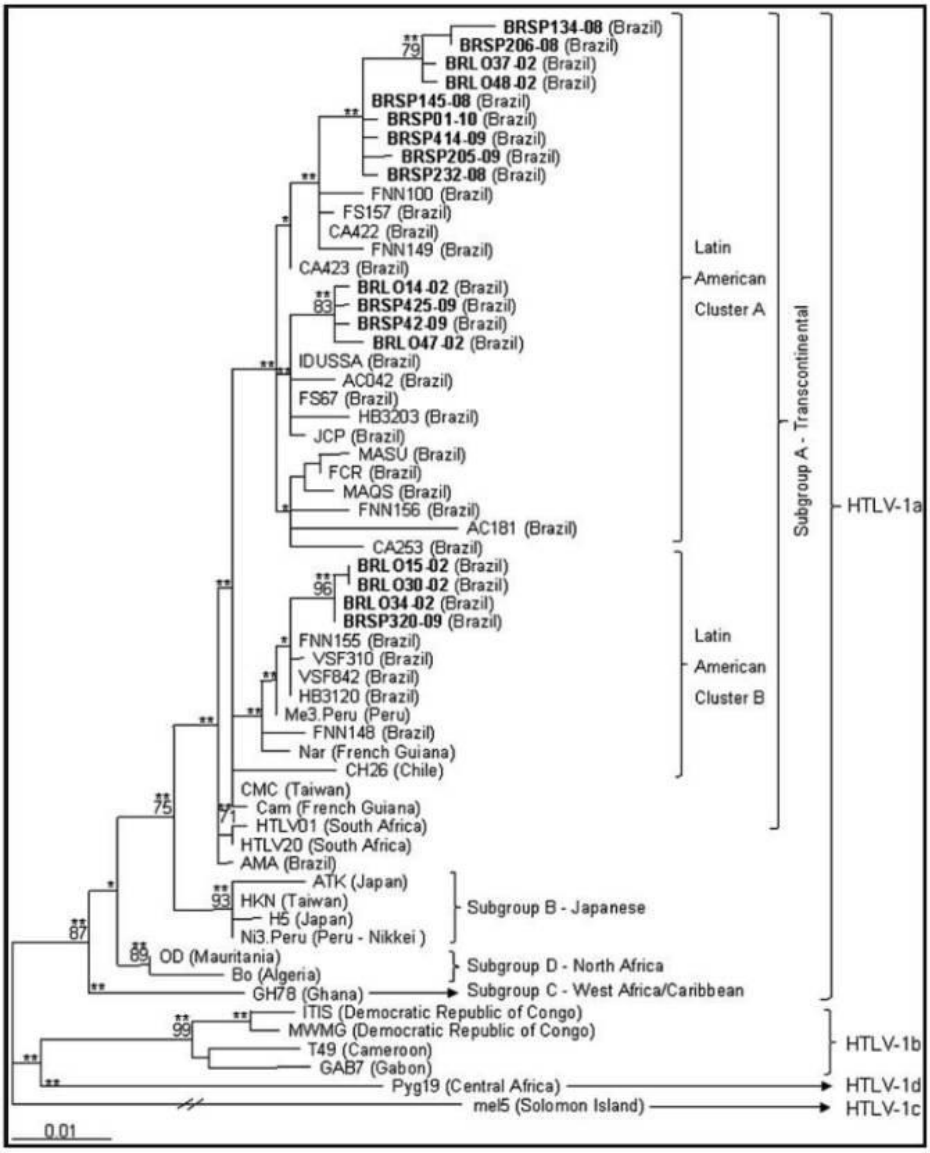


FIG. 2. Phylogenetic tree constructed by the maximum-likelihood method using the PAUP v4b10 software for the partial LTR region of 692 bp (position 75–766 relative to the ATK prototype) of HTLV-1 of 59 isolates, including sequences from the south and southeast regions of Brazil (GenBank AN JF271836-JF271852) in bold, generated with the GTR + G model. Bootstrap values above 70% and zero length using the likelihood ratio test with $p < 0.001$ (**) and $p \leq 0.05$ (*) in key branches are depicted. The HTLV-1 Mel5 isolate was used as the outgroup.

(DQ005551), Cam (AF063819), IDUSSA (DQ005555), FNN156 (DQ005552), MAQS (X88876), MASU (X88877), JCP (X88875), HKN (X88874), FCR (X88873), CMC (X88872), AMA (X88871), FNN100 (DQ005547), FNN149 (DQ005549), CA253 (EU108722), CA423 (EU108724), CA422 (EU108721), HB3120 (DQ471206), HB3203 (DQ471205), FS157 (GU225732), FS67 (GU225731), VSF842 (EF672337), VSF310 (EF672336), AC042 (EU392160), AC181 (EU392159), Mel5 (L02534).

The GenBank accession numbers of the HTLV-1 fragments sequenced in our laboratory and included in the phylogenetic analysis are as follows: *env*: BRLO14-02 (HM770426), BRLO15-02 (HM770427), BRLO34-02 (HM770428), BRLO47-02 (HM770429), BRLO48-02 (HM770430), BRSP01-10 (HM770431), BRSP134-08 (HM770432), BRSP145-08 (HM770433), BRSP205-09 (HM770434), BRSP206-08 (HM770435), BRSP232-08 (HM770436), BRSP320-09 (HM770437), BRSP42-09 (HM770438), BRSP414-09 (HM770439), BRSP425-09 (HM770440); LTR: BRLO14-02 (JF271836), BRLO15-02 (JF271837), BRLO30-02 (JF271838), BRLO34-02 (JF271839), BRLO37-02 (JF271840), BRLO47-02 (JF271841), BRLO48-02 (JF271842), BRSP134-08 (JF271843), BRSP145-08 (JF271844), BRSP206-08 (JF271845), BRSP232-08 (JF271846), BRSP42-09 (JF271847), BRSP205-09 (JF271848), BRSP320-09 (JF271849), BRSP414-09 (JF271850), BRSP425-09 (JF271851), BRSP01-10 (JF271852).

Acknowledgments

This study was supported by Ministério da Ciência e Tecnologia/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (MCT/CNPq), Brazil (Universal Grant 481040/2007-2), a fellowship to A.C.A. (Grant 303328/2009-6), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil (Ph.D. fellowship to M.C.M.), and Instituto Adolfo Lutz (Grant 39/07).

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

1. Proietti FA, Carneiro-Proietti ABF, Catalan-Soares BC, and Murphy EL: Global epidemiology of HTLV-1 infection and associated diseases. Oncogene 2005;24:6058–6068.
2. Carneiro-Proietti AB, Catalan-Soares BC, Proietti FA, and GIPH (Interdisciplinary HTLV-I/IIResearch Group): Human T cell lymphotropic viruses (HTLV-I/II) in South America: Should it be a public health concern? J Biomed Sci 2002;9: 587–595.
3. Alcantara LC, de Oliveira T, Gordon M, *et al.*: Tracing the origin of Brazilian HTLV-1 as determined by analysis of host and viral genes. AIDS 2006;20(5):780–782.
4. Ratner L, Philpott T, and Trowbridge DB: Nucleotide sequence analysis of isolates of human T-lymphotropic virus type I of diverse geographical origins. AIDS Res Hum Retroviruses 1991;7(11):923–941.
5. Yamashita M, Veronesi R, Menna-Barreto M, *et al.:* Molecular epidemiology of human T-cell leukemia virus type I (HTLV-1) Brazil: The predominant HTLV-1s in South America differ from HTLV-l of Japan and Africa, as well as those of Japanese immigrants and their relatives in Brazil. Virology 1999;261(1):59–69.
6. Laurentino RV, Lopes IGL, Azevedo VN, *et al.:* Molecular characterization of human T-cell lymphotropic virus coinfecting human immunodeficiency virus 1 infected patients in the Amazon region of Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2005;100(4):371–376.
7. Rego FFA, Mota-Miranda A, Santos ES, Galvão-Castro B, and Alcantara LC: Seroprevalence and molecular epidemiology of HTLV-1 isolates from HIV coinfected women in Feira de Santana, Bahia, Brazil. AIDS Res Hum Retroviruses 2010;26(12):1333–1339.
8. Kashima S, Alcântara LC, Takayanagui OM, *et al.:* Distribution of human T cell lymphotropic vírus type 1 (HTLV-1) subtypes in Brazil: Genetic characterization of LTR and Tax region. AIDS Res Hum Retroviruses 2006;22(10):953–959.
9. Etzel A, Shibata GY, Rozman M, Jorge MLSG, Damas CD, and Segurado AAC: HTLV-1 and HTLV-2 infections in HIV-infected individuals from Santos, Brazil: Seroprevalence and risk factors. J Acquir Immune Defic Syndr 2001;26:185–190.
10. Morimoto HK, Caterino-de-Araujo A, Morimoto AA, *et al.:* Seroprevalence and risk factors for human T-cell lymphotropic virus type 1 and 2 infection in human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients attending AIDS Referral Center Health Units in Londrina and other communities in Paraná, Brazil. AIDS Res Hum Retroviruses 2005;21(4):256–262.
11. Caterino-de-Araujo A, Favero A, Santos-Fortuna E, Suleiman J, Chieco-Bianchi L, and Calabrò ML: HTLV-I/HTLV-II coinfection in AIDS patient from São Paulo, Brazil. AIDS Res Hum Retroviruses 2000;16:715–719.
12. Magalhães T, Mota-Miranda AC, Alcantara LC, Olavarria V, Galvão-Castro B, and Rios-Grassi MF. Phylogenetic and molecular analysis of HTLV-1 isolates from a medium sized town in northern of Brazil: Tracing a common origin of the virus from the most endemic city in the country. J Med Virol 2008;80(11):2040–2045.
13. Mota-Miranda AC, Araújo SP, Dias JP, Colin DD, Kashima S, Covas DT, Tavares-Neto J, Galvão-Castro B, and 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;80(11):1966–1971.
14. Rego FFA, Alcantara LC, Moura Neto JP, Miranda AC, Pereira Ode S, Gonçalves Mde S, and Galvão-Castro B: HTLV type 1 molecular study in Brazilian villages with African characteristics giving support to the post-Columbian introduction hypothesis. AIDS Res Hum Retroviruses 2008;24(5):673–677.

Address correspondence to:
Adele Caterino-de-Araujo
Immunology Department
Instituto Adolfo Lutz
Av. Dr. Arnaldo, 355, 11° andar
01246-902, São Paulo, S.P.
Brazil

E-mail: caterino@usp.br, caterino@ial.sp.gov.br

Anexo I - Artigo publicado: MAGRI *et al*., *Virology Journal*, v.9, p.184, 2012c. (DOI: 10.1186/1743-422X-9-184)

Magri *et al. Virology Journal* 2012, **9**:184
http://www.virologyj.com/content/9/1/184

VIROLOGY JOURNAL

SHORT REPORT Open Access

LTR point mutations in the *Tax*-responsive elements of HTLV-1 isolates from HIV/HTLV-1-coinfected patients

Mariana Cavalheiro Magri[1,2], Emanuela Avelar Silva Costa[1] and Adele Caterino-de-Araujo[1,2*]

Abstract

Background: In *Virology Journal* 2011, 8:535, Neto et al. described point mutations into *Tax*-responsive elements (TRE) of the LTR region of HTLV-1 isolates from asymptomatic carriers from Sao Paulo, Brazil, and hypothesized that the presence of the G232A mutation in the TRE-1 increase viral proliferation and consequently the proviral load (PvL), while the A184G mutation in the TRE-2 do not have such effect.

Findings: We performed the real-time PCR assay (*pol*) and sequenced LTR region of HTLV-1 isolates from 24 HIV/HTLV-1-coinfected patients without HTLV-1-associated diseases from the same geographic area. These sequences were classified as belonging to the transcontinental subgroup A of the Cosmopolitan subtype a. The frequency of G232A mutation (16/24, 66.7%) was high as much as 61.8% reported by Neto's in HTLV-1 asymptomatic carriers with high PvL. High frequency (13/24, 54.2%) of double mutations G232A and A184G was also detected in HIV/HTLV-1-coinfected patients. We did not quantify PvL, but comparative analyses of the cycle threshold (Ct) median values of the group of isolates presenting the mutated-types sequences (Ct 33.5, n = 16) versus the group of isolates with the wild-type sequences (Ct 32, n = 8) showed no statistical difference ($p = 0.4220$).

Conclusion: The frequencies of mutated-type sequences in the TRE-1 and TRE-2 motifs were high in HIV/HTLV-1-coinfected patients from Sao Paulo, Brazil. If these LTR point mutations have predictive value for the development of HTLV-1-associated diseases or they correspond to the subtype of virus that circulate in this geographic area has to be determined.

Keywords: HTLV-1, LTR region, Sequencing

Findings

In the December 13th, 2011 issue of *Virology Journal*, Neto and collaborators described point mutations into 21-bp repeat motifs, named *Tax*-responsive elements (TRE), present in the 5' LTR region of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) isolated among asymptomatic carriers from Sao Paulo, Brazil, and hypothesized that the presence of G232A nucleotide substitution in the A domain of the first TRE (TRE-1) increase viral proliferation and consequently the proviral load (PvL), while the A184G mutation in the A domain of TRE-2 do not have such effect [1]. This hypothesis is very interesting, and we decided to add some information in regard to the presence of such point mutations in HIV/HTLV-1-coinfected patients who present no symptoms of HTLV-1-associated diseases from the same geographic area.

A previous study conducted by our group working at the Instituto Adolfo Lutz (a public health laboratory in Sao Paulo, Brazil) analyzed the best algorithm to be employed in the diagnosis of HTLV-1 and HTLV-2 in at-risk individuals of Sao Paulo. We performed confirmatory assay by the real-time PCR (at least in duplicate) to detect *pol* provirus gene segments of HTLV-1 and HTLV-2, and employed the human albumin gene as an internal control. The real-time PCR (*pol*) optimization for HTLV-1 was conducted with the cell line C91-PL using 10-fold DNA dilutions, and showed detection limit of 10 ng of DNA input. We did not

* Correspondence: caterino@usp.br
[1]Immunology Department, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, 11° andar, São Paulo, SP 01246-902, Brazil
[2]Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 580, São Paulo, SP CEP 05508-000, Brazil

BioMed Central

© 2012 Magri et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/2.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

quantify the proviral load (PvL), and used the PCR as qualitative assay. The coefficient of variation of the cycle threshold (Ct) values for the intra- and inter-assays were less than 1.6% and 1.0%, respectively [2].

At present study, DNA samples of 24 HIV/HTLV-1-coinfected individuals of which we have Ethnical Board approval and that scored HTLV-1 positive by the real-time PCR assay (*pol*) were also sequenced for partial LTR region, and by NCBI-Genotyping and REGA-Subtyping tools websites and phylogeny they were classified as belonging to the transcontinental subgroup A of the Cosmopolitan subtype a, the same subgroup A detected by us in a previous study conducted with HIV/HTLV-1-coinfected patients [3], and by Neto et al. among asymptomatic carriers [1]. The median age of the 24 individuals was 44 years (ranging from 27 to 65) and 58.3% were female (Table 1). Multiple alignment of the 24 sequences [GenBank:JF271843 to JF271852, and JX280947 to JX280960] along with the ATK prototype (wild-type sequence) [GenBank:J02029] and the TRE-1 and TRE-2 motifs described by Neto et al. were performed using the Clustal W multiple-sequence alignment tool from BioEdit Sequence Alignment Editor version 7.0.5.3 software.

The frequency of the substitution A → G in the second nucleotide (A domain) of the TRE-1 motif (the TRE-1 G232A mutation) and the substitution G → A in the third nucleotide (A domain) of the TRE-2 motif (the TRE-2 A184G mutation) was summarized in Table 1. Of 24 subjects, the TRE-1 G232A mutation was detected in 16 (66.7%) and the TRE-2 A184G mutation in 13 (54.2%). Furthermore, 13 subjects (54.2%) had double mutations of the TRE-1 G232A and the TRE-2 A184G, three (12.5%) had the TRE-1 G232A mutation only, none had the TRE-2 A184G mutation only, and eight (33.3%) had no mutation in both sites. Thus, all the 13 subjects with the TRE-2 A184G mutation had the TRE-1 G232A mutation together.

The frequency of the TRE-1 G232A mutation (66.7%) in HIV/HTLV-1-coinfected patients was high as much

Table 1 General features of HIV-HTLV-1-coinfected individuals from Sao Paulo, Brazil

Sample (n = 24)	GenBank (AN)	Gender	Age (years)	Real-time PCR		Sequencing (LTR)	
				HTLV-1 (*pol*)	Albumin	TRE-1 motif	TRE-2 motif
				Ct	Ct	AAGGCTCTGACGTCTCCCCCC	TAGGCCCTGACGTGTCCCCC
BRSP134-08	JF271843	M	45	37	35	.	.
BRSP145-08	JF271844	M	50	36	30	G	A
BRSP206-08	JF271845	F	42	34	29	G	.
BRSP232-08	JF271846	F	56	35	27	G	A
BRSP42-09	JF271847	F	55	33	28	.	.
BRSP205-09	JF271848	F	27	36	27	G	A
BRSP320-09	JF271849	F	51	36	31	.	.
BRSP414-09	JF271850	M	62	40	25	G	A
BRSP425-09	JF271851	F	57	32	26	.	.
BRSP01-10	JF271852	F	32	41	32	G	A
BRSP30-10	JX280947	F	38	29	24	.	.
BRSP37-10	JX280948	M	43	29	24	G	A
BRSP38-10	JX280949	M	45	32	25	G	.
BRSP71-10	JX280950	M	33	28	21	G	A
BRSP93-10	JX280951	F	43	27	22	G	A
BRSP97-10	JX280952	M	37	33	22	G	A
BRSP101-10	JX280953	F	40	30	24	.	.
BRSP105-10	JX280954	M	41	29	22	G	A
BRSP118-10	JX280955	M	65	27	22	.	.
BRSP171-10	JX280956	F	30	32	22	.	.
BRSP40-11	JX280957	M	46	36	25	G	A
BRSP142-11	JX280958	F	57	32	24	G	.
BRSP194-11	JX280959	F	37	33	24	G	A
BRSP69-12	JX280960	F	50	36	30	G	A

Legend: *AN*-Accession Numbers, *F*-Female, *M*-Male, *Ct*- Cycle threshold.

as 61.8% reported by Neto's in HTLV-1 asymptomatic carriers with a high PvL [1]. We also found that the frequency of double mutations of the TRE-1 G232A and the TRE-2 A184G in HIV/HTLV-1-coinfected was high (54.2%). Unfortunately we did not quantify PvL, thus we could not compare PvL between patients with and without TRE point mutations. Instead, we compared the Ct median value of the real-time PCR assay (*pol*) between the two groups. There was no statistical difference in the median of the Ct values between patients with the any mutated-types sequences of 33.5 (ranging from 27 to 41, n = 16) and patients with the wild-type sequences of 32 (ranging from 27 to 37, n = 8) (Mann–Whitney test, $p = 0.4220$).

Regardless the limited number of samples of our study we confirmed the frequency of mutated-type sequences in the TRE-1 and TRE-2 was high in HIV-HTLV-1-coinfected patients. We do not know if these mutated-type sequences are the result of a selective advantage of such virus during chronic infection or if they denote the types of HTLV-1 that circulate in this geographic area. Interestingly, in our ongoing study, when we compare LTR sequences from Brazil and sequences from elsewhere, mutated-type sequences in the TRE-1 and TRE-2 regions are detected mostly in Brazil (data not shown). In opposition of what is hypothesized by Neto et al., we suggest that these LTR point mutations could have a protective effect, since no case of HTLV-1-associated diseases was detected among such patients, although a longitudinal study is necessary to confirm this hypothesis. Yet, it is relevant to point that all the individuals from the present study were undergoing antiretroviral therapy, which could interfere in retrovirus selection. Corroborating our hypothesis, Montagne et al. studying the effect of point mutations in the A, B and C domains of TRE-3 observed that the integrity of the B domain was absolutely required to mediate the Tax1 activation of the 21-bp enhancer element, while mutation of the A and C domains reduced the Tax1 effect, and mutation in both A and C domains abolished the Tax1 effect [4]. Thus, the integrity of the TRE is imperative for the induction of the promoter / enhancer element, and consequently disease progression.

Taking together these data we do not know if the high PvL precede the emergence of the mutated-type sequences or is a consequence of the presence of such mutated strains. Only longitudinal studies could help to answer this question. Finally, it is important to extend these data to clarify the role of the LTR point mutations in TRE, and to identify markers that could have predictive value for the development of HTLV-1-associated diseases, mostly in countries were HTLV-1 is endemic, like Brazil.

Consent

The Ethical Board of Instituto Adolfo Lutz approved this work. Written informed consent to publish the data in the Table was obtained from all the patients.

Abbreviations

TRE: *Tax*-responsive element; LTR: Long-terminal repeat; HTLV-1: Human T-cell lymphotropic virus type 1; PvL: Proviral load; PCR: Polymerase chain reaction; Ct: Cycle threshold.

Competing interest

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

MCM conceived the study, conducted the characterization of the LTR sequences and data analysis of the sequences, and wrote the manuscript. EASC did the real-time PCR assays. ACA was responsible of scientific version, discussion and interpretation of data. All authors read and approved the final manuscript.

Authors' information

MCM present address: Laboratório de Hepatologia por Vírus, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, S.P., Brasil.

Acknowledgments

This study was supported by Ministério da Ciência e Tecnologia/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (MCT/CNPq), Brasil, (Universal grant number # 481040/2007-2), fellowship to ACA (grant number # 303328/2009-6); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil (PhD fellowship to MCM) and CAPES/PROEX - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (article processing charge); and Instituto Adolfo Lutz (grant number # 33/07 and # 39/07).

Received: 19 January 2012 Accepted: 28 August 2012
Published: 4 September 2012

References

1. Neto WK, Da-Costa AC, Oliveira ACS, Martinez VP, Nukui Y, Sabino E, Sanabani SS: **Correlation between LTR point mutations and proviral load levels among Human T cell Lymphotropic Virus type 1 (HTLV-1) asymptomatic carriers.** *Virol J* 2011, **8**:535.
2. Costa EAS, Magri MC, Caterino-de-Araujo A: **The best algorithm to confirm the diagnosis of HTLV-1 and HTLV-2 in at-risk individuals from São Paulo, Brazil.** *J Virol Methods* 2011, **173**:280–286.
3. Magri MC, Brigido LFM, Rodrigues R, Morimoto HK, Ferreira JLP, Caterino-de-Araujo A: **Phylogenetic and Similarity Analysis of HTLV-1 Isolates from HIV-Coinfected Patients from the South and Southeast Regions of Brazil.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 2012, **28**(1):110–114.
4. Montagne J, Beraud C, Crenon I, Lombard-Platet G, Gazzolo L, Sergeant A, Jalinot P: **Tax1 induction of the HTLV-I 21 bp enhancer requires cooperation between two cellular DNA-binding protein.** *EMBO J* 1990, **9**(3):957–964.

doi:10.1186/1743-422X-9-184
Cite this article as: Magri *et al.*: LTR point mutations in the *Tax*-responsive elements of HTLV-1 isolates from HIV/HTLV-1-coinfected patients. *Virology Journal* 2012 9:184.

Anexo J - Artigo publicado: MAGRI *et al.*, *AIDS Research and Human Retroviruses*, v.28, n.12, p.1775-1778, 2012b. (DOI: 10.1089/aid.2011.0389)

AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES
Volume 28, Number 12, 2012
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/aid.2011.0389

Tax Gene Characterization of Human T-Lymphotropic Virus Type 1 Strains from Brazilian HIV-Coinfected Patients

Mariana Cavalheiro Magri,[1,2] Luis Fernando de Macedo Brigido,[1] Rosangela Rodrigues,[1] Helena Kaminami Morimoto,[3] and Adele Caterino-de-Araujo[2,4]

Abstract

The *tax* gene of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) diverges among isolates according to geographic regions and has been classified into two genotypes: *tax*A and *tax*B. In Brazil, *tax*A is the most prevalent genotype in symptomatic and asymptomatic carriers. Few studies have been conducted in HIV-infected patients. The present study characterized the *tax* gene (1059 bp) in 13 Brazilian HIV-1/HTLV-1-coinfected patients from the south and southeast regions. The results confirmed the transcontinental HTLV-1 subgroup A of the Cosmopolitan subtype and showed high nucleotide similarity both among Brazilian sequences and in relation to the ATK prototype (99.5% and 99.2%, respectively). Six nucleotide substitutions were highly conserved among isolates, ranging from 76.9% to 100%: C7401T, T7914C, C7920T, C7982T, G8231A, and A8367C. The presence of the Brazilian molecular signature of genotype *tax*A was confirmed in all of the isolates, and they clustered into two Latin American clusters, which confirms the double introduction of HTLV-1 in Brazil.

Human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) is the etiological agent of the hematological disorder adult T cell leukemia/lymphoma (ATLL) and the neurologic syndrome HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP).[1,2] It is estimated that 20 million individuals are infected by HTLV-1 worldwide, mainly in southwestern Japan, the Caribbean area, some regions of Africa, and Central and South America.[1,2] Based on the phylogenetic analysis of the long terminal repeat (LTR) and *env* regions of the genome of HTLV-1, different subtypes and subgroups of HTLV-1 have been described around the world, mostly related to human migratory routes and geographic areas.[1,2]

HTLV-1 is widespread in the northeast region of Brazil,[3,4] and studies on its origin and dissemination showed that HTLV-1 was recently introduced in this region, most likely through the post-Columbian migrations of the African slave trade between the sixteenth and nineteenth centuries.[5,6] HTLV-1 has also been detected in other regions of the country, but with a smaller percentage of cases than in the northeast.[4] The molecular characterization of HTLV-1 in Brazil showed that the Cosmopolitan subtype (a) of transcontinental subgroup A was prevalent, although historical data indicated that the slave trade movement originated from west Africa, where only the western African subgroup (C) circulates.[7,8] One study on the genetic background of HTLV-1-infected individuals from Brazil confirmed the introduction of HTLV-1 by infected individuals from the southern region of Africa.[7]

Brazil also has the largest Japanese population outside of Japan, almost 1.5 million, and 1 million live in São Paulo (southeastern Brazil).[9] Therefore, the introduction of the Japanese HTLV-1 subgroup B in this geographic area could be hypothesized. In fact, this subgroup was detected in some individuals from southeastern Brazil.[10]

On the basis of the molecular analysis of the *tax* gene, HTLV-1 strains were classified into two genotypes, *tax*A and *tax*B, whose association with clinical disease was suggested.[11]

Although there are few studies on *tax* molecular characterization in Brazil, one study with a large number of individuals (symptomatic and asymptomatic carriers) from São Paulo and Rio de Janeiro (southeast) characterized the entire *tax* gene and demonstrated a Brazilian molecular signature (five nucleotide substitutions in relation to the ATK prototype: C7401T, T7914C, C7920T, C7982T, and G8231A) characteristic of the *tax*A genotype.[10] Corroborating these data, another study from São Paulo showed the same pattern of mutations and a lack of association between the *tax* genotype and disease progression.[12]

[1]Laboratório de Retrovirus, Centro de Virologia, Instituto Adolfo Lutz, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, São Paulo, S.P., Brazil.
[2]Faculdade de Ciências Farmacêuticas–Universidade de São Paulo, São Paulo, S.P., Brazil.
[3]Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas–Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR., Brazil.
[4]Centro de Imunologia, Instituto Adolfo Lutz, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, São Paulo, S.P., Brazil.

In addition to some regions of Brazil being considered endemic for HTLV-1 infection,[4] Brazil is considered epidemic for HIV/AIDS, with prevalence rates of 0.3% to 0.6%[13]; as a result, HIV/HTLV-1 coinfection has been described in this country, with prevalence rates varying according to the geographic area. For example, in the cities of Salvador (northeastern Brazil), Santos (southeastern Brazil), and Londrina (southern Brazil), HTLV-1 prevalence rates of 17.1%, 6.0%, and 0.8%, respectively, were detected in HIV-coinfected individuals.[14–16]

To gain further insight into the history of HTLV-1 in Brazil, especially in the at-risk population infected by HIV-1 in the south and southeast regions, we conducted the present and preliminary studies. A few years ago, we determined the prevalence of HTLV-1 and HTLV-2 in patients with HIV/AIDS from Londrina and its vicinities in the south of Brazil and detected HIV/HTLV-1/2 coinfection in 6.4% of cases[16]; subsequently, we characterized HTLV-1 isolates from southern and southeastern Brazil using the LTR and *env* regions[17] and confirmed the HTLV-1a Cosmopolitan subtype, subgroup A, which clustered into two Latin American clusters.

In the present study, another genomic region (*tax*) was analyzed for the molecular signature described in Brazilian isolates. The study population consisted of 13 patients with HIV/AIDS who were coinfected with HTLV-1 from Londrina and its vicinities (BRLO) and São Paulo (BRSP).[17] Five patients are from Londrina (five men) and eight are from São Paulo (five women and three men). DNA samples were extracted from peripheral blood leukocytes, and the *tax* region was amplified using a previously described modified protocol,[11] in which PCR was optimized using the GoTaq Colorless Master Mix (Promega Corporation, Madison, WI) to improve stability. Fragments of 1119 bp were obtained, and 1059 bp were sequenced with an ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster, CA). All of the sequencing chromatograms were assembled and edited with Sequencher 4.7 software. Multiple alignments were performed using the Clustal W multiple-sequence alignment tool from BioEdit Sequence Alignment Editor, version 7.0.5.3, software with a reference set available in the GenBank database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank), in which the nucleotide and amino acid substitutions were searched.

HTLV-1 subtyping was screened with the NCBI Genotyping (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi) tool website. Neighbor-joining (NJ) and maximum likelihood (ML) phylogenetic trees were constructed based on an appropriate nucleotide substitution models determined by Modeltest v3.7 (TrN+G model) using PAUP v4b10 software. Bootstrapping was performed with the stepwise addition algorithm for 1000 replicates. The EL (HTLV-1b) sequence was used as the outgroup. Nucleotide distances were estimated using *MEGA*4 software. Sequences of 1059 bp (nt 7324–8382 in relation to the ATK prototype) were initially analyzed using the NCBI Genotyping tool, and the presence of the HTLV-1a subtype was found in all of the study samples. The phylogenetic analysis of a 977-bp segment of 49 HTLV-1 *tax* sequences available in the GenBank database, including the 13 new sequences, was used to construct the *tax* phylogenetic tree (Fig. 1). The phylogenetic tree confirmed that all of the study sequences belong to the HTLV-1a subtype, genotype *tax*A. Moreover, the 13 new *tax* sequences clustered into two different clusters inside the genotype *tax*A.

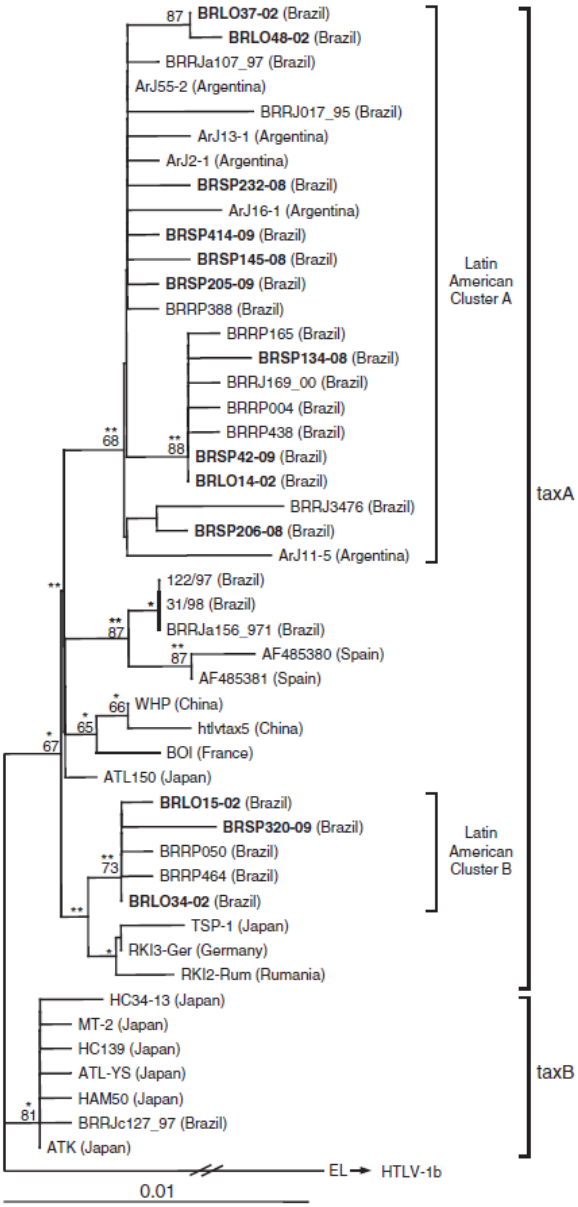


FIG. 1. Phylogenetic tree constructed by the neighbor-joining method using the PAUP v4b10 software for the partial *tax* region of 977 bp (position 7378–8354 relative to the ATK prototype) of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) of 49 isolates, including sequences from the south and southeast regions of Brazil (GenBank AN JN887698–JN887710) in bold, generated with the TrN+G model. Bootstrap values above 65% and zero length using the likelihood ratio test with $p<0.001$ (**) and $p \leq 0.05$ (*) in key branches are depicted. The HTLV-1 EL isolate was used as the outgroup.

Of note, the previous molecular analysis of the LTR and *env* regions of such isolates characterized these strains as belonging to the HTLV-1a Cosmopolitan subtype, transcontinental subgroup A, clustering into two branches of Latin America,[17] the same branches detected in the present study

TABLE 1. COMPARISON OF *tax* REGION SEQUENCES OF HUMAN T-LYMPHOTROPIC VIRUS TYPE 1, SHOWING THE NUCLEOTIDE SUBSTITUTIONS, AMINO ACID CHANGES, AND THEIR POSITIONS IN THE 13 SAMPLES FROM THE SOUTH AND SOUTHEAST REGIONS OF BRAZIL, IN RELATION TO THE INTERNATIONAL ATK PROTOTYPE

Sequence	*Nucleotide change at position*																										
	7401	*7410*	*7431*	*7476*	*7527*	*7593*	*7722*	*7908*	*7914*	*7920*	*7953*	*7974*	*7980*	*7982*	*8001*	*8002*	*8066*	*8109*	*8128*	*8184*	*8191*	*8231*	*8232*	*8288*	*8295*	*8313*	*8366*	*8367*
ATK	C	C	G	T	G	C	A	T	T	C	C	C	T	C	A	A	C	A	G	C	C	G	T	A	G	T	G	A
BRLO14-02	T								C	T		T		T								A				C		C
BRLO15-02					A					T				T	G							A			A			C
BRLO34-02										T				T	G							A			A			C
BRLO37-02	T						G		C	T				T				G				A						C
BRLO48-02	T						G		C	T				T				G	A			A						C
BRSP134-08	T		A	C					C	T		T		T								A				C		C
BRSP145-08	T								C	T	T			T								A		G				C
BRSP206-08	T								C	T				T							T	A	C					C
BRSP232-08	T	A							C	T			C	T								A					A	C
BRSP42-09	T								C	T		T		T								A				C		C
BRSP205-09	T								C	T				T		G						A						C
BRSP320-09						T		C		T				T	G		G					A			A			C
BRSP414-09	T								C	T				T						T		A						C
aa change														A→V		T→A	T→R		V→I			S→N		E→G			R→H	

aa, amino acid.

(Fig. 1). These findings strengthen the suggested concept of the different introduction of HTLV-1 in Brazil[3,5–8,10,17] and among HIV-coinfected patients.

Nucleotide similarity estimations showed a similarity of 99.5% among all of the study sequences and when they were stratified into two groups: one from São Paulo and the other from Londrina and its vicinities. The analysis of sequences in relation to the ATK prototype showed a nucleotide similarity of 99.2%. Interestingly, the comparative analysis of HTLV-1 isolates from Chile with the ATK prototype showed 99.6% nucleotide similarity in the *tax* region.[18] Because Brazil and Chile are located in Latin America, these results could suggest an earlier introduction of HTLV-1 in Brazil.

Six nucleotide substitutions were highly conserved among the 13 new Brazilian sequences in relation to ATK: C7401T and T7914C in 76.9% of the sequences (except for Latin American cluster B) and C7920T, C7982T, G8231A, and A8367C in 100% of the sequences. These data are presented in Table 1 and confirm the molecular signature previously described in Brazilian sequences of HTLV-1.[10,12] Two of the nucleotide substitutions at positions C7982T and G8231A resulted in amino acid changes of A2661V and S2744N.

It is important to note that the protocols selected and optimized for the PCR, nested PCR, and sequencing in the present study amplified a large segment of the *tax* gene, which only lacks the three initial *tax* nucleotides. These three nucleotides characterize the start codon of Tax (amino acid methionine) and are located at the beginning of the viral envelope gene.

In conclusion, despite the continental size of Brazil, the different social habits and risk factors of its population, and the regional differences in the genetic background of individuals, the same molecular signature of genotype *tax*A was detected in HTLV-1 strains isolated from HIV-1-coinfected patients from the south and southeast regions. The hypothesis of multiple introductions of HTLV-1 in Brazil was also confirmed in the present study.

Sequence Data

The GenBank accession numbers for the HTLV-1 *tax* sequences included in the phylogenetic study are as follows: ATK (J02029), TSP-1 (M86840), BRRJ017_95 (DQ323833), BRRJl69_00 (DQ323845), BRRJc127_97 (DQ323840), BRRJ3476 (DQ323834), BRRJa107_96 (DQ323835), BRRP388 (DQ323855), BRRP165 (DQ323875), BRRJa156_971 (DQ323836), BRRP004 (DQ323870), BRRP438 (DQ323862), BRRP050 (DQ323850), BRRP464 (DQ323883), ArJ13-1(DQ227134), ArJ2-1 (DQ227130), ArJ16-1 (DQ227135), ArJ11-5 (DQ227158), ArJ55-2 (DQ227189), BOI (L36905), WHP (AF259264), htlvtax5 (AF226593), ATL150 (AB036376), RKI3-Ger (AF042071), RKI2-Rum (AF003012), HC34-13 (AB045549), MT-2 (AF292000), HC139 (AB045520), ATL-YS (U19949), HAM50 (AB045481), (AF485380), (AF485381), 31/98 (AF133525), 122/97 (AF133524), EL (M67514).

The GenBank accession numbers of the HTLV-1 *tax* sequences obtained in our laboratory and included in the phylogenetic analysis are as follows: BRLO14-02 (JN887698), BRLO15-02 (JN887699), BRLO34-02 (JN887700), BRLO37-02 (JN887701), BRLO48-02 (JN887702), BRSP134-08 (JN887703), BRSP145-08 (JN887704), BRSP206-08 (JN887705), BRSP232-08 (JN887706), BRSP42-09 (JN887707), BRSP205-09 (JN887708), BRSP320-09 (JN887709), BRSP414-09 (JN887710).

Acknowledgments

This study was supported by the Ministério da Ciência e Tecnologia/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (MCT/CNPq), Brazil (Universal Grant 481040/2007-2), a fellowship to A.C.A. (Grant 303328/2009-6), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil (Ph.D. fellowship to M.C.M.), and Instituto Adolfo Lutz (Grant 39/07). The authors thank Karoline Rodrigues Campos for her technical support.

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

1. Gonçalves DU, Proietti FA, Ribas JG, *et al.:* Epidemiology, treatment, and prevention of human T-cell leukemia virus type 1-associated diseases. Clin Microbiol Rev 2010;23:577–589.
2. Proietti FA, Carneiro-Proietti ABF, Catalan-Soares BC, and Murphy EL: Global epidemiology of HTLV-1 infection and associated diseases. Oncogene 2005:24:6058–6068.
3. Dourado I, Alcantara LC, Barreto ML, Teixeira MG, and Galvão-Castro B: HTLV-I in the general population of Salvador, Brazil: A city with African ethnic and sociodemographic characteristics. J Acquir Immume Defic Syndr 2003;34:527–531.
4. Catalan-Soares B, Carneiro-Proietti ABF, Proietti FA, and the Interdisciplinary HTLV Research Group: Heterogeneous geographic distribution of human T-cell lymphotropic viruses I and II (HTLV-I/II): Serological screening prevalence rates in blood donors from large urban areas in Brazil. Cad Saúde Púb (RJ) 2005;21:926–931.
5. Rego FFA, Alcantara LCJ, Neto JPM, Mota-Miranda ACA, Pereira OS, Gonçalves MS, and Galvão-Castro B: HTLV type 1 molecular study in Brazilian villages with African characteristics giving support to the post-Columbian introduction hypothesis. AIDS Res Hum Retroviruses 2008;24(5):673–677.
6. Magalhães T, Mota-Miranda AC, Alcantara LCJ, Olavarria V, Galvão-Castro B, and Rios-Grassi MF: Phylogenetic and molecular analysis of HTLV-1 isolates from a medium sized town in northern of Brazil: Tracing a common origin of the virus from the most endemic city in the country. J Med Virol 2008;80:2040–2045.
7. Alcantara LCJ, Oliveira T, Gordon M, *et al.:* Tracing the origin of Brazilian HTLV-1 as determined by analysis of host and viral genes. AIDS 2006:20(5):780–782.
8. Mota ACA, Van Dooren S, Fernandes FMC, *et al.:* The close relationship between South African and Latin American HTLV type 1 strains corroborated in a molecular epidemiological study of the HTLV type 1 isolates from a blood donor cohort. AIDS Res Hum Retroviruses 2007;23(4):503–507.
9. Governo do Estado de São Paulo. 1908–2008 100 Anos. Imigração Japão Brasil. Available at http://www.saopaulo.sp.gov.br/imigracaojaponesa/historia.php. Accessed March 16, 2012.
10. Kashima S, Alcantara LC, Takayanagui OM, *et al.:* 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;22(10):953–959.
11. Furukawa Y, Yamashita M, Usuku K, Izumo S, Nakagawa M, and 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;182:1343–1349.
12. Casseb J, Fukumori LMI, Vergara MPP, *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. Mem Inst Oswaldo Cruz 2006;101(3):273–276.
13. UNAIDS. Global Report–UNAIDS report for the global AIDS epidemic–2010. Available at http://www.unaids.org/globalreport/HIV_prevalence_map.htm. Accessed January 19, 2012.
14. Brites C, Goyanna F, França LG, *et al.:* Coinfection by HTLV-I/II is associated with an increased risk of strongyloidiasis and delay in starting antiretroviral therapy for AIDS patients. Braz J Infect Dis 2011;15(1):6–11.
15. Etzel A, Shibata GY, Rozman M, Jorge MLSG, Damas CD, and Segurado AAC: HTLV-1 and HTLV-2 infections in HIV-infected individuals from Santos, Brazil: Seroprevalence and risk factors. J Acquir Immune Defic Syndr 2001;26:185–190.
16. Morimoto HK, Caterino-de-Araujo A, Morimoto AA, *et al.:* Seroprevalence and risk factors for human T-cell lymphotropic virus type 1 and 2 infection in human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients attending AIDS Referral Center Health Units in Londrina and other communities in Paraná, Brazil. AIDS Res Hum Retroviruses 2005;21(4):256–262.
17. Magri MC, Brigido LFM, Rodrigues R, Morimoto HK, Ferreira JLP, and Caterino-de-Araujo A: Phylogenetic and similarity analysis of HTLV-1 isolates from HIV-coinfected patients from the south and southeast regions of Brazil. AIDS Res Hum Retrovir 2012;28(1):110–114.
18. Ramirez E, Cartier L, Villota C, and Fernandez J: Genetic characterization and phylogeny of human T-cell lymphotropic virus type I from Chile. Virus Res 2002;84(1–2):135–149.

Address correspondence to:
Adele Caterino-de-Araujo
Immunology Department
Instituto Adolfo Lutz
Av. Dr. Arnaldo, 355, 11° Andar
01246-902, São Paulo, S.P.
Brazil

E-mail: caterino@usp.br, caterino@ial.sp.gov.br

Anexo K - Número dos isolados de pacientes coinfectados pelo HIV-1 de Londrina e região (sul) e de São Paulo (sudeste) no Brasil, e seus respectivos números de acesso no GenBank para as regiões LTR, *env* e *tax* do genoma proviral do HTLV-1.

HTLV-1	**Nº de Acesso no GenBank**		
Isolado	**LTR** (731pb)	***env*** (705pb)	***tax*** (1059pb)
BRLO14-02	JF271836	HM770426	JN887698
BRLO15-02	JF271837	HM770427	JN887699
BRLO30-02	JF271838		
BRLO34-02	JF271839	HM770428	JN887700
BRLO37-02	JF271840	JQ435912	JN887701
BRLO47-02	JF271841	HM770429	
BRLO48-02	JF271842	HM770430	JN887702
BRSP134-08	JF271843	HM770432	JN887703
BRSP145-08	JF271844	HM770433	JN887704
BRSP206-08	JF271845	HM770435	JN887705
BRSP232-08	JF271846	HM770436	JN887706
BRSP42-09	JF271847	HM770438	JN887707
BRSP205-09	JF271848	HM770434	JN887708
BRSP320-09	JF271849	HM770437	JN887709
BRSP414-09	JF271850	HM770439	JN887710
BRSP425-09	JF271851	HM770440	
BRSP01-10	JF271852	HM770431	

Legenda: Nº - número; pb - pares de bases

Anexo L - Artigo publicado: MAGRI *et al.*, *AIDS Research and Human Retroviruses*, v.26, p.1327-1331, 2010. (DOI:10.1089/aid.2010.0121)

AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES
Volume 26, Number 12, 2010
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/aid.2010.0121

Long Terminal Repeat Sequence Analysis of HTLV-2 Molecular Variants Identified in Southern Brazil

Mariana Cavalheiro Magri,[1,2] Helena Kaminami Morimoto,[3] Luis Fernando de Macedo Brígido,[1] Rosangela Rodrigues,[1] and Adele Caterino–de–Araujo[2,4]

Abstract

In Brazil, human T-lymphotropic virus type 2 (HTLV-2) is endemic in Amerindians and epidemic in intravenous drug users (IDUs). The long terminal repeat (*LTR*) is the most divergent genomic region of HTLV-2, therefore useful to characterize subtypes. Nucleotide sequence and restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of *LTR* genomic segments of fourteen HTLV-2 strains isolated from HIV-infected patients of Londrina, Southern Brazil, were carried out. Molecular analysis disclosed that all HTLV-2 strains belonged to 2a subtype, and RFLP detected the presence of the a4, a5, and a6 subgroups according to Switzer's nomenclature. RFLP correlated with nucleotide sequence, and phylogenetic analysis clustered HTLV-2 sequences of IDUs into subgroups a5 and a6. HTLV-2 sequences from individuals of sexual risk factor clustered into the a4 subgroup. These results extend the knowledge of the genetic diversity of HTLV-2 circulating in Brazil and provide insights into HTLV-2 transmission and virus movement in this geographic area.

Human T-lymphotropic virus type 2 (HTLV-2) appears to be an endemic infection of ancient people in both Africa and the Americas, but epidemic among intravenous drug users (IDUs) in urban areas of North America, Europe, and Southeast Asia.[1,2] In Brazil, HTLV-2 has long been considered endemic among indigenous population from the Amazon region (North)[3,4] and recently in the South region.[5] HTLV-2 had been detected in low frequencies in the general population as blood donors,[6–8] and in high frequencies in HIV/AIDS and IDUs, mostly of the Southeast and South of Brazil.[9–11] Thus, in Brazil, HTLV-2 infection is endemic in the North and epidemic in the South.

The routes of HTLV-2 transmission depends on the population analyzed, where sexual intercourse and breast-feeding are the main forms among Amerindians and the general population of Brazil,[4,7] while blood-born transfusion by sharing HTLV-infected needles account for transmission/acquisition among IDUs.[6,9–11]

Molecular characterization of *env*, long terminal repeat (*LTR*), and *tax* genomic regions of HTLV-2 has recognized three HTLV-2 subtypes: HTLV-2a, HTLV-2b, and HTLV-2d. In Brazil, a unique HTLV-2 subtype was detected among IDUs and Amerindians; this subtype possesses a long transactivating protein Tax similar to HTLV-2b and the *env*, and *LTR* genomic regions similar to HTLV-2a.[4] Therefore, this HTLV-2 subtype was tentatively named HTLV-2c,[4] albeit complete nucleotide sequences of several genomes had unequivocally demonstrated that the Brazilian HTLV-2 strains are molecular variants of the HTLV-2a subtype.[12–14] Interestingly, molecular analysis of Brazilian HTLV-2a isolates disclosed that they have originated from two sources: Brazilian Amerindians and European/North American IDUs.[15] HTLV-2b subtype, although endemic in Amerindians from Central America, Colombia, Venezuela, Chile, and Argentina, was only recently detected in Brazil among blood donors from the South,[16] and in IDUs infected with HIV from the Southeast.[17]

Several years ago, we conducted a study on the prevalence of HTLV-1 and HTLV-2 in HIV/AIDS patients from Londrina and vicinities, South of Brazil, and disclosed high frequency of HIV/HTLV-2 co-infection in these patients.[11] Using restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of *LTR* and *env* genomic regions, we identified HTLV-2a circulating in this geographic region.[18] At present, we decided to extend this data searching for HTLV-2a subgroups correlating with risk factor for HTLV transmission/acquisition. Using a classification system that accommodate restriction sites described by Switzer[19] and Eiraku,[20] we employed seven enzymes in

[1]Retrovirus Laboratory, Virology Department, and [4]Immunology Department, Instituto Adolfo Lutz, Secretary of Health of São Paulo, São Paulo, S.P., Brazil.
[2]Faculdade de Ciências Farmacêuticas—Universidade de São Paulo, São Paulo, S.P., Brazil.
[3]Pathology, Clinical Analysis and Toxicology Department—Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR., Brazil.

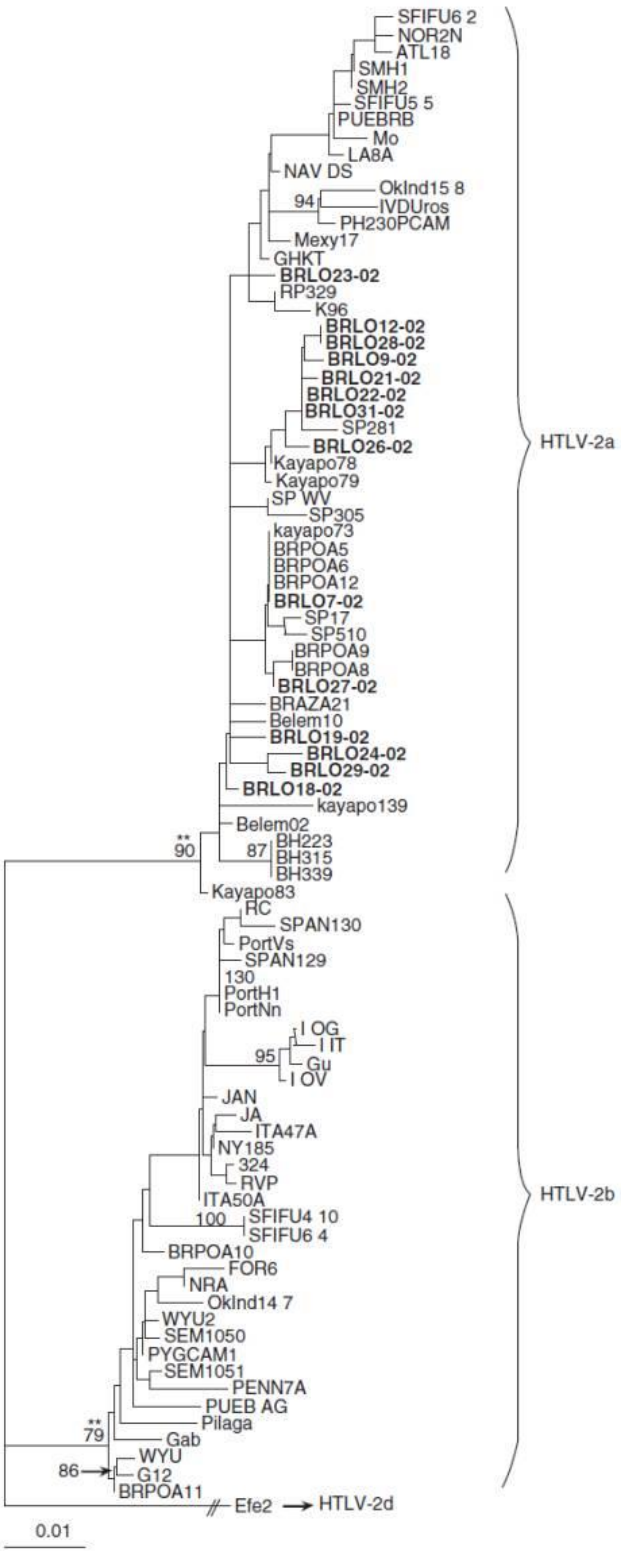


FIG. 1. Representative Neighbor Joining phylogenetic tree of partial HTLV-2 *LTR* region (458 bp) generated with the HKY+i+G model, using Paup 4b10. Bootstrap values above 70% in key branches are depicted. Sequences from Londrina, Southern Brazil are in **bold**.

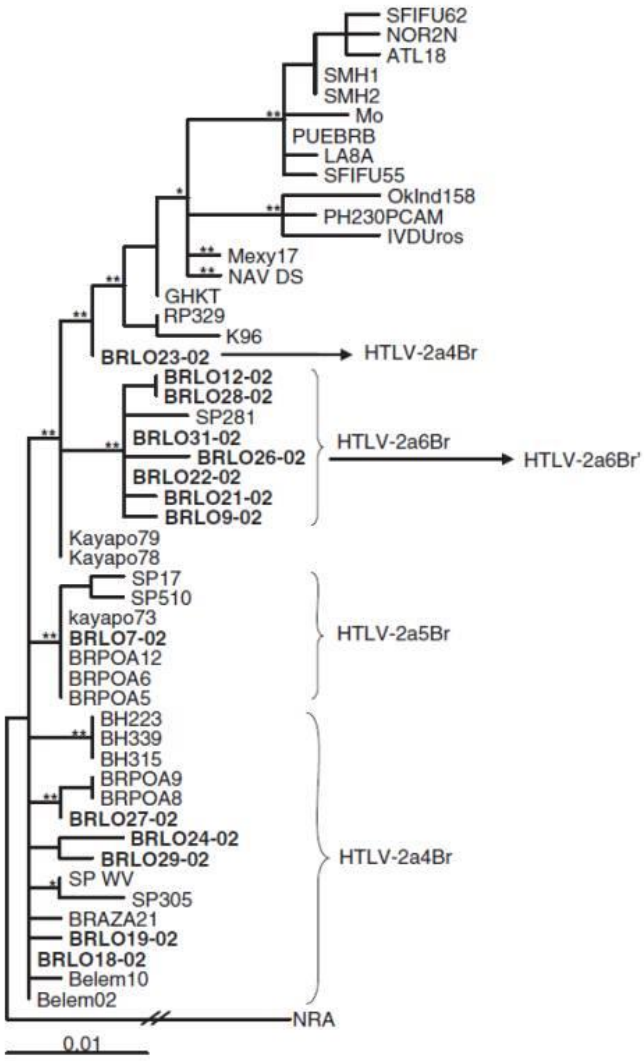


FIG. 2. Representative Maximum Likelihood phylogenetic tree of partial HTLV-2a *LTR* region (458 bp) generated with the HKY+i+G model, using Paup v4b10. The analyzed samples are showed in **bold.**

RFLP *LTR* genomic analysis (*i.e.*, *Dra* II, *Ban* II, *Ava* II, *Sau* I, *Bgl* I, *Sac*II, and *Sma* I). Nested polymerase chain reaction was used to amplify a 666-bp *LTR* region (nt. 64 to 729),[18] and the products obtained were submitted to RFLP and sequencing analysis. Predicted endonuclease maps were constructed using Sequencher 4.7 software and NEBcutter V2.0 (http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php) tools and compared with RFLP gel patterns.

LTR-amplified products were sequenced in a ABI 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA). All sequencing chromatograms obtained were assembled and manually edited with Sequencher 4.7 software. Multiple alignments were performed using ClustalW multiple-sequence alignment software, with a reference set available in the GenBank database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank). HTLV-2 *LTR* subtype was screened at NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) using Genotyping and BLAST tools. Neighbor Joining (NJ) and Maximum Likelihood (ML) trees were constructed based in appropriate nucleotide substitution models determined by Modeltest v3.7 (HKY+i+G model), using PAUP (v4b10). Bootstrapping was performed using the stepwise addition algorithm for 1000 replicates.

Phylogenetic analysis of a segment of 458 bp of 88 HTLV-2 *LTR* sequences including the fourteen new sequences of Londrina, Southern Brazil (GenBank accession number GU573730 to GU573743) were used to construct the phylogenetic tree (Fig. 1).

Seventy sequences were obtained in GenBank: 21 sequences of Brazilian Amerindians, blood donors, and IDUs (19 of subtype 2a, and two of subtype 2b), 49 sequences of endemic and epidemic populations of other countries [15 of subtype 2a, 33 of subtype 2b, and one of subtype 2d (considered as the outgroup)] along with four sequences from Sao Paulo (Southeast Brazil) not published yet (SP17, SP281, SP305, SP510), were included in the analysis.

As shown in Figure 1, all HTLV-2 sequences from Londrina clustered into subtype 2a beside other Brazilian sequences. Figure 2 shows in detail HTLV-2a cluster, grouping the new sequences into three main subgroups named a4, a5, and a6, according to RFLP. Table 1 shows the predicted fragments

Table 1. Predicted Fragments Obtained by Sequencing and Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of a Product of 458-bp (nt 181 to 638) of HTLV-2 *LTR* Region of Sequences from Londrina, Southern Brazil

Enzymes	*Subgroup a4 fragment size*	*Subgroup a5 fragment size*	*Subgroup a6 fragment size*	*Subgroup a6' fragment size*
*Ava*II	225/233	225/233	225/233	225/233
*Dra*II	458	458	458	458
*Ban*II	293/165	135/158/165	137/156/165	293/165
*Bsu*36I	303/155	303/155	303/155	303/155
*Sac*II	458	458	458	458
*Bgl*II	450/8	450/8	450/8	450/8
*Sma*I	340/118	340/118	458	458

Sequences belonging to each subgroup according to Switzer *et al.*, 1995 classification system:[19] HTLV-2 a4: BRLO18, BRLO19, BRLO23, BRLO24, BRLO27, BRLO29, and SP305; HTLV-2 a5: BRLO7, SP17, and SP510; HTLV-2 a6: BRLO9, BRLO12, BRLO21, BRLO22, BRLO28, BRLO31, and SP281; HTLV-2 a6': BRLO26.

obtained by RFLP maps, confirming the results obtained by phylogenetic trees (Figs. 1 and 2) and gel profiles (not shown). Interestingly, one of sequences (BRLO23-02) although classified as subgroup a4 by RFLP, clustered apart of this subgroup on the phylogenetic tree, but near to other Brazilian sequences; RP329 and K96 that belong to a blood donor from Ribeirão Preto and a Kayapo Indian from Amazonia.[14] Of note, one branch of HTLV-2a subgroup a6 was almost exclusively composed of sequences from Londrina. Additionally, sequences from Sao Paulo, not yet in the GenBank, clustered in the same three groups of HTLV-2a from Londrina. Although the limited number of samples analyzed, we could speculate on the route of virus transmission/acquisition. In fact, when we searched for risk factors of such patients, sequences of subgroup a4 (including the BRLO23-02) were of individuals of sexual risk factor, while sequences of subgroups a5 and a6 were of IDUs.

These results corroborate the results obtained in previous studies that clustered Brazilian viruses in a single HTLV-2a clade, although with considerable diversity among them.[2,12–14,17,19,20] Additionally, several studies conducted with Brazilian HTLV-2 sequences pointed virus transmission from Indians to IDUs of urban areas,[1–4,12–14,17,19,20] but the finding of a group almost exclusively of IDUs (subgroup a6) could represent different route of virus transmission or different evolutionary rate. In accordance of the last hypotheses, higher evolutionary rate and genetic diversity of HTLV-2 are detected in European IDUs than in Indians endemic populations.[21] Therefore, we could speculate these events to occur among IDUs of Londrina, Southern Brazil.

Moreover, the present study confirms RFLP as an alternative method for performing HTLV-2 epidemiological studies in countries with poor resources setting. In conclusion, this is the first study on molecular characterization of HTLV-2 sequences from Londrina, Southern Brazil, providing insights in HTLV-2 dynamic epidemic in Brazil.

Acknowledgments

The authors are indebted to João Paulo Gervásio Batista and João Leandro de Paula Ferreira for their support.

This study was supported by Ministério da Ciência e Tecnologia/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (MCT/CNPq), Brasil, (Universal Grant number # 481040/2007-2), fellowship to ACA (Grant number # 303328/2009-6).

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

Sequence data

The GenBank accession numbers for the sequences included in the phylogenetic study are as follows: *LTR*: SFIFU6 2 (U73022), NOR2N (U10258), ATL18 (U10252), SMH1 (Y05147), SMH2 (Y09148), SFIFU5 5 (U73010), PUEBRB (U10262), Mo (M10060), LA8A (U10256), NAV DS (U10257), Oklnd15 8 (U73015), IVDU ros (AF054272), PH230PCAM (Z46838), Mexy17 (L42510), GHKT (L42507), RP329 (AF326583), K96 (AF326584), Kayapo78 (AF139388), Kayapo79 (AF1239389), SPWV (AF139382), Kayapo73 (L42509), BRPOA5 (DQ028605), BRPOA6 (DQ028606), BRPOA12 (DQ028613), BRPOA9 (DQ028608), BRPOA8 (DQ028607), BRAZA21 (U10253), Belem10 (AF139393), Kayapo139 (L42508), Belem02 (AF139392), BH223 (AY509600), BH315 (AY509601), BH339 (AY509602), Kayapo83 (AF139390), RC (L77235), SPAN130 (U10266), PortVs (AY622979), SPAN129 (U10265), 130 (L77242), PortH1 (AY622977), PortNn (AY622978), I OG (Y09154), I IT (Y09151), Gu (X89270), I OV (Y09155), JAN (L77241), JA (L77239), ITA47A (U10254), NY185 (U10259), 324 (L77243), RVP (L77244), ITA50A (U10255), SFIFU4 10 (U73016), SFIFU6 4 (U73018), BRPOA10 (DQ 028611), FOR6 (AF054273), NRA (L20734), Oklnd14 7 (U73009), WYU2 (U12794), SEM1050 (U10263), PYGCAM1 (Z46888), SEM1051 (U10264), PENN7A (U10260), PUEB AG (U10261), Pilaga (AF054271), Gab (Y13051), WYU (U12792), G12 (L11456), BRPOA11 (DQ028612), Efe2 (Y14365).

The GenBank accession numbers of the HTLV-2 fragments sequenced in our laboratory and included in the phylogenetic analysis are as follows: *LTR*: BRLO7-02 (GU573730), BRLO9-02 (GU573731), BRLO12-02 (GU573732), BRLO18-02 (GU573733), BRLO19-02 (GU573734), BRLO21-02 (GU573735), BRLO22-02 (GU573736), BRLO23-02 (GU573737), BRLO24-02 (GU573738), BRLO26-02 (GU573739), BRLO27-02 (GU573740), BRLO28-02 (GU573741), BRLO29-02 (GU573742), BRLO31-02 (GU573743).

References

1. Hall WW, Ishak R, Zhu SW, *et al.*: Human T lymphotropic virus type II (HTLV-II): Epidemiology, molecular properties, and clinical features of infection. J AIDS 1996;13:S204–S214.
2. Murphy EL, Mahieux R, de Thé G, *et al.*: Molecular epidemiology of HTLV-II among United States blood donors and intravenous drug user: An age-cohort effect for HTLV-II RFLP type a0. Virology 1998;242:425–434.
3. Black FL, Biggar RJ, Neel JV, Maloney EM, and Waters DJ: Endemic transmission of HTLV type II among Kayapo Indians of Brazil. AIDS Res Hum Retrovir 1994;10:1165–1171.
4. Ishak MQ Ishak R, Vallinoto ACR, Azevedo VN, and Ishak MQ: Epidemiological aspects of retrovirus (HTLV) infection among Indian populations in the Amazon Region of Brazil. Cad Saúde Pública, Rio de Janeiro 2003;19:901–914.
5. Menna–Barreto M, Bender AL, Bonatto SL, *et al.*: Human T-cell lymphotropic virus type II in Guaraní Indians, Southern Brazil. Cad Saúde Pública, Rio de Janeiro 2005;21:1947–1951.
6. Gabbai AA, Bordini JO, Vieira–Filho JPB, *et al.*: Selectivity of human T lymphotropic vírus type-1 (HTLV-1) and HTLV-2 infection among different populations in Brazil. Am J Trop Med Hyg 1993;49:664–671.
7. Catalan-Soares B, Carneiro-Proietti AB, Proietti FA, and Interdisciplinary HTLV Research Group: Heterogeneous geographic distribution of human T-cell lymphotropic viruses I and II (HTLV-I/II): Serological screening prevalence rates in blood donors from large urban area in Brazil. Cad Saúde Pública, Rio de Janeiro 2005;21:926–931.
8. Namen–Lopes MSS, Martins ML, Drummond PC, Lobato RR, Interdisciplinary HTLV Research Group, and Carneiro–Proietti ABF: Lookback study of HTLV-1 and 2 seropositive donors and their recipients in Belo Horizonte, Brazil. Transfusion Med 2009;19:180–188.
9. de–Araujo AC, Casseb JSR, Neitzer E, *et al.*: HTLV-I and HTLV-II infections among HIV-1 seropositive patients in São Paulo, Brazil. Eur J Epidemiol 1994;10:165–171.
10. Etzel A, Shibata GY, Rozman M, Jorge MLSG, Damas CD, and Segurado AAC: HTLV-1 and HTLV-2 infections in HIV-infected individuals from Santos, Brazil: Seroprevalence and risk factors. J AIDS 2001;26:185–190.
11. Morimoto HK, Caterino–de–Araujo A, Morimoto AA, *et al.*: Seroprevalence and risk factors for human T-cell lymphotropic virus type 1 and 2 infection in human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients attending AIDS Referral Center Health Units in Londrina and other communities in Paraná, Brazil. AIDS Res Hum Retrovir 2005;21:256–262.
12. Lewis MJ, Novoa P, Ishak R, *et al.*: Isolation, cloning, and complete sequence of a phenotypically distinct Brazilian isolate of human T-lymphotropic virus type II (HTLV-II). Virology 2000;271:142–154.
13. Shindo N, Alcantara LCJ, Van Dooren S, *et al.*: Human retroviruses (HIV and HTLV) in Brazilian Indians: Seroepidemiological study and molecular epidemiology of HTLV type 2 isolates. AIDS Res Hum Retrovir 2002;18:71–77.
14. Covas DM, and Kashima S: Complete nucleotide sequences of the genomes of two Brazilian specimens of human T lymphotropic virus type 2 (HTLV-2). AIDS Res Hum Retrovir 2003;19:689–697.
15. Alcântara LCJ, Shindo N, Van Doren S, *et al.*: Brazilian HTLV type 2a strains from intravenous drug users (IDUs) appear to have originated from two sources: Brazilian Amerindians and European/North American IDUs. AIDS Res Hum Retrovir 2003;19:519–523.
16. Renner JDP, Laurino JP, Menna–Barreto M, and Schmitt VM: Molecular evidence of HTLV-II subtype B among an urban population living in South Brazil. AIDS Res Hum Retrovir 2006;22:301–306.
17. Novoa P, Penalva de Oliveira AC, Posada–Vergara MP, Duarte AJS, and Casseb J: Molecular characterization of human T-cell lymphotropic virus type 2 (HTLV-II) from people living in urban areas of Sao Paulo city: Evidence of multiple subtypes circulation. J Med Virol 2007; 79:182–187.
18. Morimoto HK, Morimoto AA, Reiche EMV, *et al.*: Difficulties in the diagnosis of HTLV-2 infection in HIV/AIDS patients from Brazil: Comparative performances of serologic and molecular assays, and detection of HTLV-2b subtype. Rev Inst Med Trop S Paulo 2007;49:225–230.
19. Switzer WM, Pieniazek D, Swanson P, *et al.*: Phylogenetic relationship and geographic distribution of multiple human T-cell lymphotropic virus type II subtypes. *J Virol* 1995;69: 621–632.
20. Eiraku V, Monken C, Kubo T, *et al.*: Nucleotide sequence and restriction fragment length polymorphism analysis of the long terminal repeat of human T cell leukemia virus type II. AIDS Res Hum Retrovir 1995;11:625–636.
21. Salemi M, Lewis M, Egan JF, Hall WW, Desmyter J, and Vandamme A–M: Different population dynamics of human T-cell lymphotropic virus type II in intravenous drug users compared with endemically infected tribes. Proc Natl Acad Sci USA 1999:96:13253–13258.

Address correspondence to:
Adele Caterino–de–Araujo
Immunology Department
Instituto Adolfo Lutz, Av.
Dr. Arnaldo 355, 11° andar
01246-902, São Paulo, S.P.
Brazil

E-mail: caterino@usp.br; caterino@ial.sp.gov.br

Anexo M - Artigo publicado: MAGRI *et al.*, *Aids Research and Human Retroviruses*, v.29, p.1010-1018, 2013. (DOI: 10.1089/aid.2013.0014)

AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES
Volume 29, Number 7, 2013
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/aid.2013.0014

Human T Cell Lymphotropic Virus Type 2a Strains Among HIV Type 1-Coinfected Patients from Brazil Have Originated Mostly from Brazilian Amerindians

Mariana Cavalheiro Magri,[1,2] Luis Fernando de Macedo Brigido,[3] Helena Kaminami Morimoto,[4] and Adele Caterino-de-Araujo[2,5]

Abstract

The human T cell lymphotropic virus type 2 (HTLV-2) is found mainly in Amerindians and in intravenous drug users (IDUs) from urban areas of the United States, Europe, and Latin America. Worldwide, HTLV-2a and HTLV-2b subtypes are the most prevalent. Phylogenetic analysis of HTLV-2 isolates from Brazil showed the HTLV-2a subtype, variant -2c, which spread from Indians to the general population and IDUs. The present study searched for the types of HTLV-2 that predominate among HIV-1-coinfected patients from southern and southeastern Brazil. Molecular characterization of the LTR, *env*, and *tax* regions of 38 isolates confirmed the HTLV-2c variant in 37 patients, and one HTLV-2b in a patient from Paraguay. Phylogenetic analysis of sequences showed different clades of HTLV-2 associated with risk factors and geographic region. These clades could represent different routes of virus transmission and/or little diverse evolutionary rates of virus. Taking into account the results obtained in the present study and the lack of the prototypic North American HTLV-2a strain and HTLV-2b subtypes commonly detected among HIV-coinfected individuals worldwide, we could speculate on the introduction of Brazilian HTLV-2 strains in such populations before the introduction of HIV.

Introduction

The human T cell lymphotropic virus type 2 (HTLV-2) is found mainly in American Indians and in intravenous drug users (IDUs) in urban areas of the United States, Europe, and Latin America.[1–3] In Brazil, considered the country with the largest number of people infected by HTLVs,[4] HTLV-2 is considered endemic among indigenous populations of the Amazon region and among Indians of the south region, and is present in IDUs of urban areas and in patients with HIV/AIDS.[5–10]

The HTLV-1/2 are low replicating viruses, thus have little genetic sequence variation.[11,12] However, the *env* structural gene and the long terminal repeat (LTR) region containing the viral promoter are the most variable regions, thus are useful for virus subtyping.[3] The LTR represents a noncoding region and consequently is not subject to the same evolutionary constraints as coding regions. The regulatory gene *tax*, which is engaged in viral transcription, diverges among isolates by nucleotide differences and size of the encoded Tax regulatory protein; thus this region is also valuable for molecular and epidemiological analysis.[7,13,14] Still, the *tax* region allows us to discriminate the molecular variant of Brazilian strains named HTLV-2c, which encodes a long transactivating protein Tax because of the loss of the stop codon in the *tax* gene position of 2735 and the gain of 25 amino acids (Fig. 1).[13] Interestingly, the Brazilian HTLV-2 strain has the *tax* region similar to the HTLV-2b subtype and the *env* and LTR genomic regions similar to the HTLV-2a subtype.[7,13,15] The occurrence of the HTLV-2c variant in Brazil is intriguing and its origin is not completely clarified. It is thought that HTLV-2 reached the New World approximately 15,000 years ago by the human (Paleo Indians) migratory wave that crossed the Bering land bridge. Two different migratory routes paralleling the Andean Cordillera along the Pacific Coast and toward the Amazon region could have independently resulted in the emergence of the HTLV-2c strain,

[1]Laboratório de Investigação Médica em Hepatologia por Vírus (LIM-47), Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, S.P., Brazil.
[2]Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, S.P., Brazil.
[3]Laboratório de Retrovirus, Centro de Virologia, Instituto Adolfo Lutz, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, São Paulo, S.P., Brazil.
[4]Departmento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, P.R., Brazil.
[5]Centro de Imunologia, Instituto Adolfo Lutz, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, São Paulo, S.P., Brazil.

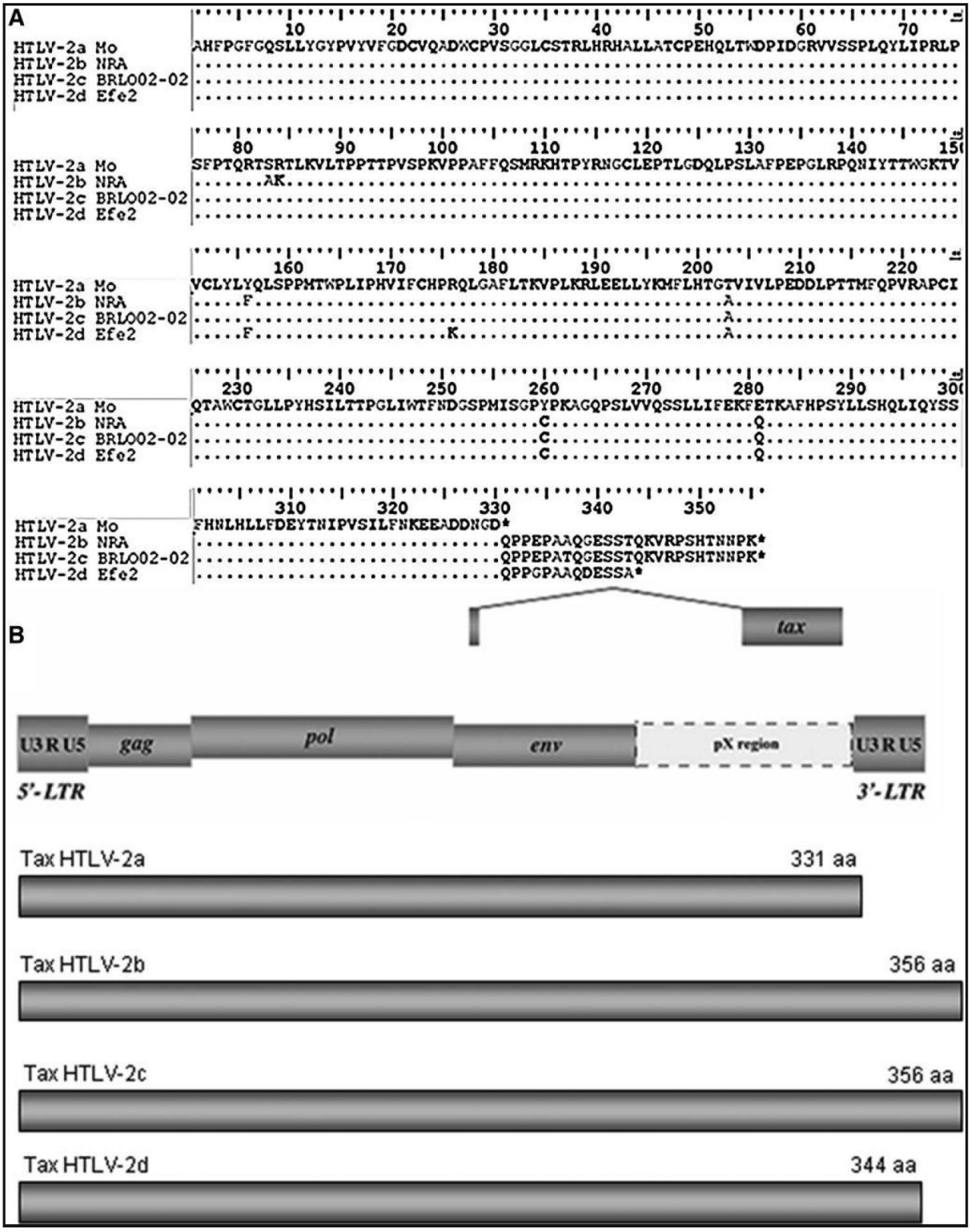


FIG. 1. Amino acid alignment of the *tax* region **(A)** and schematic Tax protein structure **(B)** among human T cell lymphotropic virus (HTLV)-2a (Mo prototype), HTLV-2b (NRA prototype), HTLV-2c (BRLO02-02), and HTLV-2d (Efe2) subtypes, highlighting the stop codon position in each sequence that results in an additional 25 amino acids at the C-terminal end of the Tax protein of HTLV-2b and HTLV-2c and 13 amino acids in HTLV-2d subtypes in relation to the HTLV-2a subtype. Note that the first amino acids are encoded in the *env* region not displayed in these sequence alignments.

perhaps from a prototype 2a, or in the introduction of 2c exclusively into the Amazon region.[7]

Therefore, HTLV-2 molecular characterization worldwide disclosed four HTLV subtypes: HTLV-2a and HTLV-2b, the most prevalent among IDUs from urban areas of the Americas and Europe and in the indigenous population of the Americas, and with sporadic distribution in Asia and Africa; the HTLV-2c variant detected in the indigenous population of the Brazilian Amazon and in IDUs from urban populations in Brazil; and the HTLV-2d detected in pygmy tribes in Africa.[13,16–21]

In 2010, we started the characterization of HTLV-2 isolates that circulate in HIV-coinfected individuals from southern Brazil using nucleotide sequence and restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of the LTR region, and confirmed that all HTLV-2 strains belonging to the 2a subtype. Moreover, we observed an association of molecular variants and sexual risk factor and injecting drug use.[22] Now, in order to expand these findings, confirm the HTLV-2 subtype prevalent in HIV-coinfected individuals from the south and southeast regions, and provide information regarding the characterization and the origin of HTLV-2 in such populations, the present study was conducted.

Materials and Methods

The samples analyzed consisted of blood samples obtained from 38 patients with HIV/AIDS attending the AIDS Reference Centers who were coinfected with HTLV-2: 28 from Londrina city and vicinities in Paraná (PR) state (BRLO, southern Brazil) of whom we have complete epidemiological data,[9,22] and 10 from São Paulo and Jundiaí cities in São Paulo (SP) state (BRSP, southeastern Brazil) of whom we have only data concerning gender and age. The available data on such patients are described in Table 1 and the map showing the

Table 1. Epidemiological Data and Human T Cell Lymphotropic Virus Type 2 Sequences Accession Numbers Obtained from 38 HIV/Human T Cell Lymphotropic Virus Type 2-Coinfected Patients Attending AIDS Reference Centers in Paraná (South) and São Paulo (Southeast) States of Brazil

Patient code	*Gender/age (years)*	*Locality (city–state)*	*Risk factor*	*GenBank AN LTR*	*GenBank AN env*	*GenBank AN tax*
BRLO02-02	F/26	Londrina–PR	IDU		HM770414	JN887712
BRLO03-02	F/39	Londrina–PR	Sexual		HM770390	JN887713
BRLO05-02	M/56	Londrina–PR	IDU		HM770391	
BRLO07-02	M/41	Londrina–PR	IDU	GU573730[a]	HM770392	
BRLO09-02	M/30	Londrina–PR	IDU	GU573731[a]	HM770393	JN887714
BRLO10-02	M/45	Londrina–PR	Sexual		HM770394	
BRLO11-02	M/35	Londrina–PR	IDU		HM770395	
BRLO12-02	F/33	Londrina–PR	IDU	GU573732[a]	HM770396	JN887715
BRLO18-02	F/29	Londrina–PR	Sexual	GU573733[a]	HM770397	
BRLO19-02	M/34	Londrina–PR	IDU	GU573734[a]	HM770398	JN887716
BRLO21-02	F/30	Londrina–PR	Sexual	GU573735[a]	HM770399	JN887717
BRLO22-02	M/46	Londrina–PR	Sexual	GU573736[a]	HM770400	JN887718
BRLO23-02	F/39	Londrina–PR	Sexual	GU573737[a]	HM770401	
BRLO24-02	M/37	Londrina–PR	Sexual	GU573738[a]	HM770402	
BRLO25-02	F/33	Londrina–PR	IDU		HM770415	
BRLO26-02	M/37	Londrina–PR	IDU	GU573739[a]	HM770403	JN887719
BRLO27-02	F/31	Londrina–PR	Sexual	GU573740[a]	HM770404	JN887720
BRLO28-02	M/42	Londrina–PR	Sex + IDU	GU573741[a]	HM770405	JN887721
BRLO29-02	F/34	Londrina–PR	Blood	GU573742[a]	HM770406	
BRLO31-02	M/29	Londrina–PR	IDU	GU573743[a]		JN887722
BRLO32-02	M/34	Londrina–PR	IDU		HM770407	JN887723
BRLO35-02	M/34	Londrina–PR	IDU		HM770408	JN887724
BRLO37-02	M/46	Londrina–PR	Sex + IDU	JQ435902	JQ435911	JN887725
BRLO38-02	F/27	Londrina–PR	Sexual		HM770409	JN887726
BRLO39-02	M/32	Londrina–PR	IDU		HM770410	JN887727
BRLO43-02	M/34	Londrina–PR	IDU		HM770411	JN887728
BRLO45-02	M/45	Londrina–PR	Sexual		HM770412	JN887729
BRLO49-02	M/35	Londrina–PR	Sex + IDU		HM770413	JN887730
BRSP91-08	M/47	São Paulo–SP	unknown	JQ435903	HM770416	
BRSP111-08	M/42	São Paulo–SP	unknown		HM770417	
BRSP160-08	M/46	São Paulo–SP	unknown	JQ435904	HM770418	
BRSP171-08	F/33	Jundiaí–SP	unknown	JQ435905	HM770423	JN887731
BRSP172-08	M/46	Jundiaí–SP	unknown		HM770424	JN887732
BRSP239-08	M/52	São Paulo–SP	unknown	JQ435906	HM770419	JN887733
BRSP319-08	F/47	São Paulo–SP	unknown	JQ435907	HM770420	JN887734
BRSP348-08	M/35	Jundiaí–SP	unknown	JQ435908	HM770425	JN887735
BRSP84-09	M/36	Jundiaí–SP	unknown	JQ435909	HM770421	
BRSP130-09	M/29	Jundiaí–SP	unknown	JQ435910	HM770422	JN887736

[a]Sequences published by Magri *et al.*, 2010.[22]
M, male; F, female; PR, Paraná state; SP, São Paulo state; IDU, intravenous drug users; AN, accession numbers; LTR, long terminal repeat.

location and distances among the cities is presented in Fig. 2. Signed informed consent was obtained from patients, and the study was approved by the Ethics Committee of all participant institutions.

DNA samples were extracted from peripheral blood leukocytes. The established protocol for amplification and sequencing the LTR region was previously published,[22] and for the *env* and *tax* regions were based on protocols previously described,[13,23,24] in which one primer has undergone minor nucleotide modification and thermal cycling conditions were adjusted (Supplementary Table S1; Supplementary Data are available online at www.liebertpub.com/aid). Still, in both protocols the polymerase chain reaction (PCR) and nested PCR were improved in stability using the Go*Taq* Colorless Master Mix (Promega Corporation, Madison, WI). In addition, to recover a few cases of HTLV-2-positive *tax* nested PCR that generated bad sequences, the sequencing was repeated with the primers described in Supplementary Table S2 and using three additional primers: Px107 *Forward* 5′ACC CCA TGT CAT ATT CTG CCA3′ (nt. 7713–7733), Px108 *Reverse* 5′AGC CTT TAC TTG GGA TTG TTT3′ (nt. 8265–8285), and Px104 *Reverse* 5′AAG TTC TTC TAA TCG TTT TAG3′ (nt. 7771–7791).[13]

Sequencing was performed using an ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster, CA). All of the sequencing chromatograms were assembled and edited with Sequencher 4.7 software. Multiple alignments were performed using the Clustal W multiple-sequence alignment tool from BioEdit Sequence Alignment Editor, version 7.0.5.3, software with a reference set available in the GenBank database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank), in which the nucleotide and amino acid substitutions were searched. HTLV-2 Mo and HTLV-2 NRA were used as prototypic examples of HTLV-2a and HTLV-2b subtypes, respectively; the first was identified in a T cell line derived from an atypical variant of hairy cell leukemia from patient Mo and the second from a patient with $CD8^+$ T cell lymphoproliferative disorder, both in the United States.[25] HTLV-2 subtyping was screened with the NCBI Genotyping (www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genotyping/formpage.cgi) tool website. Neighbor-joining (NJ) and maximum likelihood (ML) phylogenetic trees were constructed based on appropriate nucleotide substitution models determined by Modeltest v3.7 using PAUP v4b10 software (HKY+i+G model for the LTR and *env* regions and TrN+G model for the *tax* region), and showed similar topologies. Bootstrapping was performed with the stepwise addition algorithm for 1,000 replicates. The Efe2 (HTLV-2d) sequence was used as the outgroup. HTLV-1 was not used as the outgroup because it was previously indicated that the analysis could decrease the signal-to-noise value, resulting in serious topological errors.[26] MEGA4 software was used to estimate nucleotide distances.

Results

Although all efforts were made to improve the amplification and sequencing of all HTLV-2 isolates, we were not able to sequence some genomic segments (Table 1). The protocol established for the LTR allowed us to obtain sequences of 458 bp from 23 patients (15 from the southern region, 14 previously published,[22] and 8 from southeastern Brazil), sequences of 1,065 bp for *env* from 37 patients (27 from the southern region and 10 from southeastern Brazil), and sequences of 1,068 bp for *tax* from 25 patients (19 from the south and 6 from the southeast regions of Brazil). All GenBank accession numbers are presented in Table 1 and in the section Sequence Data.

The sequences were analyzed by the NCBI Genotyping tool and by phylogeny and all belong to the HTLV-2a subtype (Figs. 3, 4, and 5), except one (BRLO38-02) that belongs to the HTLV-2b subtype (Figs. 4 and 5). The variant -2c was confirmed in all HTLV-2a isolates by *tax* sequence analysis using the Clustal W multiple-sequence alignment tool, which

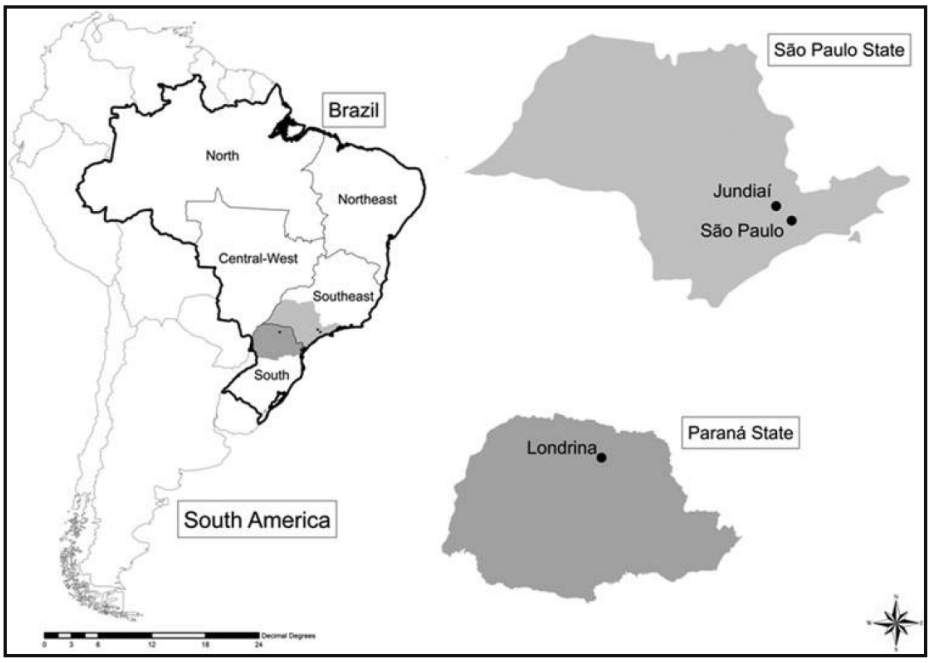


FIG. 2. Map of Brazil showing the location of the São Paulo state (highlighting São Paulo and Jundiaí cities, distance 37 miles) and the Paraná state (highlighting Londrina city, 330 miles from São Paulo city).

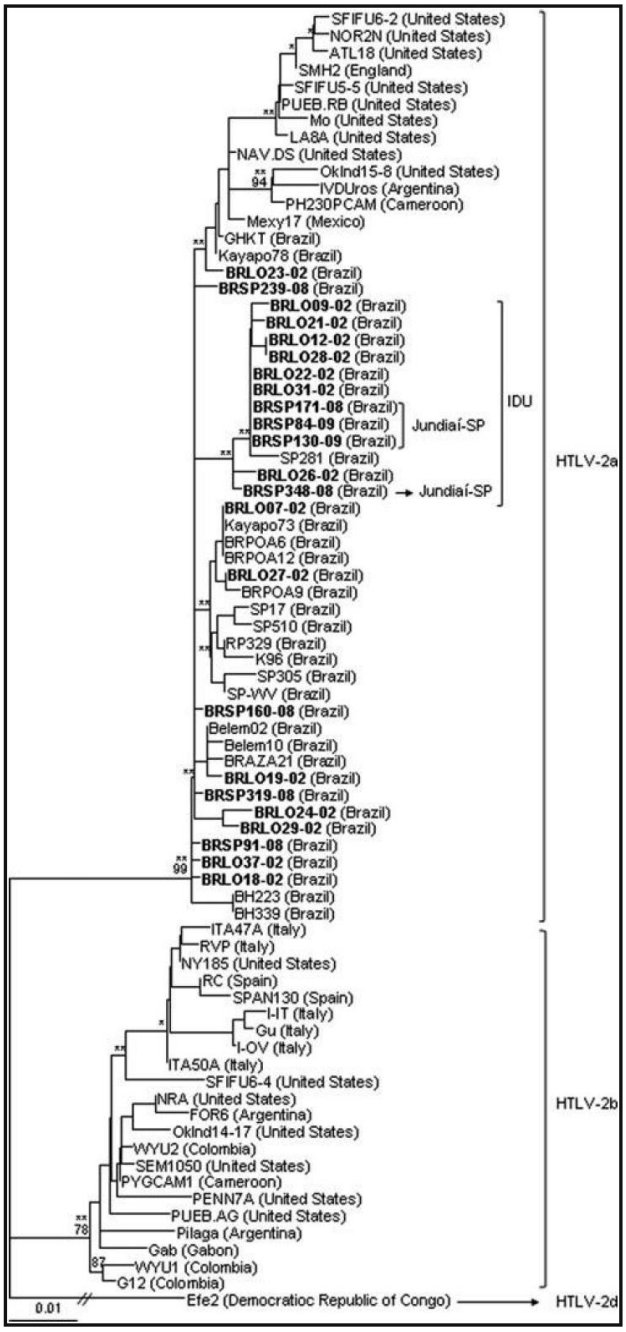


FIG. 3. Dendrogram showing the phylogenetic relationship between 458 bp of the long terminal repeat (LTR) (nt. 181–638 in relation to the Mo prototype—AN M10060) region of the HTLV-2 strains, including sequences from the south and southeast regions of Brazil (GenBank AN GU573730–GU573743, and JQ435902–JQ435910) in bold. Bootstrap values above 65% and zero length using the likelihood ratio test with $p < 0.001$ (**) and $p \leq 0.05$ (*) in key branches are depicted. The HTLV-2d Efe2 isolate was used as the outgroup.

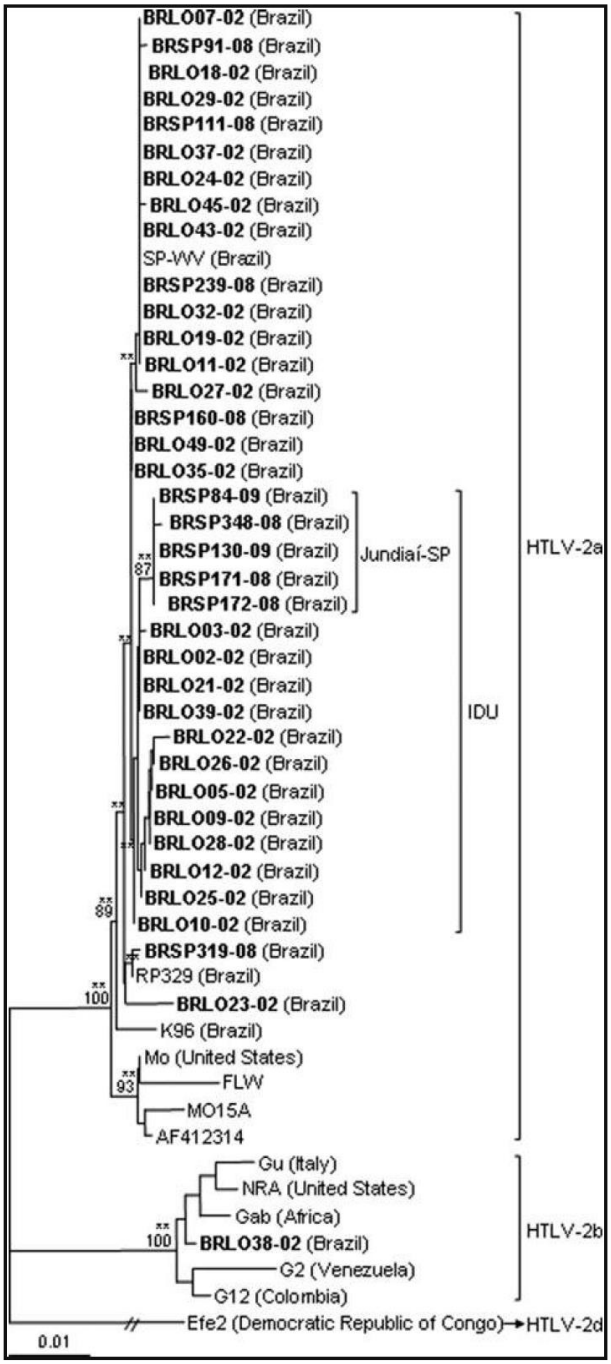


FIG. 4. Dendrogram showing the phylogenetic relationship between 1,065 bp of the *env* (nt. 5573–6637 in relation to the Mo prototype—AN M10060) region of the HTLV-2 strains, including sequences from the south and southeast regions of Brazil (GenBank AN HM770390–HM770425 and JQ435911) in bold. Bootstrap values above 65% and zero length using the likelihood ratio test with $p < 0.001$ (**) and $p \leq 0.05$ (*) in key branches are depicted. The HTLV-2d Efe2 isolate was used as the outgroup.

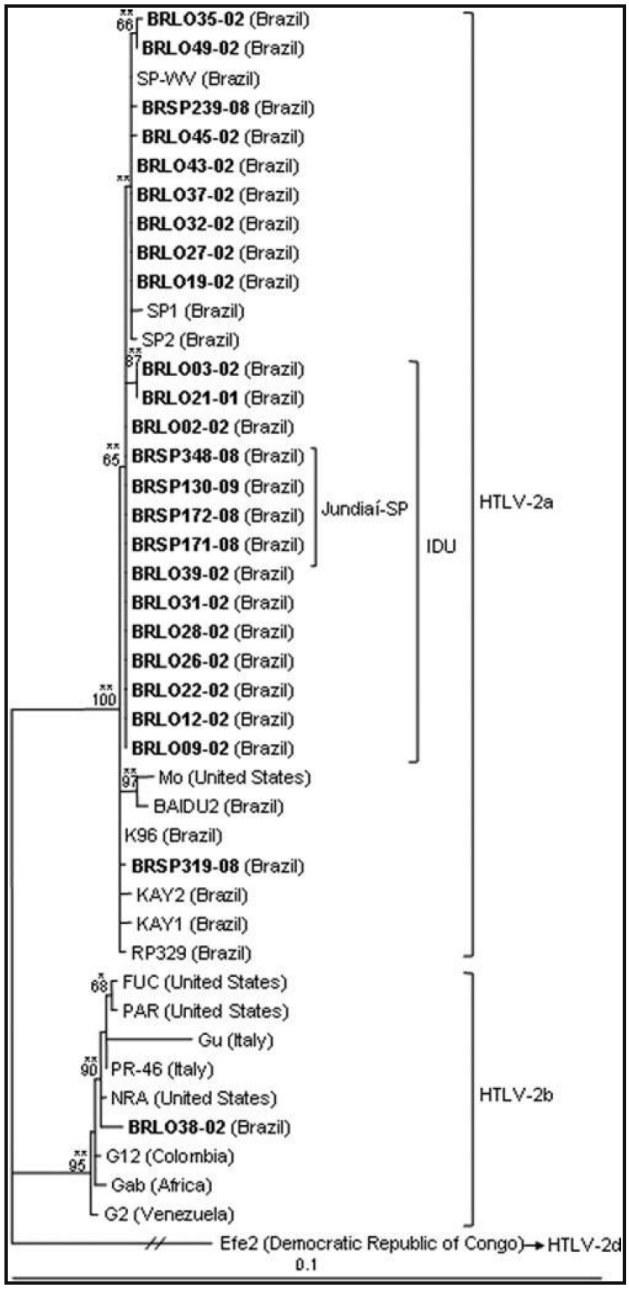


FIG. 5. Dendrogram showing the phylogenetic relationship between 1,068 bp of the *tax* (nt. 7213–8280 in relation to the Mo prototype—AN M10060) region of the HTLV-2 strains, including sequences from the south and southeast regions of Brazil (GenBank AN JN887712–JN887736) in bold. Bootstrap values above 65% and zero length using the likelihood ratio test with $p < 0.001$ (**) and $p \leq 0.05$ (*) in key branches are depicted. The HTLV-2d Efe2 isolate was used as the outgroup.

disclosed the loss of the stop codon in the *tax* gene position of 2735 and an additional 25 amino acids at the C-terminal end of the Tax protein (Fig. 1).

Phylogenetic sequence analysis of the *env* tree in relation to demographic and epidemiological data of patients disclosed an association between viral variants and type of exposure to the virus (IDU, $p < 0.001$) and the place of origin of the patient (isolates from Jundiaí city in São Paulo State are present in a single clade, bootstrap = 87%, $p < 0.001$) (Fig. 4). But when the sequences were analyzed by the LTR and *tax* phylogenetic trees, it was observed that the sequences from Jundiaí clustered together on the IDU branch, not separately (LTR and *tax*: $p < 0.001$) (Figs. 3 and 5, respectively).

Molecular analysis of the LTR, *env*, and *tax* sequences of HTLV-2, using MEGA4, showed high nucleotide similarity between the Brazilian sequences (99.3%, 99.6%, and 99.9%, respectively) and in relation to the HTLV-2a Mo prototype (97.8%, 99.2%, and 99.3%, respectively), in contrast to the low similarities detected in relation to the HTLV2-b NRA prototype (similarity of 95.2%, 95.7%, and 96.7%, respectively). When the sequences were stratified into two groups, one from Londrina and another from São Paulo, no differences were found. The similarities between the BRLO38-02 (HTLV-2b subtype) sequences and the NRA (HTLV-2b prototype) were 99.3% for the *env* and 99.5% for the *tax* region; unfortunately, the LTR region amplification did not function as required.

Regarding the presence of nucleotide substitutions in the LTR region of HTLV-2 in relation to the Mo prototype, in 100% of sequences G214A, T265C, C401T, and C551G substitutions were detected, while G316C, G317T, A448G, and T630C nucleotide substitutions were detected at frequencies of 96.3%, 96.3%, 92.6%, and 85.2%, respectively. The T315G, C320G, and G522A nucleotide substitutions were detected in 44.4% of sequences.

Concerning the presence of mutations in the *env* region, six nucleotide changes were very conserved among the isolates at positions T5726C, A5794G, T6109C, C6226T, C6379T, and A6580G with frequencies of 100%, 97.2%, 91.6%, 100%, 100%, and 100% relative to the Mo prototype, respectively. Among these nucleotide substitutions the only one that was a nonsynonymous mutation and thus generating an amino acid change was the T5726C. When the sequences were converted into amino acids the change S1909P was observed.

The sequences of the *tax* region of HTLV-2 were also analyzed for the presence of mutations in relation to the Mo prototype. The main nucleotide substitutions observed were A7819G, A7991G, A7798G, G8053C, and T8203A, with a frequency of 100%. Nucleotide substitutions C7611T, T7686C, and A7825G were detected at frequencies of 96%, 92%, and 36%, respectively. Amino acid changes of T2607A, Y2664C, and E2685Q and the loss of the stop codon 2735Q and the gain of 25 amino acids were detected in 100% of the sequences (Fig. 1). The *tax* sequence of the isolated BRLO38-02 was also aligned with the NRA prototype (HTLV-2b) and few nucleotide changes were detected (T7554C, T7611C, T7902C, T8031C, and G8142A), without amino acid change.

Discussion and Conclusions

The selected and optimized protocols in the present study proved useful to generate long fragments of *env* and *tax* regions of the HTLV-2 proviral genome and enabled robust phylogenetic analysis, although they still were not be able to amplify all the study samples. The sequencing of the *tax* region was nearly full: only lacking were the three initial nucleotides located at the beginning of the viral *env* gene that characterize the start codon of Tax (amino acid methionine), and by explicing encodes a protein of 356 amino acids in

length (Fig. 1). The function of this long transactivator protein was poorly analyzed. There is only one study that compared the function of the Tax proteins of HTLV-1 and HTLV-2 subtypes a, b, c, and d, in CREB and NF-κB-mediated transactivation. Using the full-length HTLV-1 LTR and a 21-bp repeat reporter in 293T cells, no significant difference in Tax transactivation was detected, except for some HTLV-2a Tax isolates, including the Mo prototype. It was suggested that all HTLV-2 subtypes except the HTLV-2a subtype have a pathogenic potential equivalent to that of HTLV-1.[27] Unfortunately this study was not designed to address this issue, but the Brazilian HTLV-2 isolates of the present study could help us to add information concerning this matter in the future.

The molecular characterization of the LTR, *env*, and *tax* region of HTLV-2 isolates from southern and southeastern Brazil corroborated the results obtained in a previous study of the LTR region[22] and with data from the literature, in which Brazilian isolates clustered in the clade of the HTLV-2a subtype.[13,15,21] The phylogenetic tree of the *env* region showed the presence of a group almost exclusively of IDUs, also found in the LTR and *tax* trees. These clades could represent a different route of virus transmission among IDUs or a little diverse evolutionary virus rate, as described in European IDUs.[22,28] Furthermore, the clade in the *env* phylogenetic tree, which contains isolates from a specific geographic region (Jundiaí city 37 miles from São Paulo city), and the clades of the same sequences in the LTR and *tax* phylogenetic trees allow us to suggest that the risk factor for acquiring retroviruses in patients from Jundiaí was the use of injecting drugs. In addition, a single local monophyletic subcluster closed to IDUs suggests *in situ* dissemination of a local clade.

The HTLV-2b subtype found in one sample (BRLO38-02) of the present study (the *env* and *tax* regions) was associated with ethnic background; the patient was from Paraguay, a country endemic for HTLV-2b. Consistent with this finding, the HTLV-2b subtype has been found in the state of Rio Grande do Sul in Brazil,[20] bordering countries where the HTLV-2b subtype prevails. We could speculate that with the commercial agreement of Mercosul, the increasing population flux across borders warrants monitoring this viral subtype in the country.

When the present sequences were compared with the HTLV-2 Mo prototype, a high nucleotide similarity of 99.2% in the *env* region was observed, and this result is in line with the results found in IDUs living in Salvador (99%), northeastern Brazil.[19] Still, the amino acid change S1909P in 100% of the *env* sequences was also previously reported in Brazilian strains, and could represent a molecular signature of HTLV-2a (variant 2c) strains from Brazil.[21,29]

In relation to the *tax* sequences, the present results corroborated the previous reports that characterize the Brazilian HTLV-2c variant (often considered a molecular variant of -2a), highlighting the long Tax protein.[7,13,15] In addition, high similarity in *tax* was observed among isolates from the present study (99.9%) and also in relation to the Mo prototype (99.3%). Therefore, it is necessary to emphasize that HTLV replication, unlike other retroviruses, is primarily through the clonal expansion of cells that are infected via mitosis and not so much by the use of the reverse transcriptase.[30] During mitosis the cellular DNA polymerases are used and the new cells contain high fidelity copies of the original provirus.[11] This fact could help to explain why HTLV has high genetic similarity, as opposed to HIV.[31]

Concerning the evolutionary rate of HTLV-2, Salemi and collaborators calibrated a molecular clock of the LTR region of HTLV-2 and estimated a fixation rate between 1.08×10^{-4} and 2.7×10^{-5} nucleotide substitutions per site per year for the 2a and 2b European IDU strains, and concluded that this rate is very low among RNA viruses.[26] For example, HIV-1 (the *env* region) was measured up to 1.6×10^{-2} substitutions per site per year.[32]

High prevalences of HTLV-2 have been described in geographically isolated groups that should have different viral dynamics and evolution.[11,26,33] Interestingly, phylogenetic analysis of LTR sequences from the Kayapo Indians of Brazil clustered the sequences in a phylogroup named A-II, in which sequences from one Mexican prostitute and two prostitutes from Ghana and Cameroon clustered together.[34] This finding could suggest that HTLV-2a may have evolved from a common ancestor long before the HTLV-2a-infected ancestors of the Kayapo introduced this subtype into the Americas. Corroborating this hypothesis, Mauclère and collaborators proposed that HTLV-2 appeared in Africa, and then some of the strains left this continent during the period of human migration and became the ancestors of HTLV-2a/c or HTLV-2b. Additionally they also speculated that the HTLV-2b-bearing populations may have migrated through Asia and then separated into subgroups: some went to America and others returned to Africa. Lastly, the remaining virus became the HTLV-2d subtype.[35] Also other studies agreed that HTLV-2 was originally brought from Asia into the Americas during the migration of the Asian populations over the Bering land bridge.[33,36,37] These data and Mauclère's data accommodate the hypothesis of the entrance of HTLV-2 into the Americas by the Bering land bridge a long time ago.

In Europe it is believed that the -2a subtype was introduced to IDUs in Eastern Europe and the -2b in Western Europe in at least two separate periods.[37] In Spain and Italy, for example, HTLV-2b remains the most prevalent subtype, although today new cases of this infection are decreasing.[38,39] In Brazil, all data point to the HTLV-2c molecular variant as formerly present in Indians native tribes, with posterior dissemination to the urban population during its formation, through interethnic contact during the intense event of miscegenation, by sexual intercourse, and is maintained in Indians mostly by breast feeding.[7,13,19,33,34]

In conclusion, since we demonstrated the absence of the HTLV-2b and prototype North American HTLV-2a subtypes in the present study population, we suggest that these individuals had little interaction with individuals or blood products from other geographic areas, and also with individuals coinfected with HIV/HTLV-2 outside Brazil. In addition, we could speculate that there were different routes and origins of HIV and HTLV-2 in Brazil, probably through prior infection by HTLV-2 among IDUs and later on HIV. Because of the development and recent increase in the population movement in South American migration in the past years, surveillance of HTLV-2 infection is required and opportune in Brazil.

Sequence Data

The GenBank accession numbers of the 71 HTLV-2 new sequences obtained in our laboratory and included in the phylogenetic analysis are as follows: **LTR**: BRLO37-02

(JQ435902), BRSP91-08 (JQ435903), BRSP160-08 (JQ435904), BRSP171-08 (JQ435905), BRSP239-08 (JQ435906), BRSP319-08 (JQ435907), BRSP348-08 (JQ435908), BRSP84-09 (JQ435909), BRSP130-09 (JQ435910); ***env***: BRLO02-02 (HM770414), BRLO03-02 (HM770390), BRLO05-02 (HM770391), BRLO07-02 (HM770392), BRLO09-02 (HM770393), BRLO10-02 (HM770394), BRLO11-02 (HM770395), BRLO12-02 (HM770396), BRLO18-02 (HM770397), BRLO19-02 (HM770398), BRLO21-02 (HM770399), BRLO22-02 (HM770400), BRLO23-02 (HM770401), BRLO24-02 (HM770402), BRLO25-02 (HM770415), BRLO26-02 (HM770403), BRLO27-02 (HM770404), BRLO28-02 (HM770405), BRLO29-02 (HM770406), BRLO32-02 (HM770407), BRLO35-02 (HM770408), BRLO37-02 (JQ435911), BRLO38-02 (HM770409), BRLO39-02 (HM770410), BRLO43-02 (HM770411), BRLO45-02 (HM770412), BRLO49-02 (HM770413), BRSP91-08 (HM770416), BRSP111-08 (HM770417), BRSP160-08 (HM770418), BRSP171-08 (HM770423), BRSP172-08 (HM770423), BRSP239-08 (HM770419), BRSP319-08 (HM770420), BRSP348-08 (HM770425), BRSP84-09 (HM770421), BRSP130-09 (HM770422); ***tax***: BRLO02-02 (JN887712), BRLO03-02 (JN887713), BRLO09-02 (JN887714), BRLO12-02 (JN887715), BRLO19-02 (JN887716), BRLO21-02 (JN887717), BRLO22-02 (JN887718), BRLO26-02 (JN887719), BRLO27-02 (JN887720), BRLO28-02 (JN887721), BRLO31-02 (JN887722), BRLO32-02 (JN887723), BRLO35-02 (JN887724), BRLO37-02 (JN887725), BRLO38-02 (JN887726), BRLO39-02 (JN887727), BRLO43-02 (JN887728), BRLO45-02 (JN887729), BRLO49-02 (JN887730), BRSP171-08 (JN887731), BRSP172-08 (JN887732), BRSP239-08 (JN887733), BRSP319-08 (JN887734), BRSP348-08 (JN887735), BRSP130-09 (JN887736).

The GenBank accession numbers of the HTLV-2 reference sequences included in the phylogenetic study are as follows: **LTR:** BRLO7-02 (GU573730), BRLO9-02 (GU573731), BRLO12-02 (GU573732), BRLO18-02 (GU573733), BRLO19-02 (GU573734), BRLO21-02 (GU573735), BRLO22-02 (GU573736), BRLO23-02 (GU573737), BRLO24-02 (GU573738), BRLO26-02 (GU573739), BRLO27-02 (GU573740), BRLO28-02 (GU573741), BRLO29-02 (GU573742), BRLO31-02 (GU573743), SFIFU6 2 (U73022), NOR2N (U10258), ATL18 (U10252), SMH2 (Y09148), SFIFU5 5 (U73010), PUEBRB (U10262), Mo (M10060), LA8A (U10256), NAV.DS (U10257), Oklnd15 8 (U73015), IVDUros (AF054272), PH230PCAM (Z46838), Mexy17 (L42510), GHKT (L42507), RP329 (AF326583), K96 (AF326584), Kayapo78 (AF139388), SP-WV (AF139382), Kayapo73 (L42509), BRPOA6 (DQ028606), BRPOA12 (DQ028613), BRPOA9 (DQ028608), Belem10 (AF139393), Belem02 (AF139392), BH223 (AY509600), BH339 (AY509602), RC (L77235), SPAN130 (U10266), PortVs (AY622979), PortNn (AY622978), I-IT (Y09151), Gu (X89270), I-OV (Y09155), ITA47A (U10254), NY185 (U10259), RVP (L77244), ITA50A (U10255), SFIFU6-4 (U73018), BRPOA10 (DQ028611), FOR6 (AF054273), NRA (L20734), Oklnd14-17 (U73009), WYU2 (U12794), SEM1050 (U10263), PYGCAM1 (Z46888), PENN7A (U10260), PUEB AG (U10261), Pilaga (AF054271), Gab (Y13051), WYU1 (U12792), G12 (L11456), BRPOA11 (DQ028612), Efe2 (Y14365); ***env***: Mo (M10060), MO15A (K02024), RP329 (AF326583), Gab (Y13051), Gu (X89270), FLW (S67545), AF412314 (AF412314), SP-WV (AF139382), G2 (AF074965), G12 (L11456), NRA (L20734), k96 (AF326584), Efe2 (Y14365); ***tax***: Mo (M10060), K96 (AF326584), NRA (L20734), G12 (L11456), RP329 (AF326583), BAIDU2 (AF401496), SP-WV (AF139382), SP2 (U32872), SP1 (U32873), FUC (U32882), PAR (U32880), KAY1 (U32875), KAY2 (U32874), G2 (AF074965), Gab (Y13051), Gu (X89270), PR-46 (DQ022075), Efe2 (Y14365).

Acknowledgments

This study was supported by the Ministério da Ciência e Tecnologia/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (MCT/CNPq), Brazil (Universal Grant 481040/2007-2), a fellowship to A.C.A. (grant CNPq–PQ 303545/2012-7), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil (MSc fellowship to H.K.M. and PhD fellowship to M.C.M.), and Instituto Adolfo Lutz (grants 33/07 and 39/07). The authors are grateful to Michelle Cristina Araujo Picoli for map design.

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

1. Murphy EL, Mahieux R, De Thé G, *et al.*: Molecular epidemiology of HTLV-II among United States blood donors and intravenous drug user: An age-cohort effect for HTLV-II RFLP type a. Virology 1998;242:425–434.
2. Zella D, Mori L, Ferrante P, Casoli C, Magnani G, Achilli G, Cattaneo E, Lori F, and Bertazzoni U: HTLV-II infection in Italian drug users. Lancet 1990;335:575–576.
3. Taylor GP: The human T cell lymphotropic viruses. In: *Principles and Practice of Clinical Virology*, 5th ed. (Zuckerman AJ, Banatvala JE, Pattison JR, Griffiths PD, Schoub BD, eds.). John Wiley & Sons Ltd, Piscataway, NJ, 2004, pp. 759–777.
4. Catalan-Soares B, Carneiro-Proietti AB, Proietti FA, and Interdisciplinary HTLV Research Group: Heterogeneous geographic distribution of human T-cell lymphotropic viruses I and II (HTLV-I/II): Serological screening prevalence rates in blood donors from large urban areas in Brazil. Cadern Saúde Públ (Rio de J) 2005;21:926–931.
5. Gabbai AA, Bordini JO, Vieira-Filho JPB, *et al.*: Selectivity of human T lymphotropic vírus type-1 (HTLV-1) and HTLV-2 infection among different populations in Brazil. Am J Trop Med Hyg 1993;49:664–671.
6. Etzel A, Shibata GY, Rozman M, Jorge MLSG, Damas CD, and Segurado AAC: HTLV-1 and HTLV-2 infections in HIV infected individuals from Santos, Brazil: Seroprevalence and risk factors. J Acquir Immune Defic Syndr 2001;26:185–190.
7. Ishak R, Vallinoto ACR, Azevedo VN, and Ishak MQ: Epidemiological aspects of retrovirus (HTLV) infection among Indian populations in the Amazon Region of Brazil. Cad Saúde púb (Rio de J) 2003;19:901–914.
8. Menna-Barreto M, Bender AL, Bonatto SL, *et al.*: Human T cell lymphotropic virus type II in Guaraní Indians, Southern Brazil. Cad Saúde Púb (Rio de J) 2005;21:1947–1951.
9. Morimoto HK, Caterino-de-Araujo A, Morimoto AA, *et al.*: Seroprevalence and risk factors for human T-cell lymphotropic virus type 1 and 2 infection in human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients attending AIDS Referral Center Health Units in Londrina and other communities in Paraná, Brazil. AIDS Res Hum Retroviruses 2005;21:256–262.
10. Oliveira EH, Oliveira-Filho AB, Souza LA, *et al.*: Human T-cell lymphotropic virus in patients infected with HIV-1: Molecular epidemiology and risk factors for transmission in Piauí, North-eastern Brazil. Curr HIV Res 2012;10:700–707.
11. Lemey P, Pybus OG, Van Dooren S, and Vandamme AM: A Bayesian statistical analysis of human T-cell lymphotropic virus evolutionary rates. Infect Genet Evol 2005;5:291–298.
12. Bangham CRM and Osame M: Cellular immune response to HTLV-1. Oncogene 2005;24:6035–6046.

13. Eiraku N, Novoa P, Ferreira MC, *et al.*: Identification and characterization of new and distinct molecular subtype of human T-cell lymphotropic vírus type 2. J Virol 1996;70:1481–1492.
14. Feuer G and Green PL: Comparative biology of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2. Oncogene 2005;24:5996–6004.
15. Covas DM and Kashima S: Complete nucleotide sequences of the genomes of two Brazilian specimens of human T lymphotropic virus type 2 (HTLV-2). AIDS Res Hum Retroviruses 2003;19:689–697.
16. Ishak R, Harrington WJ, Azevedo VN, *et al.*: Identification of human T-cell lymphotropic virus type IIa infection in the Kayapo, an indigenous population of Brazil. AIDS Res Hum Retroviruses 1995;11:813–821.
17. Vandamme AM, Salemi M, Van Brussel M, *et al.*: African origin of human T-lymphotropic virus type 2 (HTLV-2) supported by a potential new HTLV-2d subtype in Congolese Bambuti Efe Pygmies. J Virol 1998;72:4327–4340.
18. Slattery JP, Franchini G, and Gessain A: Genomic evolution, patterns of global dissemination, and interspecies transmission of human and simian T-cell leukemia/lymphotropic viruses. Genome Res 1999;9:525–540.
19. Alcantara LCJ, Shindo N, Van Doren S, *et al.*: Brazilian HTLV type 2a strains from intravenous drug users (IDUs) appear to have originated from two sources: Brazilian Amerindians and European/North American IDUs. AIDS Res Hum Retroviruses 2003;19:519–523.
20. Renner JDP, Laurino JP, Menna-Barreto M, and Schmitt VM: Molecular evidence of HTLV-II subtype B among an urban population living in South Brazil. AIDS Res Hum Retroviruses 2006;22:301–306.
21. Novoa P, Penalva de Oliveira AC, Posada-Vergara MP, Duarte AJS, and Casseb J: Molecular characterization of human T-cell lymphotropic virus type 2 (HTLV-II) from people living in urban areas of Sao Paulo city: Evidence of multiple subtypes circulation. J Med Virol 2007;79:182–187.
22. Magri MC, Morimoto HK, Brígido LFM, Rodrigues R, and Caterino-de-Araujo A: Long terminal repeat sequence analysis of HTLV-2 molecular variants identified in Southern Brazil. AIDS Res Hum Retroviruses 2010;26:1327–1331.
23. Egan JF, O'Leary B, Lewis MJ, *et al.*: High rate of human T lymphotropic virus type IIa infection in HIV type 1-infected intravenous drug abusers in Ireland. AIDS Res Hum Retroviruses 1999;15:699–705.
24. Shindo N, Alcantara LC, Van Dooren S, *et al.*: Human retroviruses (HIV and HTLV) in Brazilian Indians: Seroepidemiological study and molecular epidemiology of HTLV type 2 isolates. AIDS Res Hum Retroviruses 2002;18:71–77.
25. Lee H, Idler KB, Swanson P, *et al.*: Complete nucleotide sequence of HTLV-II isolate NRA: Comparison of envelope sequence variation of HTLV_II isolates from U.S. blood donors and U.S. and Italian IV drug users. Virology 1993;196:57–69.
26. Salemi M, Vandamme AM, Gradozzi C, *et al.*: Evolutionary rate and genetic heterogeneity of human T-cell lymphotropic virus type II (HTLV-II) using isolates from European injecting drug users. J Mol Evol 1998;46:602–611.
27. Lewis MJ, Sheehy N, Salemi M, VanDamme AM, and Hall WW: Comparison of CREB- and NK-B-mediated transactivation by human T lymphotropic virus type II (HTLV-II) and type I (HTLV-I) Tax proteins. Virology 2002;295:182–189.
28. Salemi M, Lewis M, Egan JF, Hall WW, Desmyter J, and Vandamme A: Different population dynamics of human T cell lymphotropic virus type II in intravenous drug users compared with endemically infected tribes. Proc Natl Acad Sci USA 1999;96:13253–13258.
29. Olah I, Fukumori LMI, Smid J, *et al.*: Neither molecular diversity of the envelope, immunosuppression status, nor proviral load causes indeterminate HTLV Western blot profiles in samples from human T-cell lymphotropic virus type 2 (HTLV-2)-infected individuals. J Med Virol 2010;82: 837–842.
30. Wattel E, Vartanian JP, Pannetier C, and Wain-Hobson S: Clonal expansion of human T-cell leukemia virus type I-infected cells in asymptomatic and symptomatic carriers without malignancy. J Virol 1995;69:2863–2868.
31. Lemey P, Kosakovsky Pond SL, Drummond AJ, *et al.*: Synonymous substitution rates predict HIV disease progression as a result of underlying replication dynamics. PLoS Comput Biol 2007;3(2):e29.
32. Hahn BH, Shaw GM, Taylor ME, *et al.*: Genetic variation in HTLV-III/LAV over time in patients with AIDS or at risk for AIDS. Science 1986;232:1548–1553.
33. Biggar RJ, Taylor ME, Neel JV, *et al.*: Genetic variants or human T lymphotropic virus type II in American Indian groups. Virology 1996;216:165–173.
34. Switzer WM, Black FL, Pieniazek D, Biggar RJ, Lal RB, and Heneine W: Endemicity and phylogeny of the human T cell lymphotropic vírus type II subtype A from the Kayapo Indians of Brazil: Evidence for limited regional dissemination. AIDS Res Human Retroviruses 1996;12:635–640.
35. Mauclère P, Afonso PV, Meertens L, *et al.*: HTLV-2B strains, similar to those found in several Amerindian tribes, are endemic in central African Bakola pygmies. J Infect Dis 2011; 203:1316–1323.
36. Suzuki Y and Gojobori T: The origin and evolution of the human T-cell lymphotropic virus type I and II. Virus Genes 1998;16:69–84.
37. Salemi M, Vandamme AM, Desmyter J, Casoli C, and Bertazzoni U: The origin and evolution of human T-cell lymphotropic virus type II (HTLV-II) and the relationship with its replication strategy. Gene 1999;234:11–21.
38. Abad M, Dronda F, Dominguez E, Moreno S, and Vallejo A: HTLV-2b among HIV type 1-coinfected injecting drug users in Spain. AIDS Res Hum Retroviruses 2011;27:579–583.
39. Salemi M, Cattaneo E, Casoli C, and Bertazzoni, U: Identification of IIa and IIb molecular subtypes of human T-cell lymphotropic virus type II among Italian injecting drug users. J Acquir Immune Defic Syndr 1995;8:516–520.

Address correspondence to:
Adele Caterino-de-Araujo
Immunology Department
Instituto Adolfo Lutz
Av. Dr. Arnaldo, 355, 11° andar
01246-902, São Paulo, S.P.
Brazil

E-mail: caterino@usp.br; caterino@ial.sp.gov.br

Supplementary Data

Supplementary Table S1. Primers Employed in Amplification and Sequencing (*env* and *tax*) of Proviral DNA of Human T Lymphotropic Virus Type 2 in Patients Coinfected with HIV-1 from Southern and Southeastern Brazil

Molecular assay	*Primer*	*Sequence 5′–3′ and product size*	*Position*[a]
PCR *env*[b]	E5 Forward	AGC CAA GTG TCC CTT CGA CTA (21 bp)	5603–5623
	E2 Reverse	CTG CAG AAG CTA GCA GGT CTA (21 bp)	6641–6661
n-PCR *env*[b,c]	E3 Forward	TTC TCT AAG TGC GGC TCC TC (20 bp)	5627–5646
	E2 Reverse	CTG CAG AAG CTA GCA GGT CTA (21 bp)	6641–6661
Sequencing *env*[b]	GP21F1 Forward	CTG CAA CAA CTC CAT TAT CCT (21 bp)	6031–6051
PCR *tax*[d]	Px101 Forward	GGC AAT CTC CTA AAA TAG TCT (21 bp)	7155–7175
	Px106 Reverse	GGG CCG TGG TTT CAG TTC CTA (21 bp)	8306–8326
n-PCR *tax*[c,d]	Px103 Forward	TTA CAA TCC TGT CTC CTC TCA (21 bp)	7192–7212
	Px106 Reverse	GGG CCG TGG TTT CAG TTC CTA (21 bp)	8306–8326
Sequencing *tax*[d]	Px105 Forward	GCT YTC CCC ACC CAT GAC ATG (21 bp)	7683–7703
	LS1 Forward	GAA TAC ACC AAC ATC CCT GTC (21 bp)	8140–8160
	Px102 Reverse	TGT GTG TAG GAA CAT TTT GTA (21 bp)	7795–7815

[a]Primer nucleotide position is provided as aligned with Mo (HTLV-2-infected cell line; GenBank AN M10060).
[b]Adapted from Egan *et al.* (1999)[23] and Shindo *et al.* (2002).[24]
[c]Primers employed in n-PCR and sequencing.
[d]Adapted from Eiraku *et al.* (1996).[13]
▒, Highlighted degenerate nucleotide.
bp, base pairs; PCR, polymerase chain reaction; n-, nested.

Supplementary Table S2. Polymerase Chain Reaction Assays (*env* and *tax*) Protocols for Detecting Proviral DNA of Human T Lymphotropic Virus Type 2 in Patients Coinfected with HIV-1 from Southern and Southeastern Brazil

	HTLV-2 env[a]		*HTLV-2* tax[b]	
Reaction conditions	*PCR*	*n-PCR*	*PCR*	*n-PCR*
Reagents				
GoTaq Colorless Master Mix 2X	12.5 μl	25 μl	12.5 μl	25 μl
Primer Forward 10 pmol/μL	1 μl	1.5 μl	1 μl	1.5 μl
Primer Reverse 10 pmol/μL	1 μl	1.5 μl	1 μl	1.5 μl
H_2O	8 μl	17 μl	8 μl	17 μl
DNA *input*	2.5 μl	5 μl	2.5 μl	5 μl
Final volume	25 μL	50 μl	25 μl	50 μl
Thermal cycling conditions	30 cycles	94°C–4 min 94°C–1 min 56°C–1 min 72°C–1 min 30 s 72°C–10 min 8°C–∞	35 cycles	95°C–5 min 95°C–40 s 52,5°C–30 s 72°C–40 s 72°C–10 min 8°C–∞

[a]Adapted from Egan *et al.* (1999)[23] and Shindo *et al.* (2002).[24]
[b]Adapted from Eiraku *et al.* (1996).[13]

Anexo N - Número dos isolados de pacientes coinfectados pelo HIV-1 de Londrina e região (sul) e de São Paulo (sudeste) no Brasil, e seus respectivos números de acesso no GenBank para as regiões LTR, *env* e *tax* do genoma proviral do HTLV-2.

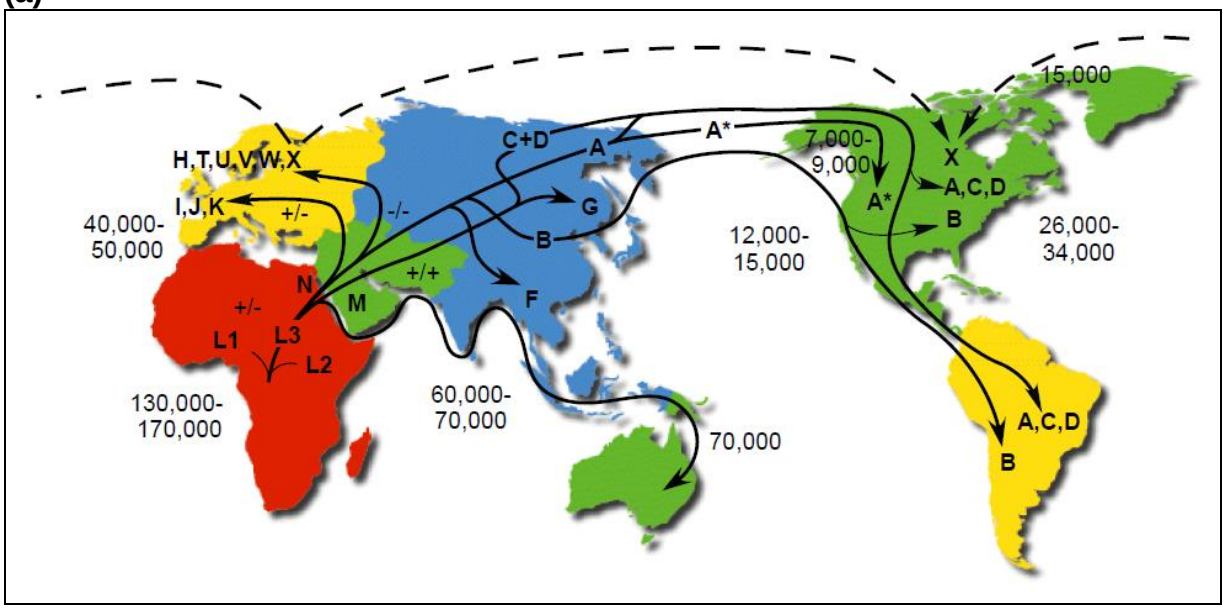
HTLV-2	**Nº de Acesso no GenBank**		
Isolado	**LTR** (458pb)	***env*** (1065pb)	***tax*** (1068pb)
BRLO02-02		HM770414	JN887712
BRLO03-02		HM770390	JN887713
BRLO05-02		HM770391	
BRLO07-02	GU573730	HM770392	
BRLO09-02	GU573731	HM770393	JN887714
BRLO10-02		HM770394	
BRLO11-02		HM770395	
BRLO12-02	GU573732	HM770396	JN887715
BRLO18-02	GU573733	HM770397	
BRLO19-02	GU573734	HM770398	JN887716
BRLO21-02	GU573735	HM770399	JN887717
BRLO22-02	GU573736	HM770400	JN887718
BRLO23-02	GU573737	HM770401	
BRLO24-02	GU573738	HM770402	
BRLO25-02		HM770415	
BRLO26-02	GU573739	HM770403	JN887719
BRLO27-02	GU573740	HM770404	JN887720
BRLO28-02	GU573741	HM770405	JN887721
BRLO29-02	GU573742	HM770406	
BRLO31-02	GU573743		JN887722
BRLO32-02		HM770407	JN887723
BRLO35-02		HM770408	JN887724
BRLO37-02	JQ435902	JQ435911	JN887725
BRLO38-02		HM770409	JN887726
BRLO39-02		HM770410	JN887727
BRLO43-02		HM770411	JN887728
BRLO45-02		HM770412	JN887729
BRLO49-02		HM770413	JN887730
BRSP91-08	JQ435903	HM770416	

BRSP111-08		HM770417	
BRSP160-08	JQ435904	HM770418	
BRSP171-08	JQ435905	HM770423	JN887731
BRSP172-08		HM770424	JN887732
BRSP239-08	JQ435906	HM770419	JN887733
BRSP319-08	JQ435907	HM770420	JN887734
BRSP348-08	JQ435908	HM770425	JN887735
BRSP84-09	JQ435909	HM770421	
BRSP130-09	JQ435910	HM770422	JN887736

Legenda: Nº - número; pb - pares de bases.

Anexo O - Mapa das migrações humanas baseado em análises de DNA mitocondrial humano (a) e Mapa da disperão de HTLV-1 pelo mundo (b).

(a)



Fonte: Adaptado de http://www.mitomap.org/pub/MITOMAP/MitomapFigures/WorldMigrations.pdf

(b)

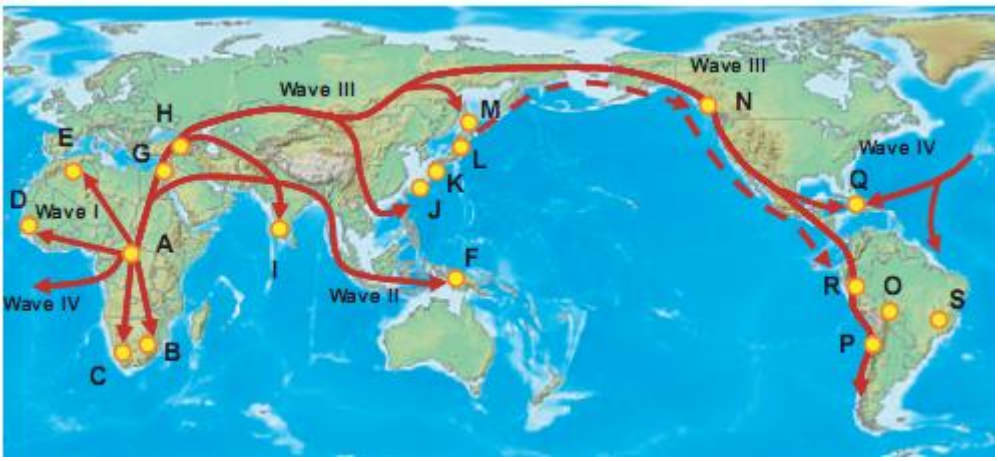


Fig. 5. Transcontinental dispersal of HTLV-1 out of Africa to South America. A–E, African Blacks; F, Melanesians; G, H, Israeli Jews; I, Asian Indians; J–L, Japanese; M, Sakhalin; N–P, Amerindians; Q–S, Caribbean/South American Blacks.

Fonte: Sonoda *et al.*, 2011.

Anexo P - Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de 30 minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de 30 minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de 30 minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até 60 minutos por examinador.

2.2 Tempo máximo total de arguição: 3 horas para o mestrado e 5 horas para o doutorado.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

4.2 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 26 de maio de 2011.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
Presidente da CPG/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091 3621 - Fax (11) 3091 3141 – e-mail: pgfarma@usp.br

Anexo Q - Ficha do aluno (histórico escolar de pós-graduação).

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9136 - 5458841/5 - Mariana Cavalheiro Magri

Email:	marimagri@usp.br
Data de Nascimento:	18/10/1981
Cédula de Identidade:	RG - 30.961.978-6 - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Licenciado em Ciências Biológicas - Pontifícia Universidade Católica de Campinas - São Paulo - Brasil - 2004
Graduação:	Bacharelado em Ciências Biológicas - Pontifícia Universidade Católica de Campinas - São Paulo - Brasil - 2004
Mestrado:	Mestre em Farmácia - Área: Análises Clínicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2008
Curso:	Doutorado
Programa:	Farmácia (Análises Clínicas)
Área:	Análises Clínicas
Data de Matrícula:	06/07/2012
Início da Contagem de Prazo:	09/04/2012
Data Limite:	11/04/2016
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Irene da Silva Soares - 06/07/2012 a 18/06/2013 E.Mail: isoares@usp.br
Coorientador:	Prof(a). Dr(a). Adele Caterino de Araujo - 21/08/2012 até o presente. E.Mail: caterino@usp.br
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Adele Caterino de Araujo - 19/06/2013 até o presente. E.Mail: caterino@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 06/07/2012
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 25/10/2012
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Ingressou no Doutorado em 06/07/2012 Nova Matrícula em 06/07/2012 Matrícula de Acompanhamento em 13/02/2013

Aluno matriculado nas normas vigentes a partir de 01/07/2009

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9136 - 5458841/5 - Mariana Cavalheiro Magri

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
MIP5732-2/2	Introdução à Metodologia de Pesquisa (Fa□uldade de Medi□ina - Universidade de São Paulo) (1)	09/04/2012	10/06/2012	90	6	100	A	N	Con□luída
IMT5124-1/1	SEMINÁRIOS SOBRE VÍRUS PERSISTENTES DE IMPORTÂNCIA EM SAÚDE PÚBLICA (Curso Interunidades: Doenças Tropi□ais e Saúde Interna□ional - Universidade de São Paulo)	06/08/2012	16/09/2012	60	4	88	B	N	Con□luída
FBC5803-2/2	Sistemas da Garantia da Qualidade em Laboratórios Analíti□os	07/08/2012	20/08/2012	30	2	100	A	N	Con□luída
SCS5703-2/1	Metodologia e Divulgação do Artigo Científi□o (Fa□uldade de Saúde Públi□a - Universidade de São Paulo)	10/08/2012	07/12/2012	60	4	100	A	N	Con□luída
Atividade do Programa	Publi□ação do trabalho "LTR point mutations in the Tax-responsive elements of HTLV-1 isolates from HIV/HTLV-1-□oinfe□ted patients", no Virology Journal, v. 9, p. 184-186, Reino Unido, 2012 (2)	04/09/2012	04/09/2012	-	2	0	-	-	-
IMT5123-1/1	Interações entre Endemias em Saúde Interna□ional e suas Consequên□ias Fenotípi□as e Genotípi□as em Populações Humanas (Curso Interunidades: Doenças Tropi□ais e Saúde Interna□ional - Universidade de São Paulo)	01/10/2012	14/10/2012	60	4	100	A	N	Con□luída
Atividade do Programa	Publi□ação do trabalho "Tax gene □hara□terization of human T-Lymphotropi□virus type 1 strains from brazilian HIV □oinfe□ted patients", na Revista Aids Resear□h and Human Retroviruses, v. 28, p. 1775-1778, Estados Unidos, 2012 (3)	01/12/2012	01/12/2012	-	2	0	-	-	-

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	24
Estágios:			
Total:	0	20	24

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Observações:

1) Dis□iplina(s) □ursada(s) isoladamente e a□eita(s) pelo(a) orientador(a) do(a) □andidato(a).

2) Créditos atribuídos de a□ordo □om o disposto no Artigo 65 do Regimento de Pós-Graduação e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 11/12/2012.

Observações:

3) Créditos atribuídos de acordo com o disposto no Artigo 65 do Regimento de Pós-Graduação e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 16/01/2013.

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 13/02/2013

Impresso em: 01/07/13 08:51:34

Anexo R – Currículo Lattes

Mariana Cavalheiro Magri

- **Endereço para acessar este CV:http://lattes.cnpq.br/5119775719591799**

Resumo informado pelo autor

Possui graduação em Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas pela Pontifícia Universidade Católica de Campinas (2003); Aperfeiçoamento em Imunologia no Instituto Adolfo Lutz (IAL) de São Paulo (2004-2006), com bolsa FUNDAP; Mestrado na área de Análises Clínicas pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo - USP, SP (2006-2008), com bolsa CNPq. É aluno de Pós-Graduação, nível doutorado, na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo - USP, SP, recebeu bolsa Capes. Atualmente é Pesquisadora Científica I no LIM 47 – Laboratório de Hepatologia por Vírus do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Desenvolve suas pesquisas no Centro de Imunologia do IAL, no Laboratório de Retrovírus do IAL e no Laboratório de Hepatologia por Vírus do HC-FMUSP. Tem experiência na área de Imunologia, com ênfase em Imunologia Aplicada, atuando principalmente nos seguintes temas: HHV-8 e HTLV-1/2; atualmente na área de Retroviroses Humanas (HIV e HTLV-1/2) e Hepatites Virais voltadas para Biologia Molecular. Recebeu Prêmio de Incentivo em Ciência e Tecnologia para o SUS (1º lugar) - 2006, Menção Honrosa - Prêmio Adolfo Lutz (2º lugar) – 2007, 1º Lugar – Categoria Pôster no II Simpósio do Programa de Aprimoramento Profissional do IAL -2008 e no VII Encontro do Programa de Pós-Graduação em Ciências da CCD-SES/SP - 2010. Participou de dois Projetos de Cooperação Internacional Pró-África (Brasil-Moçambique).
(Texto informado pelo autor)

Dados pessoais

Nome	Mariana Cavalheiro Magri
Nome em citações bibliográficas	MAGRI, M. C.;Magri, Mariana Cavalheiro;Magri, Mariana C.;Magri, Mariana C
Endereço profissional	Faculdade de Medicina - Universidade de Sâo Paulo Av. Dr. Arnaldo 455, Insitituto de Medicina Tropical II, 1º andar, LIM47 Laboratório de Hepatologia por Vírus, Sala 12 Cerqueira César - Sao Paulo 01246-903, SP - Brasil Telefone: 11 30851601 URL da home page: www.lims.fm.usp.br
Endereço eletrônico	E-mail para contato : marimagri@ig.com.br e-mail alternativo : marimagri@usp.br

Formação acadêmica/titulação

2012	Doutorado em Farmácia (Análises Clínicas). Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil Título: Vírus linfotrópico de células T humanas dos tipos 1 e 2 (HTLV-1 2 HTLV-2). Estudos de segmentos do genoma proviral obtidos de pacientes com HIV/Aids de São Paulo e de Londrina e região. Orientador: Adele Caterino de Araujo Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior *Palavras-chave: HTLV-1, HTLV-2, Sequenciamento, Coinfecção HIV-1*
2006 - 2008	Mestrado em Farmácia (Análises Clínicas). Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil Título: Prevalência de anticorpos anti-herpesvírus humano tipo 8 (HHV-8) em soros de pacientes com insuficiência renal crônica, Ano de obtenção: 2008 Orientador: Adele Caterino de Araujo

Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Palavras-chave: Herpesvírus Humano Tipo 8, Insuficiência Renal Crônica, Soroprevalência, Título de Anticorpos, Sarcoma de Kaposi

2004 - 2006 Especialização em Aprimoramento Profissional em Imunologia.
Instituto Adolfo Lutz, IAL, Sao Paulo, Brasil
Título: Pesquisa sa Prevalência de Anticorpos Anti-HHV-8 em Pacientes em Diálise e Fila de Transplante Renal
Orientador: Adele Caterino de Araújo
Bolsista do(a): Fundap

Graduação em Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas.

2000 - 2003 Pontifícia Universidade Católica de Campinas, PUC Campinas, Campinas, Brasil
Título: Imunobiologia dos Aromas: O MHC
Orientador: Irandaia Ubirajara Garcia

Formação complementar

2013 - 2013 Curso de curta duração em EndNoteWeb - Como gerenciar referências bibliográficas.
Faculdade de Saúde Pública - USP, FSP-USP, Brasil

2012 - 2012 Sistemas da Garantia da Qualidade em Laboratórios.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP, FCF-USP, Brasil

2012 - 2012 Introdução à Metodologia de Pesquisa (MIP5732-2/2).
Faculdade de Medicina - Universidade de Sâo Paulo, FM/USP, Brasil

2012 - 2012 Curso de curta duração em Patogênese da Infecção pelo HIV.
Faculdade de Medicina - Universidade de Sâo Paulo, FM/USP, Brasil

2012 - 2012 Seminários Sobre Vírus Persistentes de Importância.
Instituto de Medicina Tropical - Universidade de São Paulo, IMT/USP, Brasil

2012 - 2012 Metodologia e Divulgação do Artigo Científico.
Faculdade de Saúde Pública - USP, FSP-USP, Brasil

2012 - 2012 Interações entre Endemias em Saúde Internacional.
Instituto de Medicina Tropical - Universidade de São Paulo, IMT/USP, Brasil

2011 - 2011 Evolução Viral e Epidemiologia Molecular dos Vírus.
Faculdade de Medicina - Universidade de Sâo Paulo, FM/USP, Brasil

2011 - 2011 Curso de curta duração em Imp.Documentação do Sistema de Gestão da Qualidade.
Instituto Adolfo Lutz, IAL, Sao Paulo, Brasil

2010 - 2010 Programa de Aprimoramento de Ensino – PAE.
Faculdade de Medicina - Universidade de Sâo Paulo, FM/USP, Brasil

2010 - 2010 Uso de Equipamento de Proteção Individual.
Instituto Adolfo Lutz, IAL, Sao Paulo, Brasil

2010 - 2010 Curso de curta duração em Estruturação de Artigos Científicos.
Instituto Adolfo Lutz, IAL, Sao Paulo, Brasil

2009 - 2009 Biologia Molecular Aplicada ao Banco de Sangue.
Instituto de Medicina Tropical - Universidade de São Paulo, IMT/USP, Brasil

2009 - 2009 Genética Básica - BTC5702.
Interunidades em Biotecnologia - Universidade de São Paulo, BIOTECNOLOGIAUSP, Brasil

2009 - 2009 Treinamento: Sistema OpenGene de Genotipagem TRUGE.
Siemens -Pirituba, SIEMENS, Sao Paulo, Brasil
Palavras-chave: HIV, Diagnóstico, terapia antiretroviral, Resistência Viral, Sequenciamento Genético

2009 - 2009 Curso de curta duração em IV Curso Avançado de Patogênese do HIV.
Faculdade de Medicina - Universidade de Sâo Paulo, FM/USP, Brasil

2009 - 2009 Bioinformática na Evolução e Filogenia Molecular.

	Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo, IB-USP, Brasil
2009 - 2009	Pesquisa Aplicada à Infecção por HIV/Aids-MIP5734. Faculdade de Medicina - Universidade de Sâo Paulo, FM/USP, Brasil
2008 - 2008	Seminários Avançados - 1º semestre 2008. Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de estado da Saúde SP, CCD-SES, Brasil *Palavras-chave: Atualização em Ciências*
2008 - 2008	Seminários Avançados - 2º semestre 2008. Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de estado da Saúde SP, CCD-SES, Brasil
2007 - 2007	Curso de curta duração em PCR e PCR em Tempo Real. Life Tecnologies , LIFE TEC, Sao Paulo, Brasil
2007 - 2007	Seminários Avançados - 2º semestre 2007. Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de estado da Saúde SP, CCD-SES, Brasil *Palavras-chave: Atualização em Ciências*
2007 - 2007	Seminários Avançados 1º semestre 2007. Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de estado da Saúde SP, CCD-SES, Brasil
2007 - 2007	Seminários Avançados 2º semestre 2007. Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de estado da Saúde SP, CCD-SES, Brasil *Palavras-chave: Atualização em Ciências*
2006 - 2006	Aprimoramento Didático. Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP, FCF-USP, Brasil
2006 - 2006	Seminários Avançados - 1º semestre 2006. Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de estado da Saúde SP, CCD-SES, Brasil
2006 - 2006	Processos de Invasão Celular. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, FCF-USP, Brasil
2006 - 2006	Seminários em Análises Clínicas II. Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP, FCF-USP, Brasil
2006 - 2006	Estatística Não Paramétrica. Faculdade de Saúde Pública - USP, FSP-USP, Brasil
2006 - 2006	Bioestatística II. Faculdade de Saúde Pública - USP, FSP-USP, Brasil
2006 - 2006	Bioestatística I. Faculdade de Saúde Pública - USP, FSP-USP, Brasil
2006 - 2006	Seminários Avançados 2º semestre 2006. Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de estado da Saúde SP, CCD-SES, Brasil
2005 - 2005	Diagnóstico Laboratorial das Retroviroses Humanas. Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP, FCF-USP, Brasil
2005 - 2005	Curso de curta duração em Treinamento em Bases de Dados. Biblioteca do Conjunto das Químicas - USP (SP), USP, Brasil *Palavras-chave: Artigos científicos*
2004 - 2004	Curso de curta duração em Curso de Capacitação em Biossegurança Laboratorial. Instituto Adolfo Lutz, IAL, Sao Paulo, Brasil *Palavras-chave: Biossegurança*
2004 - 2004	Aspéctos Soroepidemiológicos- Doenças Infecciosas. Coordenadoria de Controle de Doenças - Secretaria de Estado da Saúde SP, CCD-SES, Brasil
2004 - 2004	Curso de curta duração em Interpretação e Implementação Norma NBR/IEC 17025.

	Instituto Adolfo Lutz, IAL, Sao Paulo, Brasil *Palavras-chave: Qualidade, Laboratório*
2003 - 2003	Extensão universitária em Estágio Supervisionado em Biologia (licenciatura). Colégio Barão Geraldo de Rezende, CBGR, Brasil
2003 - 2003	Extensão universitária em Estágio: Instituto de Biologia, Lab. de Imunologia. Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil
2002 - 2002	Extensão universitária em Estágio Supervisionado em Ciências (licenciatura). Colégio Madre Cecília, CMC, Brasil
2001 - 2001	Extensão universitária em Estágio: Instituto de Zoologia, Lab. Primatas. Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, Brasil *Palavras-chave: Mamíferos, Primatas, Comportamento animal*
2001 - 2001	Extensão universitária em Estágio: Manejo de Animais Marinhos e de Água Doce. Aquário Municipal de Santos, AMS, Brasil
2000 - 2001	Extensão universitária em Estágio: Laboratório de Fitopatologia. Instituto Biológico de Campinas, IB-CAMPINAS, Brasil *Palavras-chave: Micologia, Fitopatologia*

Atuação profissional

1. Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo - FM/USP

Vínculo Institucional

2012 - Atual	Vínculo: Servidor público , Enquadramento funcional: Pesquisador Científico I , Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva

Atividades

04/2012 - Atual	Pesquisa e Desenvolvimento, Laboratório de Hepatologia por Vírus - LIM 47 *Linhas de pesquisa:* *Pesquisa e desenvolvimento em biologia molecular em hepatites virais.*

2. Centro Universitário Senac - SENAC/SP

Vínculo institucional

2010 - 2010	Vínculo: Prestação de Serviço: Docência , Enquadramento funcional: Docente , Carga horária: 10, Regime: Parcial Outras informações: Docente da Disciplina: Agentes Biológicos Curso: Pós-Graduação em Higiene Ocupacional Senac Jabaquara

3. Universidade de São Paulo - USP

Vínculo institucional

2008 - Atual	Vínculo: Aluno de Doutorado , Enquadramento funcional: Aluno de Doutorado, Regime: Parcial Outras informações: Aluno de Doutorado da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP, na Área de

	Análises Clínicas. Tese intitulada: "Vírus linfotrópico de células T humanas dos tipos 1 e 2 (HTLV-1 E HTLV-2). Estudos de segmentos do genoma proviral obtidos de pacientes com HIV/Aids de São Paulo e de Londrina e região", sob orientação da Profa Dra Adele Caterino de Araujo. Vínculo: Aluno de Mestrado , Enquadramento funcional: Aluno de Mestrado, Regime: Parcial Outras informações:
2006 - 2008	Aluno de Mestrado da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP, na Área de Análises Clínicas. Dissertação intitulada: "Prevalência de anticorpos anti-herpesvírus humano tipo 8 (HHV-8) em soros de pacientes com insuficiência renal crônica", sob orientação da Profa Dra Adele Caterino de Araujo.

Atividades

03/2006 - 2008	Pesquisa e Desenvolvimento, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas *Linhas de pesquisa:* *Identificação, caracterização e estudo da resposta imune ao Herpesvírus Humano tipo 8 e (HHV-8) e as Retoviroses Humanas (HIV e HTLV-1/2)*
03/2006 - 07/2008	Extensão Universitária, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas *Especificação:* *Mestrado*

4. Instituto Adolfo Lutz - IAL

Vínculo institucional

	Vínculo: Aluno de Doutorado , Enquadramento funcional: Aluno de Doutorado , Carga horária: 40, Regime: Integral Outras informações:
2008 - Atual	Desenvolvimento da parte experimental do meu projeto de Doutorado (Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP, Área de Análises Clínicas) intitulado "Vírus linfotrópico de células T humanas dos tipos 1 e 2 (HTLV-1 e HTLV-2). Estudos de segmentos do genoma proviral obtidos de pacientes com HIV/Aids de São Paulo e de Londrina e região", sob orientação da Profa Dra Adele Caterino de Araujo. Sendo realizado na Seção de Imunologia do Serviço de Microbiologia e Imunologia, e no Laboratório de Retrovírus (Genotipagem do HIV) do Serviço de Virologia, IAL.
	Vínculo: Aluno , Enquadramento funcional: Aluno de Mestrado , Carga horária: 40, Regime: Integral
2006 - 2008	Desenvolvimento da parte experimental do meu projeto de mestrado (Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP, Área de Análises Clínicas) intitulado "Prevalência de anticorpos anti-herpesvírus humano tipo 8 (HHV-8) em soros de pacientes com insuficiência renal crônical", sob orientação da Profa Dra Adele Caterino de Araujo.
2004 - 2006	Vínculo: Aprimorando , Enquadramento funcional: Bolsista de Aprimoramento Profissional , Carga horária: 40, Regime: Integral

Atividades

03/2004 - Atual	Pesquisa e Desenvolvimento, Secretaria do Estado da Saúde de São Paulo, Governo do Estado de São Paulo *Linhas de pesquisa:*

Caracterização de microorganismos e desenvolvimento tecnológico em Saúde Pública: Aspectos imunoquímicos, imunobiológicos e moleculares

03/2004 - 02/2006 Estágio, Secretaria do Estado da Saúde de São Paulo, Governo do Estado de São Paulo

Estágio:
Aprimoramento teórico e prático em Imunologia: ênfase em HHV-8 e HTLV

Linhas de pesquisa

1. Caracterização de microorganismos e desenvolvimento tecnológico em Saúde Pública: Aspectos imunoquímicos, imunobiológicos e moleculares
2. Identificação, caracterização e estudo da resposta imune ao Herpesvírus Humano tipo 8 e (HHV-8) e as Retoviroses Humanas (HIV e HTLV-1/2)
3. Pesquisa e desenvolvimento em biologia molecular em hepatites virais.

Áreas de atuação

1. Genética Molecular e de Microorganismos
2. Epidemiologia
3. Microbiologia Médica
4. Imunologia Aplicada

Projetos

Projetos de pesquisa

2007 - 2010 Estudo de infecção por herpesvírus humano tipo 8 (HHV-8) em Moçambique, África (Auxílio a Pesquisa).

Descrição: O presente estudo objetiva determinar a prevalência de infecção por HHV-8 em Moçambique, utilizando a pesquisa de anticorpos específicos em amostras de soro de indivíduos de três regiões geográficas (norte, central e sul). Projeto de pesquisa aprovado no Edital do MCTCNPq 06/2007 Auxílio a Pesquisa PRÓ-ÁFRICA, número do projeto 490452/2007-8. Cooperação Internacional Brasil/Moçambique. Montante R$ 50.000,00
Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa
Alunos envolvidos: Especialização (1); Doutorado (1);
Integrantes: Mariana Cavalheiro Magri Elizabeth de los SantosFortuna; Adele Caterino de Araujo (Responsável); Joyce Matie Kinoshita da Silva; Rosana Del Bianco; Rolanda Carmem Rafael Manuel
Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq, Centro de Referência e Treinamento em DST/AIDS do Estado de São Paulo-CRT-DST/AIDS, Hospital Central de Maputo-HCM, Instituto Adolfo Lutz-IAL
Número de produções C,T & A: 7/

2006 - 2007 Estudo de infecção por herpesvírus humano tipo 8 (HHV-8)em Moçambique, África (Missão Exploratória).

Descrição: Participação em projeto aprovado pelo CNPq Edital Pró-África nº 15/2006. Número do processo CNPq 490179/2006-1. Cooperação internacional Brasil/Moçambique.
Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa
Alunos envolvidos: Especialização (1); Mestrado acadêmico (2);
Integrantes: Mariana Cavalheiro Magri Elizabeth de los SantosFortuna; Adele Caterino de Araujo (Responsável); Joyce Matie Kinoshita da Silva; Rosana Del Bianco; Fabricio Jacob; Rolanda Carmem Rafael Manuel
Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq

Número de produções C,T & A: 4/

Projetos de desenvolvimento tecnológico

2007 - Atual

Avaliação de Novo Algoritmo de Testes Laboratoriais a Ser Usado no Diagnóstico de Infecção por HTLV-1 e HTLV-2 no Instituto Adolfo Lutz de São Paulo

Descrição: Introdução da técnica de PCR para pesquisa de segmentos do genoma dos HTLVs (regiões tax e pol) como teste confirmatório de infecção por HTLV-1 e HTLV-2 e comparação com a técnica de WB.
Situação: Em andamento Natureza: Projetos de desenvolvimento tecnológico
Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (1); Doutorado (1);
Integrantes: Mariana Cavalheiro Magri (Responsável); Adele Caterino de Araujo; Costa, Emanuela Avelar Silva
Financiador(es): Instituto Adolfo Lutz-IAL
Número de produções C,T & A: 10/

Projeto de extensão

2008 - Atual

Tese de Doutorado: Vírus linfotrópico de células T humanas dos tipos 1 e 2 (HTLV-1 E HTLV-2). Estudos de segmentos do genoma proviral obtidos de pacientes com HIV/Aids de São Paulo e de Londrina e região.

Descrição: Realizar estudo de epidemiologia molecular de HTLV-1 e HTLV-2 em pacientes coinfectados pelo HIV-1 de Londrina e região e de São Paulo. Sequenciamento das regiões LTR, env e tax do genoma proviral do HTLV-1 e do HTLV-2. Edital Universal, MCT/CNPq Projeto 481040/2007-2, Montante R$ 16.000,00.
Situação: Em andamento Natureza: Projeto de extensão
Alunos envolvidos: Doutorado (1);
Integrantes: Mariana Cavalheiro Magri Adele Caterino de Araujo (Responsável); Luis Fernando de Macedo Brígido; Rosangela Rodrigues; Helena Kaminami Morimoto
Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES

2006 - 2008

Tese de Mestrado: Prevalência de anticorpos anti-herpesvírus humano tipo 8 (HHV-8) em pacientes com insuficiência renal crônica

Descrição: A infecção pelo herpesvírus humano tipo 8 (HHV-8) tem sido associada ao sarcoma de Kaposi (SK) iatrogênico, que acomete pacientes imunossuprimidos e/ou transplantados renais. Em populações consideradas saudáveis, a soroprevalência para o HHV-8 varia de 1% a 8%. O presente trabalho buscou: determinar a prevalência e os títulos de anticorpos anti-HHV-8 em pacientes com insuficiência renal crônica (IRC), submetidos ou não à terapia renal substitutiva (TRS) do Hospital do Rim e Hipertensão e Casa da Diálise da UNIFESP e da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo e, comparar os resultados obtidos com outras populações da mesma região geográfica, porém de outras categorias de risco para adquirir doenças infecciosas. Soros de 805 pacientes: 295 em hemodiálise, 54 em diálise peritoneal e 456 em acompanhamento ambulatorial, sem TRS, foram testados quanto à presença de anticorpos anti-HHV-8, de fase latente e lítica da replicação viral, por meio de técnicas de imunofluorescência indireta (IFI) LANA e Lítico, padronizadas na Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz. Os resultados obtidos foram analisados em relação a dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais usando o teste do qui-quadrado ou exato de Fisher para as variáveis categóricas e os testes de Mann Whitney ou Kruskal Wallis para as variáveis contínuas. Foi encontrada soropositividade ao HHV-8 em 18,0% dos pacientes com IRC, dos quais 18,3% nos pacientes em TRS e 17,7% nos pacientes sem TRS,

não havendo diferença significante entre os grupos. As variáveis que estiveram relacionadas à sorologia positiva ao HHV-8 foram: transplante prévio (p<0,001) e doenças sexualmente transmissíveis (p=0,003), com destaque para a sífilis (p=0,021). As demais variáveis não mostraram associação estatística embora tenha havido maior número de amostras HHV-8 soropositivas com o avançar da idade. Em relação ao tipo e ao título de anticorpos detectados, houve mais amostras com sorologia positiva para anticorpos Lítico e maiores títu
Situação: Concluído Natureza: Projeto de extensão
Alunos envolvidos: Graduação (0); Especialização (0); Mestrado acadêmico (1); Mestrado profissionalizante (0); Doutorado (0);
Integrantes: Mariana Cavalheiro Magri Elizabeth de Los Santos Fortuna; Pedro Jabur; José Ferraz de Souza; Sergio Antonio Draibe; Maria Eugênia Fernandes Canziani; Adele Caterino de Araujo (Responsável)
Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq, Instituto Adolfo Lutz-IAL
Número de produções C,T & A: 8/

2004 - 2006

Monografia: Pesquisa da Prevalência de Anticorpos Anti-HHV-8 em Pacientes em Diálise e em Fila de Transplante Renal

Descrição: Introdução: Desde a descoberta do herpesvírus humano 8 (HHV-8) como agente etiológico de todas as formas de Sarcoma de Kaposi (SK), vários estudos vêm sendo conduzidos para determinar populações de risco para adquirir e/ou transmitir esta infecção viral. Até a presente data não foi demonstrada transmissão do HHV-8 pela hemodiálise, embora alguns estudos tenham apontado o sangue como provável veículo de transmissão viral. O SK iatrogênico é uma variante clínico-epidemiológica do SK que acomete indivíduos sob terapia corticosteróide ou imunossupressora, principalmente pós-transplante renal. Objetivo: Determinar a presença de infecção pelo HHV-8 em Unidade de Diálise de São Paulo. Casuística e Método: Setenta pacientes em hemodiálise na Santa Casa de Misericórdia de São Paulo tiveram seus soros testados quanto à presença de anticorpos dirigidos a antígenos de fase lítica e latente da infecção por HHV-8, usando a técnica de imunofluorescência indireta (IFI) padronizada no Instituto Adolfo Lutz de São Paulo. Foram avaliados dados demográficos, número de transfusões sangüíneas e de transplantes renais. A pesquisa foi aprovada pelos Comitês de Ética das Instituições envolvidas e obtidos os consentimentos informados dos pacientes. Resultados: A população compreendeu 40 homens e 30 mulheres com idade variando entre 9 e 82 anos. A sorologia para o HHV-8 resultou reagente em 16 casos (22,9%): 5 soros resultaram positivos para anticorpos contra antígenos de fase latente viral, 8 para anticorpos contra antígenos de fase lítica viral e 3 para anticorpos de ambas as fases de replicação viral. Comparando-se os resultados obtidos nos 16 casos HHV-8 soropositivos e a população total, foi observado maior número de casos de infecção pelo HHV-8 na raça parda/negra (68,8%), em poli-transfundidos (75%) e transplantados renais (56,3%). Conclusões: Os resultados obtidos mostram percentual elevado de infecção por HHV-8 em pacientes em hemodiálise de São Paulo. Ressaltam que transfusões..
Situação: Concluído Natureza: Projeto de extensão
Alunos envolvidos: Especialização (1);
Integrantes: Mariana Cavalheiro Magri Elizabeth de los SantosFortuna; Pedro Jabur; J F Souza; Y A S Sens; Adele Caterino de Araujo (Responsável)
Número de produções C,T & A: 6/

Idiomas

Inglês Compreende Bem , Fala Razoavelmente , Escreve Bem , Lê Bem

Prêmios e títulos

2010	1º Lugar na Categoria Poster: VII Encontro da Pós-Graduação em Ciências da CCD-SES/SP, Coordenadoria de Controle de Doenças - SES/SP
2008	Prêmio: 1º Lugar pela Apresentação em Pôster no II Simpósio do Programa de Aprimoramento Profissional do Instituto Adolfo Lutz, Instituto Adolfo Lutz
2007	Menção Honrrosa - Prêmio Adolfo Lutz (2º lugar), Instituto Adolfo Lutz
2006	Prêmio de Incentivo em Ciência e Tecnologia para o SUS (1º lugar) - 2006, Ministério da Saúde - Brasil

Producão

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. CATERINO-DE-ARAUJO, Adele, **Magri, Mariana Cavalheiro**, Sato, N.S., MORIMOTO, H. K., BRIGIDO, L. F. M., Morimoto. A.A.
Inability to Detect Human T Cell Lymphotropic Virus Type 2-Specific Antibodies in a Patient Coinfected with HIV-1, Human T Cell Lymphotropic Virus Type 1, Human T Cell Lymphotropic Virus Type 2, and Hepatitis C Virus. AIDS Research and Human Retroviruses. v.29, p -, 2013, *[doi: 10.1089/aid.2013.0158].*

2. **Magri, Mariana Cavalheiro**, BRIGIDO, L. F. M., MORIMOTO, H. K., Ferreira, J.L.P., CATERINO-DE-ARAUJO, Adele.
HTLV type 2a strains among HIV-1-coinfected patients from Brazil have originated mostly from Brazilian Amerindians. . AIDS Research and Human Retroviruses. JCR, v.29, p.1010 - 1018, 2013. *[doi: 10.1089/AID.2013.0014].*

3. doi **Magri, Mariana C**, Costa, Emanuela AS, CATERINO-DE-ARAUJO, Adele
LTR point mutations in the Tax-responsive elements of HTLV-1 isolates from HIV/HTLV-1-coinfected patients. Virology Journal. JCR, v.9, p.184 - , 2012.
[doi:10.1186/1743-422x-9-184]

4. doi **Magri, Mariana Cavalheiro**, BRIGIDO, L. F. M., Rodrigues, R., MORIMOTO, H. K., Ferreira, J.L.P., CATERINO-DE-ARAUJO, Adele
Phylogenetic and Similarity Analysis of HTLV-1 Isolates from HIV-Coinfected Patients from the South and Southeast Regions of Brazil. AIDS Research and Human Retroviruses. JCR, v.28, p.110 - 114, 2012.
doi:10.1089/aid.2011.0117]

5. doi **Magri, Mariana Cavalheiro**, Brigido, Luis Fernando Macedo, Rodrigues, Rosangela, Morimoto, Helena Kaminami, CATERINO-DE-ARAUJO, Adele
Tax gene characterization of HTLV-1 strains from Brazilian HIV-coinfected patients. AIDS Research and Human Retroviruses. JCR, v.28, p.120326204318001 - , 2012.
[doi:10.1089/aid.2011.0389]

6. doi CATERINO-DE-ARAUJO, Adele, **Magri, Mariana Cavalheiro**, Costa, Emanuela Avelar Silva, Manuel, Rolanda Carmen Rafael
Human T-Lymphotropic Virus Type 1 Infection in a Patient with Arthritis in Mozambique: Molecular Characterization of Human T-Lymphotropic Virus Type 1 Isolate. AIDS Research and Human Retroviruses. JCR, p.110520143932045 - , 2011.

7. doi Costa, Emanuela A.S., **Magri, Mariana C.**, CATERINO-DE-ARAUJO, Adele
The best algorithm to confirm the diagnosis of HTLV-1 and HTLV-2 in at-risk individuals from São Paulo, Brazil. Journal of Virological Methods. JCR, p.280 - 286, 2011.

8. doi **MAGRI, M. C.**, Morimoto, Helena Kaminami, BRIGIDO, L. F. M., Rodrigues, Rosangela, CATERINO-DE-ARAUJO, Adele
Long Terminal Repeat Sequence Analysis of HTLV-2 Molecular Variants Identified in Southern Brazil. AIDS Research and Human Retroviruses. JCR, v.26, p.1327 - 1331, 2010.
[doi:10.1089/aid.2010.0121]

9. doi CATERINO-DE-ARAUJO, Adele, **Magri, Mariana Cavalheiro**, Manuel, Rolanda Carmen Rafael
Patterns of antibodies against latent and lytic antigens of human herpesvirus 8 in an endemic population and patients with Kaposi's sarcoma in Mozambique. Journal of Medical Virology (Print). JCR, v.82, p.1576 - 1581, 2010.

10. CATERINO-DE-ARAUJO, Adele, MAGRI, M. C., Costa, Emanuela Avelar Silva, Manuel, Rolanda Carmen Rafael
Prevalence of Human T-Cell Lymphotropic Virus (HTLV-1/2) in Individuals from Public Health Centers in Mozambique. AIDS Research and Human Retroviruses. JCR, v.26, p.559 - 561, 2010.

11. CATERINO-DE-ARAUJO, Adele, Manuel, Rolanda Carmen Rafael, Del Bianco, Rosana, Santos-Fortuna, Elizabeth, **Magri, Mariana Cavalheiro**, Silva, Joyce Matie Kinoshita, Bastos, R.
Seroprevalence of human herpesvirus 8 infection in individuals from health care centers in Mozambique: Potential for endemic and epidemic Kaposi's sarcoma. Journal of Medical Virology (Print). JCR, v.82, p.1216 - 1223, 2010.

12. MAGRI, M. C., CARBONE, P. H. L., SANTOS-FORTUNA, Elizabeth de Los, CATERINO-DE-ARAUJO, Adele
A comparative study of the frequency of antibody and titers against human herpesvirus 8 latent and lytic antigens in at-risk individuals and among patients with Kaposi's sarcoma. Journal of Medical Virology (Print). JCR, v.81, p.1292 - 1297, 2009.

13. JACOB, F., MAGRI, M. C., Costa, E.A.S., SANTOS-FORTUNA, Elizabeth de Los, CATERINO-DE-ARAUJO, Adele
Comparison of signal-to-cutoff values in first, second, and third generation enzyme immunoassays for the diagnosis of HTLV-1/2 infection in “at-risk” individuals from São Paulo, Brazil. Journal of Virological Methods. JCR, v.159, p.288 - 290, 2009.

14. MAGRI, M. C., CANZIANI, Maria Eugênia Fernandes, DRAIBE, Sergio Antonio, SANTOS-FORTUNA, Elizabeth de Los, CATERINO-DE-ARAUJO, Adele
Confirming high prevalence of human herpesvirus 8 infection in chronic kidney disease patients from São Paulo, Brazil. NDT Plus. , v.1, p.93 - 94, 2009.

15. CATERINO-DE-ARAUJO, Adele, MANUEL, R. C. R., BIANCO, R., SANTOS-FORTUNA, Elizabeth de Los, **MAGRI, M. C.**, SILVA, J. M. K., BASTOS, R.
First survey for detecting the presence of human herpesvirus 8 infection (HHV-8) in Maputo, Mozambique. The Brazilian Journal of Infectious Diseases. JCR, v.13, p.200 - 202, 2009.

16. CATERINO-DE-ARAUJO, Adele, MAGRI, M. C., SANTOS-FORTUNA, Elizabeth de Los, SOUZA, José Ferraz de, SENS, Ivoty Alves dos Santos, JABUR, Pedro
Human Herpesvirus 8 Infection in Hemodialysis Patients from São Paulo, Brazil: Preliminary Results. Transplantation Proceedings. JCR, v.39, p.3044 - 3046, 2007.

17. CATERINO-DE-ARAUJO, Adele, SANTOS-FORTUNA, Elizabeth de Los, MAGRI, M. C., SCHUELTER-TREVISOL, F, SILVA, Marcos Vinícius da
Latent Human Herpesvirus - 8 (HHV-8) Infection in Female Commercial Sex Workers from Imbituba, Santa Catarina, Brazil. The Brazilian Journal of Infectious Diseases. JCR, v.11, p.9 - 11, 2007.

18. SILVA, J. M. K., MAGRI, M. C., JACOB, F., SANTOS-FORTUNA, Elizabeth de Los, CATERINO-DE-ARAUJO, Adele
Otimização e avaliação do ensaio de imunofluorescência indireta para pesquisa de anticorpos anti-herpesvírus 8 (HHV-8) usando sangue colhido em papel de filtro. Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso). , v.66, p.68 - 72, 2007.
[http://www.ial.sp.gov.br]

19. MAGRI, M. C., CATERINO-DE-ARAUJO, Adele
Pesquisa da Prevalência de Anticorpos Anti-HHV-8 em Pacientes em Diálise e em Fila de Transplante Renal. BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista (Online). , v.36, p.2 - , 2006.
[http://www.cve.saude.sp.gov.br]

20. CATERINO-DE-ARAUJO, Adele, SANTOS-FORTUNA, Elizabeth de Los, MAGRI, M. C., SHUELTER-TREVISOL, F, SILVA, Marcos Vinícius da
Unpredicted HTLV-1 infection in female sex worker from Imbituba, Santa Catarina. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (Impresso). JCR, v.48, p.237 - 238, 2006.

21. MAGRI, M. C., CATERINO-DE-ARAUJO, Adele
The Role of the Major Histocompatibility Complex in the Immunobiology of Self Aromas. Revista de Neurociências (EPM. Impresso). , v.13, p.196 - 200, 2005.
[http://www.unifesp.br/dneuro/neurociencias]

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. Costa, E.A.S., **MAGRI, M. C.**, CATERINO-DE-ARAUJO, A
Comparision of western blotting and PCR assays for confirming HTLV-1 and HTLV-2 infections in at-risk individuals from São Paulo, Brazil In: XI Simpósio International Sobre HTLV no Brasil, 2011, Olinda - PE.
Revista Ciências Médicas de Pernambuco - XI SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE HTLV NO BRASIL - ANAIS. , 2011. v.7. p.35

2. **MAGRI, M. C.**, MORIMOTO, H. K., Ferreira, J.L.P., RODRIGUES, R., BRIGIDO, L. F. M., CATERINO-DE-ARAUJO, A
Molecular and epidemiological characterization of HTLV-2 isolates from HIV coinfected patients from Paraná and São Paulo In: XI Simpósio International Sobre HTLV no Brasil, 2011, Olinda- PE.
Revista Ciências Médicas de Pernambuco - XI SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE HTLV NO BRASIL - ANAIS. , 2011. v.7. p.6

3. doi> **Magri, Mariana Cavalheiro**, Morimoto, Helena K, Ferreira, João L P, Rodrigues, Rosangela, Brigido, Luis F M, CATERINO-DE-ARAUJO, Adele
Phylogenetic and similarity analysis of HTLV-1 isolates from HIV-coinfected patients from the South and Southeast regions of Brazil In: 15th International Conference on Human Retrovirology – HTLV and Related Viruses, 2011, Leuven - Bélgica.
Retrovirology. Inglaterra: BioMed Central, 2011. v.8. p.A68

4. doi> CATERINO-DE-ARAUJO, Adele, **Magri, Mariana Cavalheiro**, Costa, Emanuela A S, Manuel, Rolanda C R
Prevalence of HTLV-1/2 and HIV-1/2 in individuals attending Public Health Center in Mozambique. One HTLV-1 symptomatic case report In: 15th International Conference on Human Retrovirology – HTLV and Related Viruses, 2011, Leuven - Bélgica.
Retrovirology. Inglaterra: BioMed Central, 2011. v.8. p.A69

5. CATERINO-DE-ARAUJO, Adele, MANUEL, R. C. R., BIANCO, R., SANTOS-FORTUNA, Elizabeth de Los, **MAGRI, M. C.**, SILVA, J. M. K., BASTOS, R.
Risk of an outbreak of Kaposi s sarcoma associated with HIV/AIDS in Mozambique In: 14th International Congress on Infectious Diseases, Miami.
Int J Infect Dis. , 2010. v.14. p.78.016

6. JACOB, F., **MAGRI, M. C.**, SANTOS-FORTUNA, Elizabeth de Los, CATERINO-DE-ARAUJO, Adele
Avaliação do Valor da Relação Densidade Óptica/Cut-Off nos Ensaios Imunoenzimáticos para Infecção pelo HTLV-1/2 In: VIII Encontro do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, 2009, São Paulo.
VIII Encontro do Instituto Adolfo Lutz. , 2009. p.BM 32

7. **MAGRI, M. C.**, Souza, L.O., Cavalcanti, J.S., Batista, J.P.G., RODRIGUES, R., BRIGIDO, L. F. M.
Diversidade Genética do HIV em Amostras Encaminhadas para Teste de Resistência no Instituto Adolfo Lutz de São Paulo In: VIII Encontro do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, 2009, São Paulo.
VIII Encontro do Instituto Adolfo Lutz. , 2009.

8. Costa, E.A.S., JACOB, F., FELICIANO, R., **MAGRI, M. C.**, SANTOS-FORTUNA, Elizabeth de Los, CATERINO-DE-ARAUJO, Adele
Evaluation Of A New Algorithm For The Diagnosis Of HTLV-1 And HTLV-2 In At-Risk Population From São Paulo, Brazil In: VIII Encontro do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, 2009, São Paulo.
VIII Encontro do Instituto Adolfo Lutz. , 2009. p.BM 85

9. Costa, E.A.S., JACOB, F., FELICIANO, R., MAGRI, M. C., SANTOS-FORTUNA, E, CATERINO-DE-ARAUJO, A
Evaluation Of A New Algorithm For The Diagnosis Of Htlv-1 And Htlv-2 In At-Risk Population From São Paulo, Brazil In: 14th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Retroviruses, 2009, Salvador.
14th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Retroviruses - Abstract Book. Salvador: , 2009. v.1.

10. Batista, J.P.G., MAGRI, M. C., Cavalcanti, J.S., Ferreira, J.L.P., RODRIGUES, R., CAMPOS, N. C., Brígido, L.F.M.
HIV-1 Pol Gene Molecular Evolution From Patients Failling Antiretroviral Therapy At São Paulo – SP In: VIII Simpósio de Pesquisa em AIDS - SIMPAIDS, 2009, Rio de Janeiro.
VIII Simpósio de Pesquisa em AIDS - SIMPAIDS - Livro de Resumos. , 2009. v.1. p.60 - 60

11. **MAGRI, M. C.**, Batista, J.P.G., Ferreira, J.L.P., MORIMOTO, H. K., RODRIGUES, R., BRIGIDO, L. F. M., CATERINO-DE-ARAUJO, Adele
Molecular Characterization of HTLV-2 LTR Genomic Region in Isolates from the South and Southeast Regions of Brazil In: VIII Encontro do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, 2009, São Paulo.
VIII Encontro do Instituto Adolfo Lutz. , 2009. p.BM 121

12. Batista, J.P.G., Ferreira, J.L.P., SIQUEIRA, A. F. A., MAGRI, M. C., ZAPAROLI, M., RODRIGUES, R., Brígido, L.F.M.
Molecular Characterizaton Of GP41 Region From HIV-1 Env Gene In: VIII Simpósio de Pesquisa em AIDS - SIMPAIDS, 2009, Rio de Janeiro.
VIII Simpósio de Pesquisa em AIDS - SIMPAIDS - Livro de Resumos. , 2009. v.1. p.59 - 59

13. MAGRI, M. C., MORIMOTO, H. K., Batista, J.P.G., Ferreira, J.L.P., SIQUEIRA, A. F. A., RODRIGUES, R., Brígido, L.F.M., CATERINO-DE-ARAUJO, A
Nucleotide Sequence And Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis Of The Long Terminal Repeat Of HTLV-2 Isolates From The South And Southeast Regions Of Brazil In: 14th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Retroviruses, 2009, Salvador.
14th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Retroviruses - Abstract Book. Salvador: , 2009. v.1.

14. **MAGRI, M. C.**, MORIMOTO, H. K., Batista, J.P.G., Ferreira, J.L.P., SIQUEIRA, A. F. A., RODRIGUES, R., BRIGIDO, L. F. M., CATERINO-DE-ARAUJO, Adele
Nucleotide Sequence and Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the Long Terminal Repeat of HTLV-2 Isolates From the South and Southeast Regions of Brazil In: VIII Encontro do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, 2009, São Paulo.
VIII Encontro do Instituto Adolfo Lutz. , 2009. p.BM 128

15. **MAGRI, M. C.**, CANZIANI, Maria Eugênia Fernandes, DRAIBE, Sergio Antonio, JABUR, Pedro, SANTOS-FORTUNA, Elizabeth de Los, CATERINO-DE-ARAUJO, Adele
Prevalence of Human Herpesvirus-8 (HHV-8) Antibodies in Serum Samples from Chronic Kidney Disease Patients, with or without Substitutive Kidney Therapy, Compared to Others Populations In: VIII Encontro do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, 2009, São Paulo.
VIII Encontro do Instituto Adolfo Lutz. , 2009. p.BM 155

16. CATERINO-DE-ARAUJO, Adele, MANUEL, R. C. R., BIANCO, R., SANTOS-FORTUNA, Elizabeth de Los, **MAGRI, M. C.**, SILVA, J. M. K., BASTOS, R.
Survey for the Presence of Human Herpesvirus 8 (HHV-8) Infections em Mozambique In: VIII Encontro do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, 2009, São Paulo.
VIII Encontro do Instituto Adolfo Lutz. , 2009. p.p. BM 181

17. MAGRI, M. C., Souza, L.O., Cavalcanti, J.S., Batista, J.P.G., Rodrigues, R., Brígido, L.F.M.
Diversidade Genética do HIV em Amostras Encaminhadas para Teste de Resistência no Instituto Adolfo Lutz de São Paulo In: VII Congresso da SBDST e III Congresso Brasileiro de AIDS, 2008, Goiânia.
Journal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis. Rio de Janeiro: Editora da Universidade Federal Fluminense, 2008. v.20. p.211 - 211

18. JACOB, F., MAGRI, M. C., SANTOS-FORTUNA, Elizabeth de Los, CATERINO-DE-ARAUJO, Adele
Does the high optical density/cutt-off value in enzime immunoassays means HTLV-1/2 truly infection? In: X Simpósio Internacional sobre HTLV no Brasil, 2008, Rio de Janeiro.
The Brazilian Journal of Infectious Diseases. Salvador - Bahia: CONTEXTO, 2008. v.12. p.24 - 24

19. JACOB, F., MAGRI, M. C., SILVA, J. M. K., SANTOS-FORTUNA, Elizabeth de Los, CATERINO-DE-ARAUJO, Adele
Ensaio de imunofluorescência indireta para pesquisa de anticorpos anti-herpesvírus humano 8 (HHV-8) usando eluato de sangue colhido em papel de filtro In: II Simpósio do Programa de Aprimoramento Profissional do Instituto Adolfo Lutz, 2008, São Paulo.
CD-ROM do II Simpósio do Programa de Aprimoramento Profissional do Instituto Adolfo Lutz. , 2008.

20. CATERINO-DE-ARAUJO, Adele, MANUEL, R. C. R., BIANCO, R., SANTOS-FORTUNA, Elizabeth de Los, MAGRI, M. C., SILVA, J. M. K., BASTOS, R.
International cooperation between Brasil and Mozambique first survey on human herpesvirus 8 (HHV-8) infection In: 2º Congresso da CPLP sobre DST-AIDS, 2008, Rio de Janeiro.

2º Congresso da CPLP (Comunidade dos Países de Língua Portuguesa) sobre DST-AIDS. , 2008. v.1. p.67 - 67

21. MAGRI, M. C., Batista, J.P.G., Ferreira, J.L.P., MORIMOTO, H. K., RODRIGUES, R., BRIGIDO, L. F. M., CATERINO-DE-ARAUJO, Adele
Molecular Characterization of HTLV-2 LTR Genomic Region in Isolates from the South and Southeast Regions of Brazil In: XIX National Meeting of Virology, 2008, Caxambu.
Virus Reviews & Research. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2008. v.13. p.242 - 242

22. MAGRI, M. C., CANZIANI, Maria Eugênia Fernandes, DRAIBE, Sergio Antonio, JABUR, Pedro, SANTOS-FORTUNA, Elizabeth de Los, CATERINO-DE-ARAUJO, Adele
Prevalence of Human Herpesvirus-8 (HHV-8) Antibodies in Serum Samples from Chronic Kidney Disease Patients, with or without Substitutive Kidney Therapy, Compared to Others Populations In: XIX National Meeting of Virology, 2008, Caxambu.
Virus Reviews & Research. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2008. v.13. p.227 - 228

23. MAGRI, M. C., CANZIANI, Maria Eugênia Fernandes, DRAIBE, Sergio Antonio, JABUR, Pedro, SANTOS-FORTUNA, Elizabeth de Los, CATERINO-DE-ARAUJO, Adele
Prevalence of Human Herpesvirus-8 (HHV-8) Antibodies in Serum Samples from Chronic Kidney Disease Patients, with or without Substitutive Kidney Therapy, Compared to Others Populations In: XXXIII Congress of the Brazilian Society for Immunology, 2008, Ribeirão Preto.
Oficial Program IMMUNO RIB2008. , 2008. p.CL001

24. CATERINO-DE-ARAUJO, Adele, MANUEL, R. C. R., BIANCO, R., SANTOS-FORTUNA, Elizabeth de Los, MAGRI, M. C., SILVA, J. M. K., BASTOS, R.
Survey for the Presence of Human Herpesvirus 8 (HHV-8) Infection in Mozambique In: 13th International Congress on Infectious Diseases, 2008, Kuala Lumpur.
13th ICID - Kuala Lumpur, Malaysia - June 19-22, 2008. International Society for Infectious Diseases, 2008.

25. JACOB, F., MAGRI, M. C., SILVA, J. M. K., SANTOS-FORTUNA, Elizabeth de Los, CATERINO-DE-ARAUJO, Adele
Ensaio de imunofluorescência indireta para pesquisa de anticorpos anti-herpesvírus humano 8 (HHV-8) usando eluato de sangue colhido em papel de filtro In: VII Encontro do Instituto Adolfo Lutz, 2007, São Paulo.
VII encontro 2007 Instituto Adolfo Lutz. São Paulo: Adaltech Soluções para Eventos, 2007. p.IMU-1

26. MAGRI, M. C., SANTOS-FORTUNA, Elizabeth de Los, CATERINO-DE-ARAUJO, Adele, SOUZA, J F, SENS, Y A S, JABUR, Pedro
Infecção pelo herpesvírus humano 8 em pacientes em hemodiálise de São Paulo: Estudo Piloto In: VII Encontro do Instituto Adolfo Lutz, 2007, São Paulo.
VII Encontro 2007 Instituto Adolfo Lutz. São Paulo: Adaltech Soluções para Eventos, 2007. p.IMU-25

27. JACOB, F., MAGRI, M. C., SILVA, J. M. K., SANTOS-FORTUNA, Elizabeth de Los, CATERINO-DE-ARAUJO, Adele
Otimização do Ensaio de Imunofluorescência Indireta para Pesquisa de Anticorpos Anti-Herpesvírus Humano 8 (HHV-8) Usando Eluato de Sangue Colhido em Papel de Filtro In: XLIII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2007, Campos do Jordão - SP.
Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. , 2007. v.40. p.20 - 20

28. MAGRI, M. C., CANZIANI, Maria Eugênia Fernandes, MANFREDI, S., MOREIRA, S. R. S., MANFREDI, A. P., DRAIBE, Sergio Antonio, SANTOS-FORTUNA, Elizabeth de Los, CATERINO-DE-ARAUJO, Adele
Screening for HHV-8 antibodies in chronic renal failure and transplanted patients from São Paulo In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia, 2007, São Paulo.
Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. São José do Rio Preto: Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 2007. v.9. p.263 - 263

29. MAGRI, M. C., CATERINO-DE-ARAUJO, Adele
Seria a triagem sorológica para o HHV-8 mais um teste a ser introduzido no pré-transplante renal? In: VII Encontro do Instituto Adolfo Lutz, 2007, São Paulo.
VII Encontro 2007 Instituto Adolfo Lutz. São Paulo: Adaltech Soluções para Eventos, 2007. p.IMU-2.

30. MAGRI, M. C., CANZIANI, Maria Eugênia Fernandes, MANFREDI, S., MOREIRA, S. R. S.,

MANFREDI, A. P., DRAIBE, Sergio Antonio, SANTOS-FORTUNA, Elizabeth de Los, CATERINO-DE-ARAUJO, Adele
Serological Screening for HHV-8 Antibodies in Chronic Renal Failure and Transplanted Patients in São Paulo, Brazil In: World Congress of Nephrology, 2007, Rio de Janeiro - RJ.
World Congress of Nephrology. , 2007. p.81 - 82

31. MAGRI, M. C., CANZIANI, Maria Eugênia Fernandes, MANFREDI, S., MOREIRA, S. R. S., MANFREDI, A. P., DRAIBE, Sergio Antonio, SANTOS-FORTUNA, Elizabeth de Los, CATERINO-DE-ARAUJO, Adele
Serological screening for HHV-8 antibodies in chronic renal failure and transplanted patients in São Paulo, Brazil In: VII Encontro do Instituto Adolfo Lutz, 2007, São Paulo.
VII Encontro 2007 Instituto Adol fo Lutz. São Paulo: Adaltech Soluções para Eventos, 2007. p.IMU-26 -

32. MAGRI, M. C., CATERINO-DE-ARAUJO, Adele, SANTOS-FORTUNA, Elizabeth de Los, SOUZA, José Ferraz de, SENS, Ivoty Alves dos Santos, JABUR, Pedro
Infecção Pelo Herpesvírus Humano 8 em Pacientes em Hemodiálise de São Paulo: Projeto Piloto In: VLII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2006, Teresina, Piauí.
Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Uberaba - MG: Sociedade Brasileira de Medicina Tropical - SBMT, 2006. v.39. p.183 - 183

33. MAGRI, M. C., CATERINO-DE-ARAUJO, A, SANTOS-FORTUNA, E, SCHUELTER-TREVISOL, F, SILVA, M V
Pesquisa de Anticorpos Anti-Herpesvírus Humano Tipo 8 (HHV-8) em População de Mulheres de Várias Categorias de Risco para a Infecção, no Brasil In: VI Encontro do Instituto Adolfo Lutz, 2005, São Paulo, SP.
Revista do Instituto Adolfo Lutz. , 2005. v.64. p.129 - 129

34. MAGRI, M. C., CATERINO-DE-ARAUJO, A, SANTOS-FORTUNA, E, JABUR, P, FRANCO, M H C, SOUZA, J F, SENS, Y A S, CALDERON, P F
Pesquisa de Anticorpos Anti-Herpesvírus Humano 8 em Pacientes em Diálise: Projeto Piloto In: X Encontro Paulista de Nefrologia, 2005, Campos do Jordão, SP.
Jornal Brasileiro de Nefrologia. , 2005. v.16. p.48 - 48

35. MAGRI, M. C., CATERINO-DE-ARAUJO, A, SANTOS-FORTUNA, E, JABUR, P, FRANCO, M H C, SOUZA, J F, SENS, Y A S, CALDERON, Pf
Pesquisa de Anticorpos Anti-Herpesvírus Humano 8 em pacientes em Diálise: Projeto Piloto In: VI Encontro do Instituto Adolfo Lutz, 2005, São Paulo, SP.
Revista do Instituto Adolfo Lutz. , 2005. v.64. p.132 - 132

36. MAGRI, M. C., CATERINO-DE-ARAUJO, A, SANTOS-FORTUNA, E, SCHUELTER-TREVISOL, F, SILVA, M V
Pesquisa de Infecção por HTLV-I/II em Mulheres Profissionais do Sexo da Cidade Portuária de Imbituba, Santa Catarina In: 8º Simpósio Internacional Sobre HTLV no Brasil, 2005, São Paulo, SP.
Brazilian Journal of Infectious Diseases. , 2005. v.9. p.110 - 110

37. MAGRI, M. C., CATERINO-DE-ARAUJO, A, SANTOS-FORTUNA, E, SCHUELTER-TREVISOL, F, SILVA, M V
Pesquisa de Infecção por HTLV-I/II em Mulheres Profissionais do Sexo da Cidade Portuária de Imbituba, Santa Catarina In: VI Encontro do Instituto Adolfo Lutz, 2005, São Paulo, SP.
Revista do Instituto Adolfo Lutz. , 2005. v.64. p.132 - 132

38. MAGRI, M. C., CATERINO-DE-ARAUJO, A, SANTOS-FORTUNA, E, SCHUELTER-TREVISOL, F, SILVA, M V
Pesquisa de Anticorpos Anti-Herpesvírus Humano Tipo 8 (HHV-8) em População de Mulheres de Várias Categorias de Risco para a Infeção, no Brasil In: 2º Congresso de Infectologia do Cone Sul, 2004, São Paulo, SP.
Revista Panamericana de Infectologia. , 2004. v.6. p.137 - 138

39. MAGRI, M. C., CATERINO-DE-ARAUJO, A, SANTOS-FROTUNA, E, SHUELTER-TREVISOL, F, SILVA, M V
Searching for Human Herpesvirus - 8 (HHV-8) Antibodies in Groups of Women at Different Risk for Infection from Brazil In: XXIX Congresso Brasileiro de Imunologia, 2004, Ouro Preto, MG.
Anais do XXIX Congresso Brasileiro de Imunologia. , 2004. p.ID3 -

Artigos em revistas (Magazine)

MAGRI, M. C., CATERINO-DE-ARAUJO, Adele
Bióloga recebe prêmio do Ministério da Saúde. O Biólogo. São Paulo, p.4 - 4, 2007.
1. *Palavras-chave: Prêmio de Incentivo em Ciência e Tecnologia 2006, SUS, Herpesvírus Humano Tipo 8, Soroprevalência*

Apresentação de trabalho e palestra

MAGRI, M. C., Costa, Emanuela Avelar Silva, CATERINO-DE-ARAUJO, Adele
1. **First worldwide survey of LTR point mutations in the Tax-responsive elements of HTLV-1 isolates from HIV/HTLV-1-coinfected patients**, 2012. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
Local: Centro de Convenções Rebouças; Cidade: São Paulo; Evento: IX Encontro do Instituto Adolfo Lutz; I Simpósio Internacional de Vigilância Epidemiológica;

MAGRI, M. C., BRIGIDO, L. F. M., RODRIGUES, R., MORIMOTO, H. K., CATERINO-DE-ARAUJO, Adele
2. **Tax Gene Characterization of Human T-Lymphotropic Virus Type 1 Strains from Brazilian HIV-Coinfected Patients**, 2012. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
Local: Centro de Convenções Rebouças; Cidade: São Paulo; Evento: IX Encontro do Instituto Adolfo Lutz; I Simpósio Internacional de Vigilância Epidemiológica

CATERINO-DE-ARAUJO, Adele, **MAGRI, M. C.**, MORIMOTO, H. K., SATO, N. S., BRIGIDO, L. F. M., MORIMOTO, A. A.
3. **Unusual case of HIV-1, HTLV-1, HTLV-2, and HCV coinfections**, 2012. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
Local: Centro de Convenções Rebouças; Cidade: São Paulo; Evento: IX Encontro do Instituto Adolfo Lutz; I Simpósio Internacional de Vigilância Epidemiológica;

MAGRI, M. C.
4. **Epidemiologia molecular de HTLV-1 na coinfecção HIV. Estudo da região tax**, 2011. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)
Local: Instituto de Infectologia Emílio Ribas; Cidade: São Paulo; Evento: XIII Reunião do Serviço de HTLV;

Cavalcanti, J.S., BRIGIDO, L. F. M., **MAGRI, M. C.**, ZAPAROLI, M., LOPES, G.I.S.L., RODRIGUES, R.
5. **Predictive susceptibility to new generations IP and NNRTI among patients failing ARV therapy in Brazil**, 2011. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
Meio de divulgação: Meio digital; Cidade: Roma, Itália; Evento: 6th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention; Inst.promotora/financiadora: International AIDS Society

MAGRI, M. C., MORIMOTO, H. K., Batista, J.P.G., Ferreira, J.L.P., RODRIGUES, R., BRIGIDO, L. F. M., CATERINO-DE-ARAUJO, Adele
6. **Análise Filogenética de HTLV-1 e HTLV-2 em indivíduos com HIV/AIDS de Regiões de São Paulo e Londrina, Brasil**, 2010. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)
Local: Anfiteatro do Instituto de Infectologia Emílio Ribas; Cidade: São Paulo; Evento: I Simpósio Paulista de HTLV e II Workshop Brasileiro da Sociedade Panamericana de Neurovirologia

BUENO, V. S., **MAGRI, M. C.**, CATERINO-DE-ARAUJO, Adele
7. **Estabelecimento de Métodos Moleculares para a Amplificação de Região tax do Genoma Proviral do HTLV-1 e do HTLV-2**, 2010. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)
Local: Anfiteatro do Instituto de Infectologia Emílio Ribas; Cidade: São Paulo; Evento: I Simpósio Paulista de HTLV e II Workshop Brasileiro da Sociedade Panamericana de Neurovirologia

Costa, E.A.S., **MAGRI, M. C.**, CATERINO-DE-ARAUJO, Adele
8. **Otimização da PCR convencional e em tempo real para o diagnóstico laboratorial de infecção por HTLV-1 e HTLV-2**, 2010. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)
Local: Anfiteatro do Instituto Adolfo Lutz; Cidade: São Paulo; Evento: VII Encontro da Pós-Graduação em Ciências da CCD-SES/SP

Costa, E.A.S., JACOB, F., FELICIANO, R., MAGRI, M. C., SANTOS-FROTUNA, E, CATERINO-DE-ARAUJO, A
9. **Evaluation Of A New Algorithm For The Diagnosis Of Htlv-1 And Htlv-2 In At-Risk Population From São Paulo, Brazil**, 2009. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
Local: Pestana Hotel; Cidade: Salvador; Evento: 14th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Retroviruses

Batista, J.P.G., MAGRI, M. C., RODRIGUES, R., Ferreira, J.L.P., Cavalcanti, J.S., CAMPOS, N. C., Brígido, L.F.M.

10. **HIV-1 Pol Gene Molecular Evolution From Patients Failling Antiretroviral Therapy At São Paulo – SP**, 2009. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)
Cidade: Rio de Janeiro; Evento: VIII Simpósio de Pesquisa em AIDS - SIMPAIDS

Batista, J.P.G., Ferreira, J.L.P., SIQUEIRA, A. F. A., MAGRI, M. C., ZAPAROLI, M., RODRIGUES, R., Brígido, L.F.M.

11. **Molecular Characterizaton Of GP41 Region From HIV-1 Env Gene**, 2009. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)
Cidade: Rio de Janeiro; Evento: VIII Simpósio de Pesquisa em AIDS - SIMPAIDS

MAGRI, M. C., MORIMOTO, H. K., Batista, J.P.G., Ferreira, J.L.P., SIQUEIRA, A. F. A., RODRIGUES, R., Brígido, L.F.M., CATERINO-DE-ARAUJO, A

12. **Nucleotide Sequence And Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis Of The Long Terminal Repeat Of Htlv-2 Isolates From The South And Southeast Regions Of Brazil.**, 2009. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
Local: Pestana Hotel; Cidade: Salvador; Evento: 14th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Retroviruses

MAGRI, M. C., MORIMOTO, H. K., Batista, J.P.G., Ferreira, J.L.P., SIQUEIRA, A. F. A., RODRIGUES, R., BRIGIDO, L. F. M., CATERINO-DE-ARAUJO, Adele

13. **Nucleotide Sequence and RFLP Analysis of the LTR of HTLV-2 Isolates From the South and Southeast Regions of Brazil**, 2009. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)
Local: Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo; Cidade: São Paulo; Evento: XIV Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia - USP;

MAGRI, M. C.

14. **Prevalência de infecção por herpesvírus humano tipo 8 (HHV-8) em populações de risco**, 2009. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)
Local: Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo; Cidade: São Paulo; Evento: I Simpósio do Programa de Pós-Graduação em Farmácia - Área de Análises Clínicas;

Costa, E.A.S., MAGRI, M. C., SANTOS-FORTUNA, Elizabeth de Los, CATERINO-DE-ARAUJO, Adele

15. **Avaliação de Novo Algorítimo de Testes Laboratoriais a Ser Usado no Diagnóstico por HTLV-1 e HTLV-2 no Instituto Adolfo Lutz de São Paulo**, 2008. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)
Local: Instituto Adolfo Lutz; Cidade: São Paulo; Evento: VI Encontro do Programa de Pós-Graduação em Ciências; Coordenadoria de Controle de Doenças - Secretaria de Estado da Saúde

MAGRI, M. C., JACOB, F., SANTOS-FORTUNA, Elizabeth de Los, CATERINO-DE-ARAUJO, Adele

16. **Avaliação do Valor da Densidade Óptica/Cut-off nos Ensaios Imunoenzimáticos para Infecção pelo HTLV-1/2**, 2008. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)
Local: Instituto Adolfo Lutz; Cidade: São Paulo; Evento: VI Encontro do Programa de Pós-Graduação em Ciências; Coordenadoria de Controle de Doenças - Secretaria de Estado da Saúde

MAGRI, M. C.

17. **Epidemiologia molecular de HTLV-1 na coinfecção HIV. Estudo da região tax.**, 2001. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)
Local: Instituto de Infectologia Emílio Ribas; Cidade: São Paulo; Evento: XIII Reunião do Serviço de HTLV;

Demais produções bibliográficas

COSTA, L. D. T., BUENO, V. S., **MAGRI, M. C.**, CATERINO-DE-ARAUJO, Adele

1. **Otimização da reação em cadeia da polimerase para detecção de segmento tax do genoma proviral de HTLV-1 e HTLV-2**. Boletim Técnico - Bol Inst Adolfo Lutz, 2011; 21(2):12-13. São Paulo:RS Press, 2011. (Outra produção bibliográfica)

2. Costa, E.A.S., CATERINO-DE-ARAUJO, Adele, **MAGRI, M. C.**
Prêmio melhor Pôster apresentado no VII Encontro da Pós-Graduação em Ciências da CCD-

SES/SP- 2010. Otimização da PCR convencional e em tempo real para o diagnóstico laboratorial de infecção por HTLV-1 e HTLV-2.. Boletim Técnico - Bol Inst Adolfo Lutz, 2010; 20(2):9-10. São Paulo, 2010. (Outra produção bibliográfica)

3. **MAGRI, M. C.**
Prevalência de anticorpos anti-herpesvírus humano tipo 8 (HHV-8) em soros de pacientes com insuficiência renal crônica. Dissertação de Mestrado. , 2008. (Outra produção bibliográfica)

4. **MAGRI, M. C.**
Pesquisa da Prevalência de Anticorpos Anti-HHV-8 em Pacientes em Diálise e em Fila de Transplante Renal. Monografia. , 2006. (Outra produção bibliográfica)

5. **MAGRI, M. C.**
Imunobiologia dos Aromas: O MHC. Monografia. , 2003. (Outra produção bibliográfica)
Trabalho de Conclusão de Curso para graduação em Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas da Pontifícia Universidade Católica de Campinas apresentado na I Semana Científica e Tecnológica da PUC-Campinas em 2003.

Produção técnica

Produtos tecnológicos sem registro ou patente

1. CATERINO-DE-ARAUJO, Adele, SANTOS-FORTUNA, Elizabeth de Los, **MAGRI, M. C.**, SILVA, J. M. K.
Preparo de lâminas de Imunofluorescência indireta para pesquisa de anticorpos anti-HHV-8 (antígenos LANA e Lítico), 2007

2. **MAGRI, M. C.**, MORIMOTO, H. K., Ferreira, J.L.P., RODRIGUES, R., BRIGIDO, L. F. M., CATERINO-DE-ARAUJO, Adele
Depósito de 18 sequências da região LTR de HTLV-1 para GenBank, 7 de Londrina, 10 de São Paulo e uma de Moçambique. Números de Acesso JF271836 a JF271853, 2011

3. **MAGRI, M. C.**, MORIMOTO, H. K., RODRIGUES, R., BRIGIDO, L. F. M., CATERINO-DE-ARAUJO, Adele
Depósito de 14 sequências de DNA/HTLV-2 região LTR de isolados de Londrina em GenBank. Número de Acesso GU573730 a GU573743, 2010

4. **MAGRI, M. C.**, MORIMOTO, H. K., Batista, J.P.G., RODRIGUES, R., BRIGIDO, L. F. M., CATERINO-DE-ARAUJO, Adele
Depósito de 52 sequências de envelope de HTLV-1 e HTLV-2 para GenBank. Números de Acesso HM770390 a HM770441, 2010
Home page: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/

5. CATERINO-DE-ARAUJO, Adele, SANTOS-FORTUNA, Elizabeth de Los, **MAGRI, M. C.**
Preparo de lâminas de Imunofluorescência indireta para pesquisa de anticorpos anti-HHV-8 (antígenos LANA e Lítico), 2006

6. CATERINO-DE-ARAUJO, Adele, SANTOS-FORTUNA, Elizabeth de Los, **MAGRI, M. C.**
Preparo de lâminas de Imunofluorescência indireta para pesquisa de anticorpos anti-HHV-8 (antígenos LANA e Lítico), 2005

7. CATERINO-DE-ARAUJO, Adele, SANTOS-FORTUNA, Elizabeth de Los, **MAGRI, M. C.**
Preparo de lâminas de Imunofluorescência indireta para pesquisa de anticorpos anti-HHV-8 (antígenos LANA e Lítico)., 2004

8. CATERINO-DE-ARAUJO, Adele, SANTOS-FORTUNA, Elizabeth de Los, **MAGRI, M. C.**
Preparo de tiras de nitrocelulose para serem utilizadas no Western Blot para pesquisa de anticorpos anti-HHV-8, 2004

Demais produções técnicas

1. **MAGRI, M. C.**
Aula: HTLV, 2012. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)
Referências adicionais : Brasil/Português. 2 horas.

2. **MAGRI, M. C.**
Aula: Ferramentas de Bioinformática aplicadas ao estudo de HTLV-1 e HTLV-2 - Disciplina PLSP-321 Procedimentos imunológicos e de molecular aplicados ao estudo de infecção por HTLV-1 e HTLV-2, 2011. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)
Referências adicionais : Brasil/Português. 2 horas.

3. **MAGRI, M. C.**
Docente da Disciplina: Agentes Biológicos. Curso: Pós-Graduação em Higiene Ocupacional, 2010. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)
Referências adicionais : Brasil/Português. 30 horas.

4. **MAGRI, M. C.**
Introdução a Bioinformática, 2009. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)
Referências adicionais : Brasil/Português. 1 hora.
Aula ministrada na Disciplina de Seminários Avançados do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças – CCD/SES-SP. São Paulo, SP, 21/09/2009.

Produção artística/cultural

Artes Visuais

1. CATERINO-DE-ARAUJO, Adele, SANTOS-FORTUNA, Elizabeth de Los, MAGRI, M. C., SHUELTER-TREVISOL, F, SILVA, Marcos Vinícius da
Evento: **BCBL-1 Cell Line Latently Infected by HHV-8. Specific Antibody Reaction on Immunofluorescence Assay (IFA-LANA)**, 2007. País: Brasil. Instituição promotora: The Brazilian Journal of Infectious Diseases. Tipo de evento: Outro.
Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

Eventos

Participação em eventos

1. Conferencista no(a) **XIV Reunião do Serviço de HTLV; II Simpósio Paulista de HTLV; III Workshop Brasileiro da Sociedade Panamericana de Neurovirologia (PASNV)**, 2012. (Simpósio)
Coinfecção HIV/HTLV-1 e HIV/HTLV-2: Epidemiologia Molecular.

2. Apresentação de Poster / Painel no(a) **IX Encontro do Instituto Adolfo Lutz; I Simpósio Internacional de Vigilância Epidemiológica**, 2012. (Encontro)
Phylogenetic and similarity analysis of HTLV-1 isolates from HIV-coinfected patients from the South and Southeast regions of Brazil.

3. **Conferência Internacional em Epidemiologia - EPI CVE 2012**, 2012. (Congresso)

4. **II International Theoretical Course on Viral Hepatitis and Human Host**, 2012. (Seminário)

5. Apresentação Oral no(a) **III Simpósio de Pós Graduação em Análises Clínicas - FCF-USP**, 2011. (Simpósio)
Caracterização molecular do HTLV-1 e do HTLV-2 em pacientes com HIV/Aids de São Paulo e Londrina.

6. Apresentação Oral no(a) **XIII Reunião do Serviço de HTLV**, 2011. (Encontro)
Epidemiologia molecular de HTLV-1 na coinfecção HIV. Estudo da região tax.

7. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XI Simpósio International Sobre HTLV no Brasil**, 2011. (Simpósio)
Molecular and epidemiological characterization of HTLV-2 isolates from HIV coinfected patients from Paraná and São Paulo.

8. Apresentação de Poster / Painel no(a) **15th International Conference on Human Retrovirology – HTLV and Related Viruses**, 2011. (Congresso)
Phylogenetic and similarity analysis of HTLV-1 isolates from HIV-coinfected patients from the South and Southeast regions of Brazil.

9. Apresentação de Poster / Painel no(a) **6th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention**, 2011. (Congresso)
Predictive susceptibility to new generations IP and NNRTI among patients failing ARV therapy in Brazil.

10. **I Simpósio sa Área Médica do Instituto Adolfo Lutz: Pesquisa, Inovação e Vigilância**, 2011. (Simpósio)
11. **Workshop DNA Sequencing: Tips from the Bench**, 2011. (Oficina)
12. Apresentação de Poster / Painel no(a) **I Simpósio Paulista de HTLV e II Workshop Brasileiro da Sociedade Panamericana de Neurovirologia**, 2010. (Simpósio)
Análise Filogenética de HTLV-1 e HTLV-2 em indivíduos com HIV/AIDS de Regiões de São Paulo e Londrina, Brasil.
13. Apresentação de Poster / Painel no(a) **VII Encontro da Pós-Graduação em Ciências da CCD-SES/SP**, 2010. (Encontro)
Otimização da PCR convencional e em tempo real para o diagnóstico laboratorial de infecção por HTLV-1 e HTLV-2.
14. Apresentação de Poster / Painel no(a) **14th International Congress on Infectious Diseases**, 2010. (Congresso)
Risk of an outbreak of Kaposi s sarcoma associated with HIV/AIDS in Mozambique.
15. **II Simpósio do Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas - FCF/USP**, 2010. (Simpósio)
16. **15ª Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia e 45ª Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica (SUPFAB)**, 2010. (Encontro)
17. Apresentação de Poster / Painel no(a) **VIII Simpósio de Pesquisa em AIDS - SIMPAIDS**, 2009. (Simpósio)
HIV-1 Pol Gene Molecular Evolution From Patients Failling Antiretroviral Therapy At São Paulo – SP.
18. Apresentação de Poster / Painel no(a) **14th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Retroviruses**, 2009. (Congresso)
Nucleotide Sequence And Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis Of The Long Terminal Repeat Of Htlv-2 Isolates From The South And Southeast Regions Of Brazil..
19. Apresentação de Poster / Painel no(a) **VIII Encontro do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo**, 2009. (Encontro)
Nucleotide Sequence and Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the Long Terminal Repeat of HTLV-2 Isolates From the South and Southeast Regions of Brazil.
20. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XIV Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia - USP**, 2009. (Encontro)
Nucleotide Sequence and RFLP Analysis of the LTR of HTLV-2 Isolates From the South and Southeast Regions of Brazil.
21. Apresentação Oral no(a) **I Simpósio do Programa de Pós-Graduação em Farmácia - Área de Análises Clínicas**, 2009. (Simpósio)
Prevalência de infecção por herpesvírus humano tipo 8 (HHV-8) em populações de risco.
22. **II Simpósio de HTLV do Programa de Pós-Graduação em Ciências - CCD/SES-SP**, 2009. (Simpósio)
23. Apresentação de Poster / Painel no(a) **VI Encontro do Programa de Pós-Graduação em Ciências**, 2008. (Encontro)
Avaliação do Valor da Densidade Óptica/Cut-off nos Ensaios Imunoenzimáticos para Infecção pelo HTLV-1/2.
24. Apresentação de Poster / Painel no(a) **VII Congresso da SBDST e III Congresso Brasileiro de AIDS**, 2008. (Congresso)
Diversidade Genética do HIV em Amostras Encaminhadas para Teste de Resistência no Instituto Adolfo Lutz de São Paulo.
25. Apresentação Oral no(a) **X Simpósio Internacional sobre HTLV no Brasil**, 2008. (Simpósio)
Does the high optical density/cutt-off value in enzime immunoassays means HTLV-1/2 truly infection?.
26. Apresentação de Poster / Painel no(a) **II Simpósio do Programa de Aprimoramento Profissional do Instituto Adolfo Lutz**, 2008. (Simpósio)
Ensaio de imunofluorescência indireta para pesquisa de anticorpos anti-herpesvírus humano 8 (HHV-8) usando eluato de sangue colhido em papel de filtro.
27. Apresentação de Poster / Painel no(a) **2º Congresso da CPLP sobre DST-AIDS**, 2008. (Congresso)

International cooperation between Brasil and Mozambique first survey on human herpesvirus 8 (HHV-8) infection.

28. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XIX National Meeting of Virology**, 2008. (Congresso)
Molecular Characterization of HTLV-2 LTR Genomic Region in Isolates from the South and Southeast Regions of Brazil.

29. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XXXIII Congress of the Brazilian Society for Immunology**, 2008. (Congresso)
Prevalence of human herpesvirus 8 (HHV-8) antibodies in serum samples from chronic kidney disease patients, with or without substitutive kidney therapy, compared to others populations.

30. Apresentação de Poster / Painel no(a) **13th International Congress on Infectious Diseases**, 2008. (Congresso)
Survey for the Presence of Human Herpesvirus 8 (HHV-8) Infection in Mozambique.

31. **I Simpósio de HTLV do Programa de Pós-Graduação em Ciências**, 2008. (Simpósio)
32. **GE Day**, 2008. (Encontro)

33. Apresentação de Poster / Painel no(a) **Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia**, 2007. (Congresso)
Screening for HHV-8 antibodies in chronic renal failure and transplanted patients from São Paulo.

34. Apresentação de Poster / Painel no(a) **VII Encontro do Instituto Adolfo Lutz**, 2007. (Encontro)
Seria a triagem sorológica para o HHV-8 mais um teste a ser introduzido no pré-transplante renal?.

35. Apresentação de Poster / Painel no(a) **World Congress of Nephrology**, 2007. (Congresso)
Serological Screening for HHV-8 Antibodies in Chronic Renal Failure and Transplanted Patients en São Paulo, Brazil.

36. **Seminário Internacional - Inovações na Gestão do Setor Saúde / I Amostra SES**, 2007. (Seminário)

37. Apresentação de Poster / Painel no(a) **Decit +2: Atuação do Ministério da Saúde em Ciência, Tecnologia e Inovação**, 2006. (Encontro)
Pesquisa da Prevalência de Anticorpos Anti-HHV-8 em Pacientes em Diálise e em Fila de Transplante Renal.

38. Apresentação de Poster / Painel no(a) **VI Encontro do Instituto Adolfo Lutz**, 2005. (Encontro)
Pesquisa de Anticorpos Anti-Herpesvírus Humano Tipo 8...; Pesquisa de Infecção por HTLV-I/II em Mulheres...; Pesquisa de Anticorpos Anti-Herpesvírus Humano 8 em Pacientes em Diálise....

39. **Conferência: Prêmio Jovem Cientista - Sangue: Fluido da Vida**, 2005. (Outra)
40. **IV Encontro do Programa de Pós-Graduação em Ciências - CCD**, 2005. (Encontro)
41. **Curso de Integração e Implementação da Norma ISO/IEC 17025**, 2004. (Outra)
42. **Curso de Capacitação em Biossegurança Laboratorial**, 2004. (Outra)
43. **Simpósio: Ética em Pesquisa**, 2004. (Simpósio)
44. **IV Reunião Da Patologia - Instituto Adolfo Lutz**, 2004. (Encontro)
45. **III Encontro do Programa de Pós-Graduação em Ciências - CCD**, 2004. (Encontro)

46. Apresentação de Poster / Painel no(a) **I Semana Científica e Tecnológica - PUCC**, 2003. (Encontro)
Imunologia dos Aromas: O MHC.

47. **32ª Semana de Estudos Biológicos**, 2003. (Encontro)
48. **XIII Encontro Paulista de Micologia**, 2002. (Encontro)
49. **31ª Semana de Estudos Biológicos**, 2002. (Encontro)
50. **13º Encontro de Biólogos do CRBio-1**, 2002. (Encontro)
51. **Seminário de Bioinformática e Biotecnologia**, 2001. (Seminário)
52. **V CAEB**, 2001. (Congresso)
53. **CIENTEC**, 2001. (Congresso)
54. **Biologia e Ecologia do Boto Cinza**, 2000. (Outra)
55. **30ª Semana de Estudos Biológicos**, 2000. (Encontro)