

WALTER KLEINE NETO

**Prevalência e fatores de risco para a infecção pelo HTLV-I/II em
um grupo de pacientes infectados pelo HIV-1 de duas cidades do
Estado de São Paulo, Brasil**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Área de concentração: Hematologia
Orientadora: Prof. Dra. Ester Cerdeira Sabino

São Paulo
2007

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus queridos pais Benedito Kleine e Ivone Aparecida Kleine, aos amados irmãos Wagner Kleine e Priscila Aparecida Kleine e aos poucos bons amigos que tenho.

À grande razão de minha vida, meu filho Nicolás Kleine a quem também quero mostrar o fascinante caminho da Ciência.

A todos os pacientes, boas almas que participaram deste estudo, peças fundamentais sem as quais nada seria possível

Agradecimentos

Agradeço ao Criador por ter me dado todas as condições para que pudesse obter mais esta conquista em minha vida.

A minha chefe e orientadora Dra. Ester Cerdeira Sabino por quem tenho imensa admiração e que sempre esteve ao meu lado não apenas para sanar dúvidas técnicas, mas principalmente como amiga incondicional.

Ao meu querido e inestimável amigo Dr. Sabri Saeed Sanabani, homem dotado de uma honestidade e inteligência singular a quem agradeço por tantos ensinamentos não apenas científicos mas também de vida.

Aos bons colegas e as secretárias da Fundação Pró Sangue e da Hematologia, em especial minha querida **Sueli da Silva Aquino**, e também à **Teresinha dos Anjos de Oliveira** que muitas vezes estiveram dispostas a me auxiliar no que fosse necessário.

E a todos que de alguma maneira contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

SUMARIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. A DESCOBERTA DOS HTLVs	01
1.2. TAXONOMIA	03
1.3. ESTRUTURA DA PARTÍCULA VIRAL	03
1.4. ESTRUTURA GENÉTICA E REPLICAÇÃO	05
1.5. VARIABILIDADE GENÉTICA DOS HTLVs	08
1.6 EPIDEMIOLOGIA DOS HTLVs	11
1.7 EPIDEMIOLOGIA DO HTLV TIPO II	15
2. OBJETIVOS	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1. AMOSTRAS CLÍNICAS	20
3.2. ENSAIOS SOROLÓGICOS	20
3.3. EXTRAÇÃO DE DNA	22
3.4. AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO LTR DE HTLV TIPO II	23
3.4.1. AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO pXTax DE HTLV TIPO II	24
3.5. AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO LTR DE HTLV TIPO I	25
3.6. DETECÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR	25

3.7. SEQUENCIAMENTO DE DNA	27
3.8. MÉTODO ESTATÍSTICO	28
3.9. ANÁLISES FILOGENÉTICAS	28
4. RESULTADOS	30
5. DISCUSSÃO	39
6. CONCLUSÕES	43
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

ANEXOS

Parecer Comissão de Ética

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Questionário Padrão

LISTA DE ABREVIATURAS

HTLV: Human T Cell Lymphotropic Virus.

RNA: Ribonucleic Acid.

HAM: HTLV Associated Myelopathy.

TSP: Tropical Spastic Paraparesis.

STLV: Simian T Cell Lymphotropic Virus.

mRNA: Messenger RNA.

ORF: Open Reading Frame.

LTR: Long Terminal Repeat.

DNA: Desoxirribonucleic Acid.

UDIV: Usuário de Droga Intravenosa.

HIV: Human Immunodeficiency Virus.

EDTA: Ethylene Diamine Tetra Acetic acid

ELISA: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

HHV-8: Human Herpes Virus Type 8.

HCV: Hepatitis C Virus.

PCR: Polymerase Chain Reaction.

DNTP: Deoxyribonucleotide triphosphate

KCl: Cloreto de Potássio.

MgCl₂: Cloreto de Magnésio.

HCl: Ácido Clorídrico.

ng: Nanograma.

µL: Microlitro.

pb: Par de Bases.

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool.

IC: Intervalo de Confiança.

OR: Odds Ratio.

WB: Western Blot.

ATL: Adult T Cell Leukemia/Lymphoma.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	
Soroprevalências de HTLV-I/II em diferentes regiões brasileiras.	14
Tabela 2	
Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.	26
Tabela 3	
Soroprevalência de HTLV-I/II em relação a idade, sexo e região.	31
Tabela 4	
Soroprevalência HTLV-I/II de acordo com fatores de risco.	31
Tabela 5	
Soroprevalência de HTLV-I/II com marcadores infecciosos.	32
Tabela 6	
Resultados sorológicos e de PCR para HTLV-I/II.	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estrutura da partícula viral.	04
Figura 2 Organização genética dos HTLV-I/II	07
Figura 3 Divisão e classificação atual dos tipos e subtipos de HTLVs	10
Figura 4 Distribuição geográfica de populações endêmicas e epidêmicas para a infecção pelos tipos de HTLV.	12
Figura 5 Parentesco filogenético gerado por sequencia parcial de LTR de um isolado Brasileiro de HTLV-I deste estudo.	35
Figura 6 Parentesco filogenético gerado por sequencia parcial de LTR de 12 isolados Brasileiros de HTLV-II deste estudo.	36
Figura 7 Seqüências de aminoácidos da proteína Tax dos isolados de HTLVII.	37

RESUMO

Prevalência e fatores de risco para a infecção pelo HTLV-I/II em um grupo de pacientes infectados pelo HIV-1 de duas cidades do Estado de São Paulo, Brasil.

A prevalência e a subtipagem molecular foram usadas para identificar a epidemiologia de HTLV-I/II entre indivíduos infectados por HIV-1 no Estado de São Paulo. Além disso, foi feita a correlação da infecção por HTLV-I/II com os fatores de riscos relacionados a infecção por HIV-1.

Este estudo de corte transversal retrospectivo incluiu 319 indivíduos infectados com HIV-1, atendidos em clínicas especializadas de duas cidades do Estado de São Paulo, Brasil (Ribeirão Preto & São Paulo, Capital). Os pacientes foram entrevistados e testados para anticorpos contra HTLV-I/II (ORTHO® HTLV-I/HTLV-II Ab-Capture enzyme immunoassay). Foi realizado o sequenciamento direto de DNA dos produtos de PCR da região pXTax de HTLV-II e LTR de HTLV-I/II para diferenciação e determinação do subtipo.

A prevalência geral de anticorpos anti-HTLV-I/II foi de 7,5% (24/319; 95% CI: 5.2-11.5) e não diferiu significativamente por idade ($p=0.2$), sexo ($p=0.9$), ou local de residência ($p=0.7$). A infecção por HTLV-I/II foi fortemente associada com histórico de uso de drogas injetáveis e anticorpos para o vírus da Hepatite tipo C ($p<0.001$). Não foi observada associação entre a presença de anticorpos contra HTLV e práticas sexuais ou marcadores sorológicos para doenças sexualmente transmissíveis (anticorpos anti *T.pallidum*, Anti HHV8, ou Anti HBV). O DNA do HTLV-II foi detectado em 50% (12/24; 95% CI: 28.3-68.2) dos sujeitos soropositivos testados e em todos eles foi identificado o subtipo IIc pelas análises filogenéticas. Destes, 58% (7/12) eram usuários de drogas injetáveis. Entretanto, apenas 4,2% (1/24) tinha o DNA do HTLV-I detectável e foi identificado como subtipo Ia.

Nossos resultados indicam que o uso de drogas injetáveis é um importante fator de risco para a transmissão do HTLV-II, mas não para HTLV-I, entre nossa população de infectados por HIV-1 e que o HTLV-II subtipo c é um marcador útil para transmissão via uso de drogas injetáveis.

Descritores:

- 1- Vírus 1 Linfotrópico T Humano
- 2- Vírus 2 Linfotrópico T Humano
- 3- Estudos Seroepidemiológicos
- 4- Fatores de Risco

ABSTRACT

Prevalence and Risk factors of HTLV-I/II in a cohort of patients with HIV-1 infection in two cities from the state of São Paulo, Brazil.

The prevalence and molecular subtyping was used to identify the epidemiology of HTLV-I/II among HIV-1 infected individuals in the state of São Paulo. Moreover, correlation of HTLV-I/II infection with the risk factors of HIV-1 was addressed.

This study was retrospective cross sectional, including 319 individuals infected with HIV-1, attending HIV clinic in two cities (Ribeirão Preto & Capital São Paulo) in the state of São Paulo, Brazil. Patients were interviewed and tested for antibodies against HTLV-I/II (using ORTHO® HTLV-I/HTLV-II Ab-Capture enzyme immunoassay). Direct PCR DNA sequencing of HTLV-I/II *tax* and HTLV-I/II long terminal repeat regions was performed on HTLV seropositive subjects for differentiation and subtyping determination.

The overall prevalence of anti-HTLV-I/II antibodies was 7,5% (24/319; 95% CI: 5.2-11.5) and did not differ significantly by age ($p=0.2$), sex ($p=0.9$), or place of residence ($p=0.7$). HTLV-I/II infection was strongly associated with a history of intravenous (i.v) drug injections and antibodies to hepatitis C virus ($p<0.001$). There was no association ($p>0.05$) between the presence of antibodies against HTLV and sexual behaviours or serological markers for sexual transmitted diseases (anti *T.pallidum*, Anti HHV8, or Anti HBV antibodies). HTLV-II DNA was detected in 50% (12/24; 95% CI: 28.3-68.2) of the subjects tested seropositive and they were all identified as subtype IIc by phylogenetic analysis. Of them, 58% (7/12) were injecting drug users. However, only 4,2% (1/24) of HTLV-I had detectable DNA and identified as subtype Ia.

Our results indicate that i.v drug injection is an important risk factor for HTLV-II transmission, but not for HTLV-I, among our HIV-1 infected population and that HTLV-II-subtype c is a useful marker of HTLV-II transmission via i.v drug injection.

Descriptors:

- 1- Human T Lymphotropic Virus 1
- 2- Human T Lymphotropic Virus 2
- 3- Seroepidemiologic studies
- 4- Risk Factors

1 INTRODUÇÃO

1.1 1 A da descoberta dos HTLVs

Em 1980 Poiesz e colaboradores isolaram de um paciente com linfoma cutâneo de células T o primeiro retrovírus humano, posteriormente denominado Vírus Linfotrópico de Células T Humana Tipo I (HTLV-I). Dois anos depois o tipo II seria identificado em uma linhagem de células de paciente com tricoleucemia (Kalyanaraman et al, 1982). Ambos os isolados apresentavam alto grau de homologia em suas seqüências de RNA e sororeatividade cruzada em testes imunoenzimáticos, sendo, a partir de então, comum referir-se a estes vírus em conjunto (HTLV-I/II).

Além da Leucemia/Linfoma de Células T do Adulto, o HTLV-I também é causador de uma doença neurológica degenerativa denominada Mielopatia associada ao HTLV-I / Paraparesia Espástica Tropical (HAM/TSP) (Román & Osame, 1988). Existem vários indícios de acometimento múltiplo de órgãos sugerindo um amplo espectro de morbidade ligado ao HTLV-I (Blank A, 1993).

Ao contrário do HTLV-I, o HTLV-II não apresenta associação definida com nenhuma doença linfoproliferativa. Entretanto, vem sendo também postulado como agente da Mielopatia associada ao HTLV / Paraparesia Espástica Tropical (HAM/TSP), além de outras síndromes neurológicas, bem como no aumento da incidência de pneumonia, bronquite e algumas condições inflamatórias como artrite (Roucoux & Murphy, 2004).

Contudo, o interesse em seu estudo reside nas informações antropológicas que pode fornecer em se tratando de migrações populacionais primitivas, comportando-se como um "fóssil vivo". No entanto, atualmente o HTLV-II está se espalhando pelo mundo, principalmente através do uso de seringas e agulhas contaminadas compartilhadas entre adictos a drogas (Eiraku et al, 1996).

Um estudo recente, conduzido por Wolfe et al (2005) investigou a diversidade do HTLV entre indivíduos da África Central que relataram contato com sangue de primatas não humanos e seus fluídos corporais através de caça, abate, ou que possuíam primatas domesticados. Foi mostrado que nesta população existia uma variedade muito grande de infecção por HTLVs, incluindo dois retrovirus desconhecidos: o HTLV-IV como membro de uma linhagem filogenética diferente de todos os HTLVs e STLVs relatados, e o HTLV-III inserido na diversidade filogenética do STLV-III, um grupo nunca visto em humanos, sendo o tipo III também identificado por pesquisadores franceses a partir de análises filogenéticas que demonstraram forte parentesco entre a nova cepa humana (Pyl43) e isolados de STLV-III originários da República dos Camarões, fortalecendo o conceito de múltiplas transmissões inter-espécies no passado (Calattini et al, 2005).

Estes dados mostram que a diversidade do HTLV é maior do que a previamente descrita e sugere que a exposição a primatas não humanos contribui para a emergência da infecção por HTLV, além do fato de que possam existir implicações para o diagnóstico, triagem em bancos de

sangue, e potencial para desenvolvimento de doenças em pessoas infectadas.

1.2 Taxonomia

Existe uma ampla gama de vírus cujo material genético é constituído por RNA pertencentes à família *Retroviridae*. O HTLV-I/II, anteriormente classificado como sendo do gênero *Oncovirus*, (denominação não mais aceita pelo Comitê Internacional em Taxonomia Viral), juntamente com o Vírus da Leucemia Bovina, são considerados retrovírus complexos (Murphy, 1996).

1.3 Estrutura da partícula viral

O HTLV é um vírus envelopado, com 110 a 140 nm de diâmetro, morfológicamente muito similar aos demais retrovírus, com proteínas que se lançam para fora do envoltório. A proteína de superfície (SU), voltada para o exterior da partícula viral, é sustentada pela proteína transmembrana que atravessa a estrutura do envelope.

Ligada à membrana do envelope, encontra-se a proteína da matriz composta por um ácido graxo em sua porção amino terminal, e que reveste a face interna do envoltório. O cerne da partícula viral é um capsídeo composto em sua maior parte por proteínas codificadas pelo gene *gag* e que acondiciona em seu interior o genoma viral constituído de duas hélices de RNA ligadas a várias nucleoproteínas básicas denominadas proteínas do nucleocapsídeo (Figura 1).

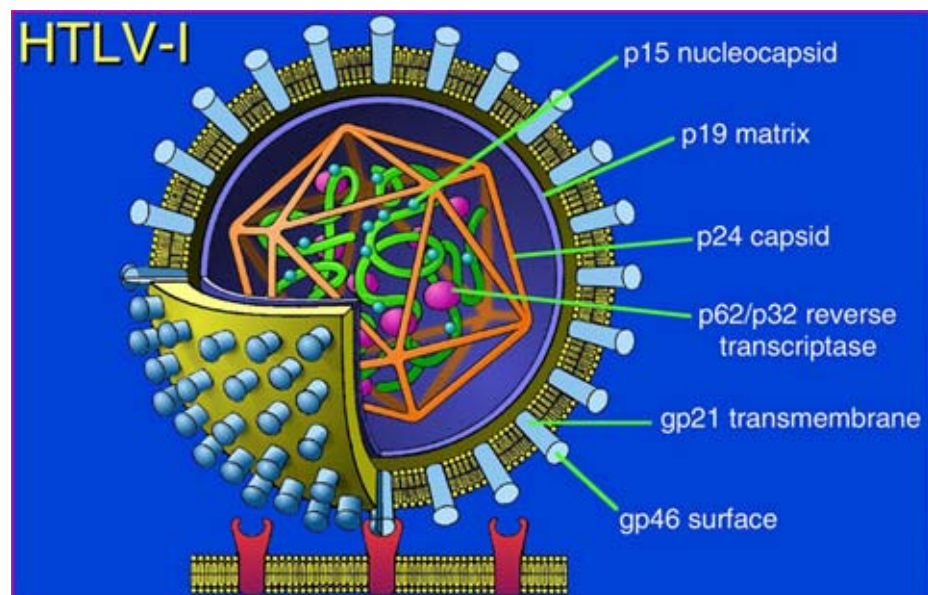


Figura 1: Estrutura da partícula viral segundo Coffin, 1996.

Outras proteínas, essenciais ao processo de replicação do vírus, estão também presentes no interior do capsídeo, como a transcriptase reversa e a integrase (Coffin, 1996).

1.4 Estrutura genética e replicação

A organização genômica dos retrovirus apresenta propriedades singulares em relação a sua estrutura física, sistema de síntese e replicação.

São os únicos vírus com genoma diplóide que é sintetizado e processado pelos mecanismos bioquímicos normais de transcrição da célula infectada, além de estar associado a um RNA específico que tem como função dar início à replicação viral, e, mesmo apresentando polaridade positiva, o RNA viral não se comporta como RNA mensageiro após a infecção (Cann & Chen, 1996).

O HTLV-I e o HTLV-II integrados constituem-se de 9032 e 8952 bases, respectivamente (Seiki et al, 1983 & Shimotohno et al, 1985), possuindo basicamente a mesma arquitetura genética dos demais retrovírus, composta pelos genes estruturais *gag*, *pol*, e *env*, além de uma região denominada pX localizada na porção 3' do genoma, responsável pela síntese de proteínas regulatórias, sendo que o mRNA desta região contém 4 fases de leitura aberta (ORFs I, II, III e IV) e as proteínas Tax e Rex, ambas codificadas pelo mesmo mRNA policistrônico, através das ORFs III e IV, respectivamente (Franchini, 1995).

Ambas as extremidades do genoma são flanqueadas por longas regiões de repetição, denominadas LTR (Long Terminal Repeats), cujas

seqüências são essenciais na integração do DNA proviral ao DNA cromossômico do hospedeiro e também na regulação transcricional do genoma dos HTLVs.

O gene *gag*, localizado entre os nucleotídeos 802 a 2019, é traduzido como uma poliproteína precursora que posteriormente é clivada para dar origem às proteínas *gag* estruturais p19 (proteína da matriz), p24 (proteína do capsídeo) e p15 (proteína do nucleocapsídeo).

A protease é codificada a partir de uma ORF, onde a porção 3' final de *gag* encontra-se sobreposta, e a região 5' do gene *pol* (gene *pro*). Além de promover sua própria clivagem para a formação de uma enzima madura, a protease também é responsável pelo processamento de *gag* gerando produtos funcionais (Cann & Chen, 1996).

A região *pol* do HTLV-I (nucleotídeos 2497 a 5187) codifica as enzimas transcriptase reversa, responsável pela síntese do DNA viral a partir do RNA, atuando como uma DNA polimerase, possuindo também atividade de RNase H removendo a fita molde de RNA após a síntese da cadeia de DNA, e a integrase que promove a incorporação do DNA viral através da clivagem do DNA da célula hospedeiro. As glicoproteínas do envelope viral (gp21 e gp46) são codificadas pela região *env*, e estão associadas ao mecanismo de penetração do vírus na célula hospedeira. A gp46 é quem liga a partícula viral a moléculas receptoras da célula hospedeira, e a proteína transmembrânica gp21 é responsável pela fusão do envelope viral com a membrana celular.

A proteína transativadora de transcrição viral (Tax) é uma fosfoproteína nuclear que age nos elementos responsivos ao Tax (TER), um segmento de DNA localizado na região U3 do LTR viral, sendo essencial para a replicação do HTLV (Koralnik et al., 1992; Sodroski et al., 1985), além de induzir a transcrição de genes celulares para produção de receptores de interleucinas e ativar oncogenes, podendo também suprimir a expressão da DNA β -polimerase, uma das enzimas responsáveis pelo sistema de reparo do DNA (Yoshida et al., 1995).

A fosfoproteína Rex regula o balanço entre o mRNA que passará ou não pelo processo de splicing, sendo importante para a síntese protéica viral, interagindo com seqüências localizadas na região LTR, denominadas "elementos responsivos ao REX" (RxRE) (Coffin, 1996). As estruturas do genoma viral do HTLV-I/II são demonstradas na figura 2.

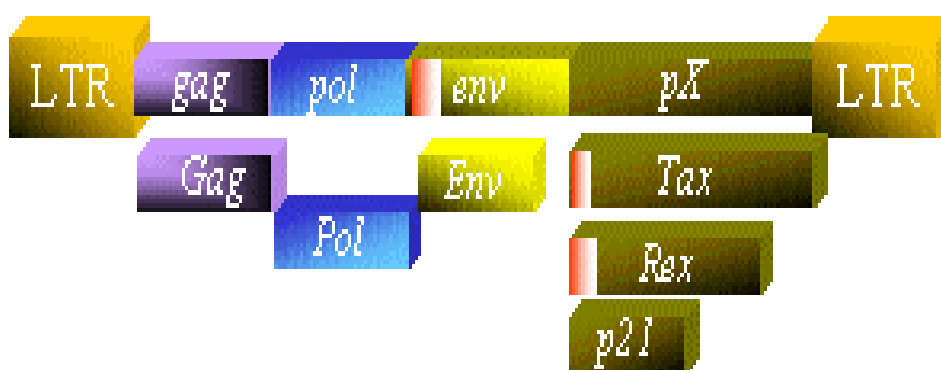


Figura 2: Organização genética dos vírus HTLV-1/2 (Coffin, 1996 & Rabson, 1997)

1.5 Variabilidade genética dos HTLVs

Quatro diferentes subtipos de HTLV-I têm sido descritos: HTLV-Ia, também conhecido como subtipo cosmopolita, ligado a cepas de diferentes regiões geográficas (Miura et al, 1997); HTLV-Ib conhecido como subtipo da África Central (Vandamme et al., 1994); HTLV-Ic, uma cepa muito divergente isolada de aborígenes que vivem em Papua Nova Guiné e Austrália, também chamado subtipo Melanesiano (Bastian et al., 1993) e o HTLV-Id, descrito como um novo subtipo molecularmente distinto isolado de pigmeus (Chen et al., 1995). Salemi et al (1998) identificaram, através de análises filogenéticas das regiões LTR e env, dois novos subtipos de HTLV-I de indivíduos soroindeterminados oriundos do Congo e Zaire. Estes subtipos foram classificados como “e” e “f”, ambos apresentando homologia com cepas de HTLV-I Africanas, o que indicou contato estreito entre símios e humanos no passado.

Análises filogenéticas de HTLV-II isolados de usuários de drogas intravenosas da América do Norte, Europa, e de grupos indígenas selecionados demonstraram a existência de dois subtipos, designados HTLV-IIa e HTLV-IIb (Dube et al., 1993; Salemi et al., 1996).

HTLVs tipo II isolados de Seminole, Guaymi e tribos indígenas pertencem ao subtipo IIb, enquanto o protótipo isolado MoT (subtipo IIa) define o original.

Estudos moleculares preliminares, através de análises comparativas das regiões LTR, env e tax, com HTLVs II presentes na população urbana e

indígena brasileira mostram que os vírus isolados são filogeneticamente do subtipo IIa (Switzer et al., 1996).

Entretanto, estes vírus possuem características peculiares do subtipo IIb, no tocante à região tax, cujo produto gênico apresenta uma proteína mais extensa com 25 aminoácidos adicionais, devido à perda de um stop codon (Eiraku et al, 1996).

É interessante notar que as cepas urbanas brasileiras: Belém10, Belém02, BRAZ.A21 e SP-WV (esta última comum em UDIVs coinfectados por HIV1 em São Paulo) estão ligadas com as cepas de índios Kayapos. Esta mesma variedade de HTLV-II foi isolada de uma mulher brasileira de origem indígena Americana vivendo na Guiana Francesa, e foi classificada por Kazanji *et al* (2001) como HTLV-IIc.

Em um estudo conduzido por Vandamme, et al (1998), foi identificada uma quarta variedade isolada de uma tribo Pigmeu designada subtipo II d cuja similaridade de proteínas de gag e env em comparação com os subtipos IIa e IIb apresentou consistente reatividade sorológica. A figura 3 demonstra esquematicamente a divisão e a classificação atual dos tipos e subtipos de HTLVs.

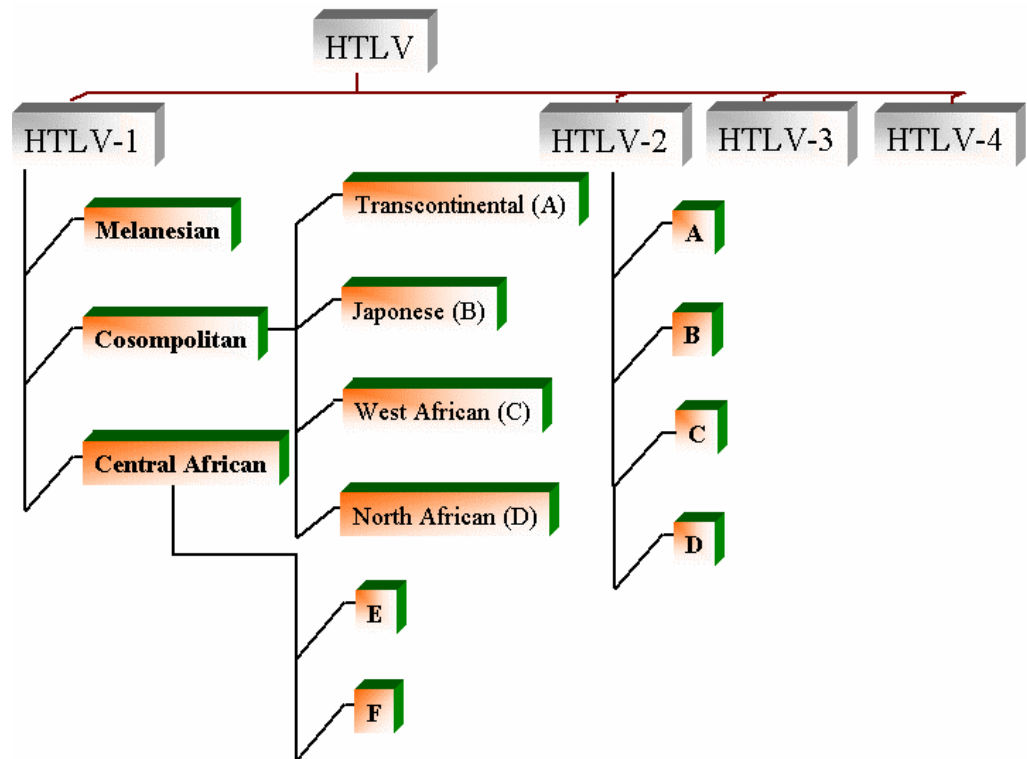


Figura 3: Divisão e classificação atual dos tipos e subtipos de HTLVs.

1.6 Epidemiologia dos HTLVs

A infecção pelo HTLV está presente em diferentes regiões do mundo formando o que se chama de grupamentos geográficos. Entre estes “grupamentos”, podemos citar regiões do Japão, América, Ásia e África. Estima-se que o total de indivíduos infectados seja de 15 a 20 milhões.

No Japão foram realizadas as primeiras pesquisas de soroprevalência, obtidas principalmente a partir dos bancos de sangue, onde a triagem para o HTLV nos doadores é realizada com rígido controle desde o ano de 1986. A soroprevalência geral varia de zero a 45%, e dentre as áreas de maior endemicidade estão as Ilhas de Okinawa, Shikoku, Kyushu e Hokkaido.

Estudos realizados na Coréia, Taiwan e China, demonstraram soropositividade em poucos casos isolados, na sua maioria constituídos por descendentes de japoneses.

Na África, estudos recentes demonstram uma tendência ao aumento da soroprevalência em sete países (Marrocos, Sudão, Costa do Marfim, Alto Volta, Uganda, Tanzânia e Zaire). A partir do norte do continente (Marrocos) ao sul (Zaire) com taxas variando de 0,6% a 16,9%. É preciso cautela quando interpretamos dados provenientes deste continente devido à possibilidade de reação cruzada entre o HTLV e outras infecções, como é o caso da malária. Na Melanésia os principais focos de infecção são em Papua, Nova Guiné e nas ilhas Salomão com taxas de ordem de 14% de soroprevalência. Na Europa, os estudos indicam infecções raras e restritas a indivíduos provenientes de áreas endêmicas ou pertencentes a grupos de

risco como hemofílicos, usuários de drogas intravenosas que compartilham seringas e pessoas promíscuas sem devidas proteções.

Na França, o número de soropositivos entre doadores de sangue é da ordem de 0,13% a 0,39%. Na Holanda este número é da ordem de 0,1%, sendo estes números bem semelhantes ao da Dinamarca, Suécia, Alemanha e Espanha (Taylor, 1996).

Nas Américas, o Caribe é uma das áreas mais afetadas com soroprevalência estimada de 5% para a população da Jamaica e Panamá. Em Trindade-Tobago, uma soroprevalência de 3,2% em pessoas de descendência africana é descrita. Existem ainda estudos de soropositividade na Colômbia, Venezuela, Peru, Suriname, Chile, Argentina e Paraguai.

A figura 4 ilustra a distribuição geográfica de populações endêmicas e epidêmicas para a infecção pelos tipos de HTLV.

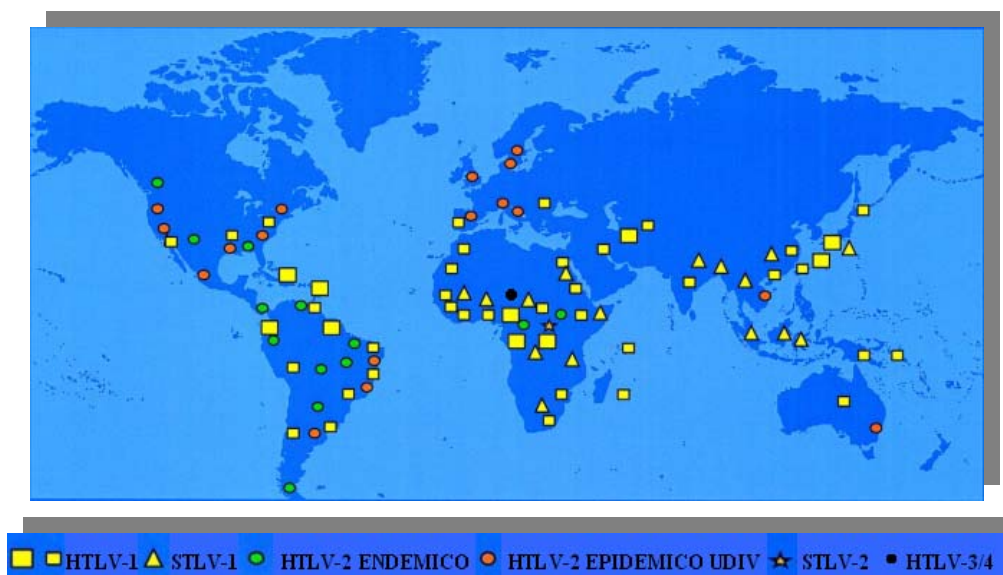


Figura 4: Distribuição geográfica de populações endêmicas e epidêmicas para a infecção pelos tipos de HTLV.

No Brasil, as taxas de soroprevalência variam conforme a região, descendência, sexo e forma de seleção dos indivíduos incluídos nesses estudos. A triagem para doadores de sangue é obrigatória desde novembro de 1993 e a prevalência estimada é de 0,46% (Galvão-Castro, 1997), o que daria um total de 750.000 indivíduos num total de 150 milhões de habitantes correspondentes á população atual deste país.

Caso a soroprevalência no Brasil seja menor em homens que em mulheres, como em outros países, esses números estariam bastante subestimados em áreas como Minas Gerais, onde a cada 10 doadores aptos, oito são do sexo masculino (Anna Bárbara F. et al, 2002).

A taxa de infecção varia segundo a região estudada. Na cidade de Salvador encontra-se a mais elevada prevalência entre doadores (1,35%), enquanto que em Florianópolis apenas 0,08% dos doadores tem uma sorologia positiva. Mais recentemente, demonstrou-se que a prevalência desta infecção em Salvador (2,5 milhões de habitantes) é em torno de 2%, caracterizando-se como o epicentro desta infecção no Brasil (Galvão-Castro et al., 1997).

Em relação a infecção pelas variantes do HTLV-I, no Brasil, há ocorrência dos subtipos **a** e **c** do grupo Cosmopolita (Yamashita et al., 1996). A tabela 1 resume as prevalências de HTLV-I/II baseadas em trabalhos científicos com doadores de sangue de algumas cidades brasileiras.

Tabela 1. Prevalência do HTLV-I/II em doadores de sangue no Brasil.

LOCAL	PREVALÊNCIA	AUTOR
Belém	1,61%	Saraiva JCP, 1989
Belo Horizonte	0,32%	Proietti FA, 1994
	0,42%	Menna-Barreto M, 1995
Florianópolis	0,08%	Galvão B, 1997
Fortaleza	0,40%	Castro-Costa CM, 1995
Manaus	0,08%	Galvão B, 1997
Porto Alegre	0,42%	Menna-Marreto M, 1995
Recife	0,33%	Galvão B, 1997
Rio de Janeiro	0,45%	Araújo AQ, 1996
Salvador	1,80%	Moreira ED, 1993
	1,35%	Galvão B, 1997
São Paulo	0,41%	Wendel NS, 1990
	0,40%	Gabbai AA, 1990
	0,18%	Ferreira OC, 1995

Adaptado de Catalan-Soares et al, 2001.

1.7 Epidemiologia do HTLV Tipo II

O Vírus linfotrófico de Células T Humanas Tipo II (HTLV-II) é similar ao HTLV-I e também apresenta um tropismo por linfócitos T, além de semelhantes mecanismos de transmissão, como por via sexual, de mãe para filho, e através de hemocomponentes contaminados (Gallo, 2002).

A recente rota de infecção pode esclarecer em parte como o uso coletivo de agulhas entre adictos a drogas parece ter sido a principal via de disseminação do HTLV-II na Europa e América do Norte (Lowis et al., 2002). Ademais, o HTLV-II é endêmico em populações indígenas isoladas e tribos Pigmeus na África. Além destes focos endêmicos, o HTLV-II tem se espalhado de forma surpreendente entre usuários de drogas intravenosas e seus parceiros sexuais na América do Norte e alguns países Europeus incluindo Itália, Espanha, França, Noruega, Suécia, Irlanda e Reino Unido.

De maneira não surpreendente, já que os mecanismos de transmissão do HTLV-II e HIV1 apresentam extrema semelhança, os usuários de drogas intravenosas são freqüentemente coinfectados por ambos (Salemi et al., 1999).

Embora o HTLV-II não tenha sido claramente associado com nenhuma doença, tem sido sugerido que o mesmo possa influenciar o curso da doença por HIV1 em pacientes coinfectados (Bovolenta et al., 2002).

Vários casos de desordens neurológicas e linfoproliferativas foram relatados em portadores de HTLV-II, principalmente em usuários de drogas com coinfecção por HIV1 (Dooneief et al., 1996; Zehender et al., 1995, 2002).

Estudos em UDIVs na América do Norte aventam que o HTLV-IIa é a variante circulante predominante (Murphy et al., 1998). Ao passo que tanto o subtipo IIa como o IIb são prevalentes em UDIVs Europeus, sendo inicialmente noticiada uma distribuição geográfica distinta.

O HTLV-IIa é predominante no Norte, enquanto o HTLV-IIb é quase exclusivo do sudeste da Europa, principalmente Espanha e Itália (Switzer et al., 1995; Vallejo et al., 1996).

Entretanto, devido as freqüentes viagens internas Européias, vem sendo observada uma grande disseminação e miscigenação de diferentes variedades de HTLV-II nos últimos anos (Toro et al, 2004).

No Brasil, análises de seqüências nucleotídicas do gene *env* obtidas de isolados de HTLV-II detectados entre índios da tribo Tiryos demonstraram que estes vírus pertenciam ao subtipo IIa.

Análises filogenéticas destas mesmas seqüências mostraram que estes isolados segregaram-se com cepas de HTLV-II oriundas de usuários de drogas intravenosas residentes em áreas urbanas do sudeste do país (Shindo et al, 2002).

A falta de uma clara separação entre as cepas de índios Americanos e cepas urbanas de UDIVs pode indicar transmissão destes vírus entre estas populações (Lewis et al., 2000).

Estas cepas de HTLV-IIa possuem características peculiares em sua estrutura genética apresentando uma proteína Tax mais extensa, semelhante a do subtipo IIb. Esta variedade, exclusiva brasileira, tem sido formalmente denominada HTLV-IIc (Kazanji et al 2001).

Um estudo realizado em duas cidades da região Amazônica, com 169 amostras de sangue de indivíduos infectados pelo HIV1, mostrou que os HTLVs tipo II isolados eram pertencentes ao subtipo **c** (Laurentino, et al, 2005).

Estes resultados sugerem que, além do HTLV-IIc ser o mais prevalente, e talvez o único subtipo circulante no Brasil, sua presença em áreas urbanas é resultado dos processos de mistura durante a colonização do país (Vallinoto et al, 2002).

Em Londrina no Paraná foram analisados os principais fatores de risco para aquisição da infecção por HTLV-I/II em pacientes co-infectados por HIV1, demonstrando-se uma forte associação com o uso de drogas injetáveis (Morimoto et al, 2005).

Inquéritos sorológicos, moleculares e epidemiológicos devem ser periodicamente realizados com o intuito de se definir os níveis de infecção pelo vírus HTLV, e relacionar os tipos e subtipos com as vias de transmissão.

As freqüentes migrações de contingentes humanos e mudanças de seus hábitos exigem constantes atualizações dos dados epidemiológicos sobre os tipos de vírus circulantes e suas variantes em determinados grupos.

Informações deste tipo podem estabelecer índices de infecção por subtipos específicos utilizando-se análises moleculares e comparações filogenéticas, sendo possível compreender o trajeto e as principais vias de

disseminação da epidemia, bem como sua provável origem e população com maior risco de ser afetada.

Foram avaliados os dados clínicos, sócio-demográficos e epidemiológicos com o objetivo de definir as principais vias de transmissão do HTLV em pacientes coinfectados por HIV1, ligando-se tipo e subtipo viral encontrado em cada indivíduo com as respectivas histórias clínicas e/ou fatores de risco associados.

2 OBJETIVOS

1- Determinar a prevalência sorológica da infecção por HTLV (I e II) em pacientes infectados pelo vírus HIV1 em duas cidades do Estado de São Paulo, Brasil.

2- Realizar sequenciamento e genotipagem para identificação dos tipos e subtipos de HTLV I e II nas amostras positivas quanto a sorologia amplificadas pela Reação em Cadeia da Polimerase.

3- Associar tipo e subtipo viral causador da coinfeção com forma de transmissão (relações hetero ou homossexuais, transfusões de sangue ou hemoderivados, uso de drogas endovenosas).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostras Clínicas

Este estudo de corte transversal retrospectivo incluiu 319 indivíduos infectados com HIV1, sendo 212 homens e 107 mulheres com faixas etárias acima de 18 anos, atendidos em clínicas especializadas de duas cidades do Estado de São Paulo (Ribeirão Preto e São Paulo - Capital) entre Março e Maio de 2001. As amostras foram coletadas pelo sistema Vacuntainer em EDTA e fazem parte de um estudo piloto vinculado ao projeto intitulado Diversidade Genética do HIV no Estado de São Paulo, financiado pela FAPESP.

Estas amostras foram colhidas de forma seqüencial no momento da realização do teste de carga viral e contagem de células T CD4+.

O questionário padrão, preenchido no ato da coleta de sangue, foi preparado focando os potenciais fatores de risco para aquisição do HIV, incluindo características sócio-demográficas, histórico sexual e exposição parenteral, onde o paciente autoriza o uso de sua amostra e respectivos dados através de um termo de consentimento livre e esclarecido.

3.2 Ensaio sorológicos

Inicialmente foram realizados testes sorológicos utilizando a metodologia ELISA, para se estabelecer a soroprevalência da infecção por HTLV I e II nesta população de pacientes HIV positivos.

Nesta fase foram usados Kits para testes sorológicos ELISA da Ortho Clinical Diagnostics (Johnson & Johnson Company) por captura de anticorpos que utilizam como fase sólida microplacas sensibilizadas com antígenos recombinantes do HTLV I e II. O ensaio utiliza a combinação de quatro antígenos recombinantes: antígeno do envelope do HTLV-I; antígeno do envelope do HTLV-II; antígeno do core do HTLV-I e antígeno do core do HTLV-II.

Todas as amostras positivas pelo ELISA foram submetidas ao Western blot com o Kit HTLV BLOT 2.4 GeneLabs Diagnostic, (USA), que contém a proteína recombinante gp21 (GD21) capaz de detectar tanto o HTLV-I como o HTLV-II. Outros peptídeos recombinantes envelope-específicos usados são rgp46I e rgp46II, que podem fazer a diferenciação sorológica do HTLV-I e HTLV-II, respectivamente. As amostras foram consideradas positivas não tipadas quando apresentavam reatividade para as proteínas *gag* (p24 ou p19) e *env* (GD21). Amostras reativas para rgp46I são consideradas HTLV-I positivas, enquanto que a reatividade detectada para o peptídeo rgp46II classifica as amostras como sendo HTLV-II positivas. O critério para classificação de amostras indeterminadas foi baseado na reatividade isolada de p24, p19 ou GD21 do HTLV. A ausência de bandas caracterizava o Western blot como não reagente.

Foi realizada a triagem para hepatite B, C, Herpes Vírus Humano Tipo 8 (HHV-8) e *T. pallidum* desta população, na Fundação Pró Sangue, antes do início deste estudo. As amostras de plasma foram testadas para anticorpos contra *T. pallidum*, HCV, antígeno de superfície do vírus da

hepatite B (HBsAg) e anticorpos contra o antígeno do core (HBc), usando-se ensaios padrões da instituição. A infecção por HHV-8 foi estabelecida pela detecção de anticorpos contra o antígeno lítico e latente virais, com o uso de testes de Imunofluorescência indireta (Ferreira S et al 2003).

3.3 Extração de DNA

Nas amostras positivas e/ou indeterminadas quanto à sorologia o DNA foi extraído diretamente do sangue usando-se o Kit QIAamp Blood Extration (Qiagen, Chatsworth, CA), de acordo com instruções do fabricante. Descrevendo brevemente, a lise foi feita com detergente na presença de Proteinase K por 10 minutos a 56° C. O material lisado foi aplicado a uma coluna contendo uma membrana com sílica-gel, centrifugado e lavado.

O DNA purificado foi eluído das colunas em 200 µL de tampão Tris-HCl (10mM, pH 8,0) e estocado a - 20° C para amplificação por PCR. Foram realizadas reações para amplificação e detecção tanto de HTLV-I como de HTLV-II em cada uma das amostras envolvidas.

O procedimento de extração de DNA foi realizado sob condições criteriosas laboratoriais para se evitar contaminação da PCR. Alíquota de todos os reagentes, de extração, pré PCR e as etapas de manipulação de pós PCR foram feitas em ambientes fisicamente separados contendo cabines de fluxo laminar com descontaminação Ultra-Violeta.

Para testar possível contaminação das reações, foram realizadas extrações e PCR negativas em todos os experimentos. Outras medidas de

precaução foram adotadas, como o uso de ponteiros resistentes a aerosol e materiais plásticos descartáveis.

A concentração do DNA genômico extraído das amostras sob investigação foi determinada pela comparação das bandas das mesmas em relação ao tamanho e intensidade das bandas do marcador High DNA mass ladder (Invitrogen), usando-se gel de agarose 0,5 a 1% (Promega) corado com brometo de etídio a 10 mg/mL.

Todo DNA genômico extraído foi submetido a amplificação de um gene para controle interno (β -globina) com os primers GH20 e PC04 (Marchioli *et al.*, 1996) para avaliar a integridade do DNA e excluir a presença de inibidores de PCR.

3.4 Amplificação da região LTR de HTLV Tipo II

Para amplificação e sequenciamento de LTR do HTLV-II foi aplicada a técnica de nested PCR (Eiraku, *et al.*; 1996) que gera um fragmento de 493 pares de bases.

As reações foram padronizadas para um volume final de 100 μ L, contendo 1 μ g de DNA extraído, 0,225 mM de cada dNTP, 0,2 μ M de cada primer, 50mM KCL, 2 mM MgCl₂, 10 mM de Tris-HCL (pH 8,3), e 2,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen). Os primers utilizados para o 1º round foram 194 e 831 (vide tabela 2). Para o segundo round alocaram-se os primers de nested 290 e 783 (vide tabela 2). Cinco microlitros do produto inicial amplificado foram usados para a reação de nested.

Em cada experimento, após uma desnaturação inicial de 5 min a 94°C, foram realizados 35 ciclos em termociclador 9600 (Perkin-Elmer). Cada ciclo consistiu de desnaturação por 40 seg a 94°C, anelamento por 30 seg a 57°C, e extensão por 1min a 72°C. Os 35 ciclos foram seguidos por uma extensão final de 10min a 72°C.

3.4.1 Amplificação da região pX-tax de HTLV Tipo II

Para se diferenciar os subtipos IIa e IIc a região pX-TAX foi sequenciada com o intuito de se verificar a existência de um stop codon que está presente no subtipo IIa mas ausente no subtipo IIc.

Um fragmento de aproximadamente 200 pb, que contem a região do stop codon, foi amplificado por seminested PCR com os primers pX105 e pX106 para o 1º round; e os primers pX106 com LS1 para o 2º round (vide tabela 2).

Foram preparados 100µL de cada mistura de reação. As condições de ciclagem foram idênticas para os dois rounds, com desnaturação inicial de 5min a 94°C, envolvendo 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 40 seg, anelamento a 52,5°C por 30 seg e alongamento da cadeia a 72°C por 40 seg. Todas as PCRs tiveram um tempo final de alongamento de 10min a 72°C.

A PCR foi efetuada em termociclador 9600 series (Perkin-Elmer), e as misturas contendo 1µg de DNA template, uma concentração de 0,225 mM de cada dNTP, cada primer a uma concentração de 0,2 µM, 50mM de KCL,

2mM de MgCl₂, 10mM Tris-HCL (pH 8,3) e 2,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen).

3.5 Amplificação da região LTR de HTLV Tipo I

Os produtos correspondentes a região LTR de HTLV-I foram obtidos através da técnica de seminested PCR (Mahieux *et al*, 1997), gerando um fragmento de 467pb, amplificado pelos primers 8255 e LTRU5E antisense, onde 2µL do produto de PCR inicial foram usados para o segundo round, gerando um fragmento de 433pb com os primers 8255 e 420LTR.

Cada mistura de reação continha 1,5µg de DNA, 0,2 mM de dNTPs, 10µL de um buffer 10x, 0,2 µM de cada primer e 2,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) em um volume total de 100µL.

Após denaturação a 94°C por 5min, as misturas de reação contendo DNA passaram por 40 ciclos, sendo cada ciclo composto por denaturação a 94°C por 1min, anelamento a 58°C por 1min, e, extensão de 72°C por 2min.

Um incremento de extensão de 2 seg por ciclo foi aplicado, com um tempo final de extensão de 10 min a 72°C.

3.6 Detecção dos produtos de PCR

Os produtos de PCR foram detectados pela aplicação de 2 µL dos mesmos em 2 - 4 µL de tampão de corrida padrão dentro de cada poço do gel. Um gel de agarose a 1% para eletroforese foi feito com tampão Tris borato 0,5X contendo EDTA e corado com 1µL de brometo de etídio a 10 mg/mL para cada 100 mL de gel. A corrida eletroforética foi a 100 volts por

um período de 30 minutos, no mesmo tampão e visualizada sob iluminação Ultra-Violeta.

Os produtos amplificados foram preparados para seqüenciamento de DNA removendo-se o excesso de primers e dNTPs que sobram na solução utilizando-se o Kit QIAquick PCR purification (Qiagen Inc., Valência, CA).

Primer	Seqüência	Tipo viral	Sentido
HTLV-II LTR			
LTR 194	5' CCTTACCCACTTCCCCTAGCGCTGA 3'	HTLV-II	Forward
LTR 831	5' GGGAAAGCCCGTGGATTTGCCCCAT 3'	HTLV-II	Reverse
LTR 290*	5' AAAAGCGCAAGGACAGTTCAGGAGG 3'	HTLV-II	Forward
LTR 783*	5' ATCCCGGACGAGCCCCCACTTGT 3'	HTLV-II	Reverse
HTLV-II pX tax			
pX 105*	5' GCTTTCCCCACCCATGACATG 3'	HTLV-II	Forward
pX 106	5' GGGCCGTGGTTTCAGTTCCTA 3'	HTLV-II	Reverse
LS1*	5' GAATACACCAACATCCCTGTC 3'	HTLV-II	Reverse
HTLV-I LTR			
8255*	5' TTGAAGAATACACCAACATCCC 3'	HTLV-I	Forward
LTRU5E	5' CGCAGTTCAGGAGGCACCAC 3'	HTLV-I	Reverse
420LTR*	5' GAACGCGACTCAACCGGCCGTGGAT 3'	HTLV-I	Reverse

Tabela 2: Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.

* Primers usados para sequenciamento.

3.7 Seqüenciamento de DNA

Os produtos de PCR foram diretamente seqüenciados através dos primers de nested e seminested utilizados na amplificação, que determinam as seqüências nucleotídicas de ambas as fitas. As reações de seqüenciamento consistiam em 50 - 100 ng de produto de PCR, 1 µL de BigDye Terminator (Versão 2.0; Applied Biosystems), 1,5 pmol de primer, 3 µL de um tampão de diluição (400mM de Tris HCl, 10mM MgCl₂, pH 9,0) em um volume final de 10 µL.

A reação de seqüenciamento foi realizada em placas com 96 poços onde a ciclagem consistia em 25 ciclos de 96°C por 10 Seg., 50°C por 5 Seg. e 60°C por 4 min. As reações de seqüenciamento foram purificadas pela precipitação com isopropanol 75%.

Os produtos precipitados foram ressuspensos em tampão de corrida para amostras (Hi-Di Formamide, Applied Biosystems) e analisados usando-se o sistema de eletroforese em capilar ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems).

Os dados dos fragmentos seqüenciados foram editados, alinhados em seqüências contíguas numa sobreposição mínima de 30 pb com uma combinação mínima de 99 - 100% e o consenso de ambas as fitas foi formado pelo programa Sequencher (Gene Code Corp., Ann Arbor, Mich.). Cada critério de alinhamento previne qualquer sobreposição errada de fragmentos caso estes não derivarem da mesma variante.

Todas as seqüências foram checadas para contaminação através da procura pelo BLAST contra o banco de dados de seqüências de HTLV-I/II e entre elas mesmas.

3.8 Método estatístico

As análises estatísticas foram feitas utilizando-se o pacote de programas Epi-info (version 6.04). Análises univariadas dos fatores de risco suspeitos para aquisição do HTLV foram avaliados entre todos os indivíduos pelo teste do Qui-quadrado com correção de Yate's ou com o teste de exatidão de Fisher, quando apropriado. Exatos intervalos de confiança binomiais (IC) para índices e exatos IC para odds ratios (ORs) foram usados para acessar a prevalência da infecção por HTLV e sua associação com os fatores de risco para HIV. As taxas de prevalência por grupos (como idade do grupo, número de parceiros sexuais) foram comparadas usando-se o teste do Qui-quadrado Mantel-Haenszel para tendência linear. Para demonstrar a associação de fatores de risco individuais com a infecção por HTLV-I/II utilizou-se o programa Epi-Info MVAWIN logistic regression (version 6.50). Variáveis com um *P* value menor que 0.05 foram consideradas estatisticamente significativas.

3.9 Análises Filogenéticas

As seqüências deste estudo foram alinhadas utilizando-se o programa CLUSTAL W (Thompson et al., 1997) e editadas manualmente através do software BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, T.A. 1999).

Um total de 56 seqüências de HTLV-I correspondendo as posições 8325 a 8661 da cepa ATK incluindo a seqüência de um indivíduo envolvido neste estudo e várias seqüências de subtipos de HTLV-I retiradas do GenBank, todas correspondentes a região LTR, foram alinhadas e analisadas. Selecionou-se um modelo evolucionário apropriado para estas seqüências usando-se o teste de razão de verossimilhança como implementado no Modeltest v3.6 (Posada e Crandall, 1998). Os parâmetros do modelo escolhido (TrN+G) foram os seguintes: frequência de equilíbrio nucleotídico, $f_A = 0.2839$, $f_C = 0.2965$, $f_G = 0.2357$, $f_T = 0.1839$; proporção de sítios invariáveis = 0.0; configuração da distribuição do parâmetro (γ) refletindo a taxa de variabilidade sítio a sítio de regiões variáveis = 0.4743; e valores da matriz R , $R_{A \rightarrow C} = 1.805$, $R_{A \rightarrow G} = 11.7464$, $R_{A \rightarrow T} = R_{C \rightarrow G} = R_{G \rightarrow T} = 1.0$, e $R_{C \rightarrow T} = 6.1174$. Uma matriz de distancia foi calculada baseada neste modelo e usada na construção de uma árvore de máxima verossimilhança na versão 4.0b10 do PAUP (Roger and Swofford, 1998). Após a construção da árvore inicial obtida pelo método neighbor joining, uma procura heurística para verossimilhança foi realizada pelo algoritmo SPR de ramo permutado.

O parentesco de nossas seqüências de HTLV-II em relação a diferentes seqüências referencia de subtipos de HTLV-II foi examinado.

O modelo evolucionário apropriado (HKY) para estas 42 seqüências, incluindo nossos isolados de HTLV-II, foi selecionado usando-se o teste de razão de verossimilhança. Os parâmetros para este modelo foram os seguintes: $f_A = 0.1468$, $f_C = 0.3586$, $f_G = 0.2413$, $f_T = 0.2534$. Entre os sítios a taxa de variação foi igual para todos.

4 RESULTADOS

Como relatado anteriormente foram realizados testes sorológicos imunoenzimáticos nas 319 amostras de plasma dos pacientes envolvidos neste estudo, objetivando-se determinar a soroprevalência da infecção por HTLV-I/II nesta população de indivíduos infectados por HIV1.

A prevalência total para anticorpos anti HTLV-I/II foi de 7,5% (24/319: IC 95%: 4,9 – 11,1) e não diferiu significativamente por idade ($p = 0,2$) ou sexo ($p = 0,9$) (Tabela 3).

Contudo, uma soroprevalência significativa de 10,7% (16/149) foi observada nas amostras de pacientes atendidos em clínicas da cidade de Ribeirão Preto ($p = 0,04$: IC 95%) em relação aos indivíduos acompanhados em clínicas da cidade de São Paulo – Capital, onde pode-se registrar uma prevalência de 4,7% (8/170) (Tabela 3).

Todas as amostras positivas no teste de ELISA foram submetidas ao Western Blot discriminativo para HTLV-I e HTLV-II, onde pode-se identificar 2 pacientes como sendo portadores do HTLV tipo I, 6 portadores do HTLV tipo II, 14 caracterizados como WB indeterminado e 2 com tipagem negativa (Tabela 6).

Foi realizada em todos os casos, positivos, negativos ou indeterminados quanto ao Western blot, a reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação da região LTR dos vírus HTLV-I e HTLV-II separadamente, encontrando-se 12 amostras positivas para HTLV tipo II (50%), 1 amostra positiva para HTLV tipo I (4%) e 11 amostras negativas para HTLV-I/II (46%) (Tabela 6).

Tabela 3: Soroprevalência de HTLV-I/II em relação a idade, sexo e região.

Características	N ^o . Testado	N ^o . (%)	Reatividade para HTLV-I/II			
			95% CI	OR	p-value	95% CI
Total	319	24 (7.5)	4.9-11.1			
Idade (anos):						
15-29	54	5 (9.1)	3.1-20.3	1		
30-39	141	13 (9.2)	5.0-15.3	1		0.31-3.76
40-49	91	5 (5.5)	1.8-12.4	0.57		0.12-2.62
Acima de 50	33	1 (3.0)	0.1-15.8	0.31	P trend 0.2	0.01-2.95
Sexo:						
Feminino	107	8 (7.5)	3.3-14.2	1		
Masculino	212	16 (7.5)	4.4-12.1	1.01	P=0.98	0.39-2.82
Local:						
São Paulo	170	8 (4.7)	2.1-9.1	1		
Ribeirão Preto	149	16 (10.7)	6.3-16.9	2.44	P=0.04	0.95-6.77

Tabela 4: Soroprevalência HTLV-I/II de acordo com fatores de risco

Características	N ^o . Testado	N ^o . (%)	Reatividade para HTLV-I/II			
			95% CI	OR	p-value	95% CI
Inclinação sexual:						
Heterossexual	157	15 (9.6)	5.4-15.3	1		
Homossexual	113	07 (6.2)	2.5-12.3	0.63		0.21- 1.70
Bissexual	49	02 (4.1)	0.5-14.1	0.40	P trend 0.2	0.04-1.84
N^o de parceiros sexuais :						
Nenhum	8	2 (25.0)	3.2-65.1	1		
Somente um	150	10 (6.7)	3.2-11.9	0.21		0.03-2.48
2-10	133	10 (7.5)	3.7-13.4	0.24		0.04-2.82
Acima de 10	28	02 (7.1)	0.9-23.5	0.23	P trend 0.6	0.02-3.98
História de UDIV:						
Nunca	284	13 (7.6)	2.4-7.7	1		
Sempre	32	11 (34.4)	18.6-53.2	10.92	P < 0.0001	3.86-29.84
Parceiros UDIV:						
Nunca	221	16 (7.2)	4.2-11.5	1		
Sempre	38	4 (10.5)	2.9-24.8	1.51		0.35-5.06
Não sabem	60	4 (6.7)	1.8-16.2	0.92	P trend 0.98	0.21-2.99

Tabela 5: Soroprevalência de HTLV-I/II em relação a marcadores infecciosos.

Outras infecções virais	N ^o . Testado	N ^o . (%)	Reatividade para HTLV-I/II			
			95% CI	OR	p-value	95% CI
Anticorpos anti HCV						
Negativo	258	5 (1.9)	0.6-4.5	1		
Positivo	61	19 (31.1)	19.9-44.3	22.89	P<0.0001	7.61-81.43
Anticorpos anti HHV8						
Negativo	258	19 (7.4)	4.5-11.3	1		
Positivo	61	5 (8.2)	2.7-18.1	1.12	P=0.82	0.31-3.29
Anticorpos Anti-core HBV						
Negativo	192	12 (6.3)	3.3-10.7	1		
Positivo	127	12 (9.4)	5.1-15.9	1.57	P=0.3	0.62-3.95
Anticorpos anti T.pallidum						
Negativo	237	18 (7.6)	4.6-11.7	1		
Positivo	82	06 (7.3)	2.7-15.2	0.96	P=0.93	0.30-2.65

Tabela 6: Resultados sorológicos e de PCR para HTLV-I/II em nossa casuística.

N ^o Amostra	ELISA (DO/CO)	Western Blot	PCR HTLV-I/II
005	10,6	INDETERMINADO	NEGATIVO
017	10,6	HTLV-II	NEGATIVO
031	7,5	INDETERMINADO	NEGATIVO
073	8,6	INDETERMINADO	NEGATIVO
100	5,1	INDETERMINADO	NEGATIVO
122	10,9	INDETERMINADO	HTLV-II
123	11,9	HTLV-II	HTLV-II
131	6,6	NEGATIVO	NEGATIVO
209	11,2	INDETERMINADO	NEGATIVO
228	9,5	INDETERMINADO	HTLV-II
236	9,6	HTLV-II	HTLV-II
242	9,6	NEGATIVO	NEGATIVO
244	11,7	HTLV-I	HTLV-I
246	9,6	HTLV-II	HTLV-II
253	9,6	INDETERMINADO	NEGATIVO
257	9,6	INDETERMINADO	HTLV-II
275	11,2	HTLV-II	HTLV-II
287	11,0	INDETERMINADO	HTLV-II
293	11,0	INDETERMINADO	HTLV-II
314	11,0	HTLV-II	HTLV-II
324	11,0	HTLV-I	NEGATIVO
337	11,0	INDETERMINADO	NEGATIVO
343	11,0	INDETERMINADO	HTLV-II
345	11,0	INDETERMINADO	HTLV-II

Utilizou-se como critério de interpretação na seleção de casos verdadeiramente positivos a reatividade para Western Blot e/ou PCR. Adotando-se este algoritmo pudemos constatar que a prevalência de HTLV-I e HTLV-II foi de 0,6% e 4,1% respectivamente. Em nossa casuística não foi encontrado nenhum caso de co-infecção com HTLV-I e HTLV-II.

Pode-se fazer uma correlação entre os resultados tipados pelo WB e os resultados da PCR diferencial da região LTR, onde entre as 14 amostras Western blot indeterminadas, 7 foram negativas para PCR HTLV-I/II e 7 positivas para HTLV-II.

Das 6 amostras tipadas como HTLV-II por Western blot, 5 foram concordantes na PCR e uma apresentou resultado negativo para a amplificação da região LTR de HTLV-II. Entre as duas amostras caracterizadas como HTLV-I pelo WB, uma apresentou resultado concordante na PCR HTLV-I, e a outra negativo. Duas amostras negativas para WB foram também concordantes por PCR HTLV-I/II (Tabela 6). Em todas as amostras negativas por PCR foram feitas várias tentativas de amplificação antes que se pudesse firmar um resultado definitivo.

Dentre as amostras PCR positivas, 92,3% (12/13) foram classificadas como sendo HTLV tipo II, e 7,7% (1/13) como HTLV tipo I, através da amplificação específica para a região LTR de cada um dos tipos virais.

Os produtos de PCR gerados pela amplificação da região LTR de HTLV-I/II destas amostras foram submetidos ao método de sequenciamento de DNA, e as seqüências originadas foram alinhadas e editadas para que se pudesse seguir com as análises filogenéticas para determinação dos

subtipos de HTLV causadores da infecção. Através da comparação filogenética de máxima verossimilhança entre as amostras obtidas neste estudo e cepas padrões retiradas do banco de dados do genoma foi possível determinar quais os subtipos de HTLV I e II responsáveis pela co-infecção em nossa casuística.

A amostra 244, única amplificada para HTLV tipo I, foi classificada como pertencente ao genótipo **Ia**, também conhecido como subtipo Cosmopolita, suportado por um valor de bootstrap superior a 80% (Figura 5).

Nas 12 amostras classificadas como HTLV tipo II a construção da árvore filogenética da região LTR revelou que todos os vírus identificados pertenciam ao subtipo **IIc**, com valores de bootstrap superiores a 80% suportando os resultados (Figura 6). Apesar dos resultados da filogenia da região LTR de HTLV-II terem fornecido dados bastante satisfatórios sobre o subtipo viral encontrado nas amostras, pela segregação com padrões bem caracterizados, foi necessária a confirmação da genotipagem através do sequenciamento e análise da região pX-Tax para verificação da perda de um stop codon, pela substituição T por C na posição 8203, que confere o ganho de 25 aminoácidos à cadeia polipeptídica do subtipo **IIc** em comparação ao subtipo **IIa**. O alinhamento e análise dos aminoácidos da região Px-Tax amplificada e sequenciada revelou que em todas as amostras o stop códon estava ausente, confirmando o resultado da subtipagem fornecida pela análise da região LTR de HTLV-II (Figura 7).

Com estes dados pode-se afirmar que em todos os pacientes infectados com o HTLV tipo II o subtipo encontrado foi exclusivamente o **IIc**.

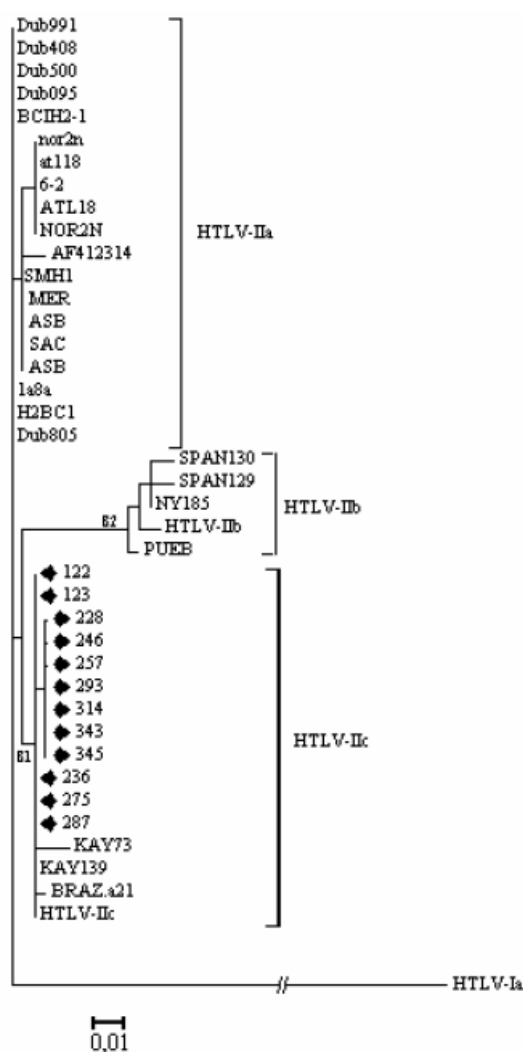


Figura 6: Parentesco filogenético gerado por seqüência parcial de LTR de 12 isolados Brasileiros de HTLV-II do atual estudo (Marcados em preto). A seqüência nucleotídica foi comparada com seqüências referencia dos subtipos A, B e C. A árvore foi construída pelo método de máxima verossimilhança sob o modelo de substituição HKY. Os valores nos ramos indicam o suporte de bootstrap baseado em 1000 replicações usando-se o método de Neighbor joining e troca SPR. A barra de escala representa 0.01 substituições nucleotídicas por sitio. O HTLV-Ia foi usado como grupo de fora.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90
Htl1-A	KRLEELLYKM	FLHTGAVIVL	PEDDLPTMF	QPVRAPCIQT	AWCTGLLPYH	SILTTPGLIW	TFNDGSPMIS	GPCPKAGQPS	LVVQSSLLIF
Htl1-B
122
123V.....
228
236V.....
246
257
275
287
293
314
343
345

	100	110	120	130	140	150	160
Htl1-A	EKFQTKAFHP	SYLLSHQLIQ	YSSFHMLHLL	FDEYTNIPVS	ILFNKEEADD	NGD*	
Htl1-BQPPEPAA	QGESSTQKVR PSHTHNP
122QPPEPAT	QGESSTQKVR PSHTHNP
123QPPEPAT	QGESSTQKVR PSHTHNP
228QPPEPAT	QGESSTQKVR PSHTHNP
236QPPEPAT	QGESSTQKVR PSHTHNP
246QPPEPAT	QGESSTQKVR PSHTHNP
257QPPEPAT	QGESSTQKVR PSHTHNP
275QPPEPAT	QGESSTQKVR PSHTHNP
287QPPEPAT	QGESSTQKVR PSHTHNP
293QPPEPAT	QGESSTQKVR PSHTHNP
314QPPEPAT	QGESSTQKVR PSHTHNP
343QPPEPAT	QGESSTQKVR PSHTHNP
345QPPEPAT	QGESSTQKVR PSHTHNP

Figura 7: Seqüências de aminoácidos da proteína Tax dos isolados de HTLV-II. Espera-se que as cepas Brasileiras (HTLV-IIc) e os protótipos HTLV-IIb apresentem 25 aminoácidos adicionais na posição carboxi terminal, em comparação ao protótipo Mo (HTLV-IIa).

* Posição do stop códon no subtipo HTLV-IIa.

A infecção por HTLV-I/II foi fortemente associada com histórico de uso de drogas injetáveis (OR 10,92) e anticorpos para o vírus da hepatite C (OR 22,89) ($p < 0,001$) (Tabelas 4 & 5). Não foi encontrada associação entre a presença de anticorpos anti-HTLV e fatores sexuais ou marcadores sorológicos de doenças sexualmente transmissíveis como anti *T. palidum*, anti HHV8 ou anticorpos anti HBV (Tabela 5).

As análises estatísticas indicaram que o uso de drogas injetáveis é um importante fator de risco para a transmissão do HTLV-II (OR 15,8: IC 95%: 6,2 – 40,7), mas não para o HTLV-I entre nossa população de infectados por HIV1, e que o subtipo HTLV-IIc é um marcador útil para transmissão via uso de drogas injetáveis ($p < 0,001$).

5 DISCUSSÃO

A primeira descrição do vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1 (HTLV-I) foi feita em 1980, seguida pela descoberta do HTLV-II, em 1982. Desde então tornou-se comum referir-se a estes vírus como HTLV-I/II, os quais têm sido intensamente estudados. O Caribe, América do Sul e Central são áreas com alta prevalência para HTLV-I e HTLV-II. Os principais modos de transmissão são contato sexual, pelo sangue e de mãe para filho através do aleitamento materno (Carneiro Proietti, et al 2006).

O HTLV-I está associado com a leucemia/linfoma de células T do adulto (ATL), Mielopatia associada ao HTLV / paraparesia espástica tropical (HAM/TSP), uveíte associada ao HTLV, bem como dermatite infecciosa. O papel patogênico do HTLV-II ainda não foi totalmente esclarecido, mas pode estar envolvido em alguns casos de tricoleucemia e desordens neurológicas.

Por estas razões, iniciativas de saúde pública, objetivando o aconselhamento e a educação dos indivíduos e populações com comportamento de risco, são essenciais. Nas Américas isto é especialmente importante em áreas de alta prevalência.

Outro ponto importante é que devido ao fato do HTLV-I, HTLV-II, e HIV apresentarem modos idênticos de transmissão, a infecção simultânea ou subsequente por estes retrovírus pode ser observada.

No Brasil, a soroprevalência para HTLV-I/II em indivíduos co-infectados por HIV1 é em média 6,3% (Catalan-Soares et al, 2001), sendo no Rio de Janeiro registrada uma prevalência de 8,57% em usuários de

drogas HIV positivos (Guimarães et al, 2001), valores que não diferem significativamente daquele encontrado na casuística geral deste trabalho (7,5%), indicando boa consistência com os dados publicados na literatura.

Entretanto, quando as prevalências sorológicas nas duas cidades estudadas foram analisadas individualmente, pode-se constatar uma taxa maior de infecção em Ribeirão Preto (10,7%) em relação a São Paulo – Capital (4,7%).

Acreditamos que estes resultados relacionem-se ao fato de que na amostragem oriunda de Ribeirão Preto existe um número maior de indivíduos usuários de drogas injetáveis, em comparação àqueles atendidos na Capital ($p = 0,04$).

Estes dados são também condizentes com os já descritos em outros trabalhos, associando um índice elevado de infecção por HTLV-I/II em UDIV portadores do HIV1 (Etzel et al, 2001; Kazanji M & Gessain A, 2003).

Em especial, a infecção pelo vírus linfotrópico de células T humanas tipo II pode ser encontrada em áreas urbanas dos Estados Unidos e Europa, onde Espanha e Itália são os países mais afetados. O vírus linfotrópico de células T humanas tipo II também é endêmico nas populações indígenas que vivem na América do Sul e Central, entre tribos Pigmeus da África Central (Roucoux & Murphy, 2004).

As populações mais atingidas pela epidemia são caracterizadas pelos grupos de alto risco, principalmente usuários de drogas intravenosas co-infectados por HIV1 (Silva et al, 2005).

Em nossa população de UDIV portadores do HIV1 verificamos que o HTLV-II foi o tipo mais expressivo, perfazendo 92,3% (12/13) do total de amostras amplificadas e seqüenciadas para a região LTR, em acordo com vários trabalhos publicados (Zunt JR et al, 2006; Toro C et al, 2005). Apenas 1 indivíduo (7,7%) apresentou reação de amplificação positiva para LTR de HTLV-I, sendo o isolado caracterizado como pertencente ao genótipo *la*, o mais comum em nosso país (Segurado *et al*, 2002).

Com relação aos genótipos de HTLV-II, até então apenas o subtipo *c* havia sido descrito na população brasileira (incluindo índios da região amazônica, doadores de sangue, e usuários de drogas intravenosas de áreas urbanas), dado este também concordante com o encontrado neste trabalho onde pudemos constatar apenas a presença do subtipo *c* de HTLV-II.

Entretanto, recentemente análises filogenéticas da região LTR de HTLV-II de 12 doadores de sangue de Porto Alegre demonstraram que sete isolados segregaram com cepas HTLV-IIb de índios Americanos, e cinco destes isolados segregaram com o subgrupo Brasileiro HTLV-IIc. Tanto o HTLV-IIc como IIb foram considerados endêmicos na região, e podem ter sido inseridos através de processos migratórios ancestrais humanos pela Costa do Pacífico ou via bacia Amazônica, sendo este o primeiro relato demonstrando a presença do HTLV-IIb entre a população urbana do Brasil (Renner JD et al, 2006).

Nossas análises estatísticas revelaram três associações significativamente importantes, das quais a primeira, relacionando uma

maior soroprevalência de HTLV-I/II a cidade de ribeirão Preto em comparação com São Paulo - Capital, foi discutida anteriormente.

As outras duas associações dizem respeito à alta correlação da história do uso de drogas injetáveis com a infecção por HTLV-I/II e mais especificamente ao subtipo **IIc**, aliada a expressiva relação entre a infecção por HTLV-IIc e a elevada presença de anticorpos anti HCV fortemente sugestiva de transmissão via prática de uso de drogas injetáveis, resultados bastante compatíveis com os registrados na literatura (Morimoto HK, et al, 2005; Hisada M, 2003).

As informações sobre comportamento sexual e marcadores sorológicos para doenças sexualmente transmissíveis não apresentaram correlação com uma maior susceptibilidade a infecção por HTLV-I/II ou pelo subtipo **IIc**, estando estes resultados em concordância com os previamente publicados (Etzel A et al, 2001).

Através dos nossos dados pudemos associar seguramente a infecção por HTLV-II subtipo **c** ao uso de drogas injetáveis, mostrando que este genótipo pode ser usado como um marcador importante para este fator de risco.

No entanto, recentes pesquisas demonstraram pela primeira vez a presença do subtipo HTLV-IIb em populações urbanas brasileiras, indicando que muito provavelmente a dinâmica da infecção por este agente esteja em fase de modificação, e que talvez outras medidas preventivas de saúde pública para o controle da disseminação destes vírus e outros que possuam mecanismos semelhantes de transmissão devam ser adotadas.

6 CONCLUSÕES

1. A soroprevalência para HTLV-I/II entre infectados por HIV1 foi de 7,5% e não diferiu significativamente das mensuradas em trabalhos anteriormente publicados.
2. A infecção por HTLV-I/II é maior em indivíduos HIV1 positivos com histórico de uso de drogas injetáveis.
3. O HTLV-II subtipo *c* foi o predominante em nossa casuística, e a infecção por esta variante está fortemente relacionada ao uso de drogas injetáveis, com altos índices de soropositividade para anticorpos anti HCV suportando esta hipótese.
4. A transmissão via sexual não apresentou correlação estatística, sendo desconsiderada como um fator de risco para aquisição da infecção por HTLV-I/II em nossa amostragem.

7 BIBLIOGRAFIA

Bastian, I., J. Gardner, et al. Isolation of a human T-lymphotropic virus type I strain from Australian aboriginals. *J Virol*, v.67, n.2, Feb, p.843-51. 1993.

Blank, A., K. Yamaguchi, et al. Report of the Fifth International Conference on Human Retrovirology: Human T-cell Lymphotropic Virus. *Jpn J Clin Oncol*, v.23, n.2, Apr, p.134-42. 1993.

Bovolenta, C., E. Pilotti, et al. Retroviral interference on STAT activation in individuals coinfecting with human T cell leukemia virus type 2 and HIV-1. *J Immunol*, v.169, n.8, Oct 15, p.4443-9. 2002.

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

Cann, A. J., I.S.Y .CHEN. Human T-cell Leukemia virus types I and II. In: Fields BN, Knipe DN, Howley PM et al (Ed.). *Fields Virology*. 3rd Edition. Philadelphia: Haven Publishers, v. 2, p. 1849 – 79. 1996.

Carneiro-Proietti, A. B., B. Catalan-Soares, et al. Human T cell lymphotropic viruses (HTLV-I/II) in South America: should it be a public health concern? *J Biomed Sci*, v.9, n.6 Pt 2, Nov-Dec, p.587-95. 2002.

Carneiro-Proietti, A. B., B. C. Catalan-Soares, et al. HTLV in the Americas: challenges and perspectives. *Rev Panam Salud Publica*, v.19, n.1, Jan, p.44-53. 2006.

Catalan-Soares, B. C., F.A. Proietti & Carneiro-Proietti, A. B. F. Os vírus linfotrópicos de células T humanos (HTLV) na última década (1990-2000): Aspectos epidemiológicos. *Rev. Bras. Epidemiol.* v. 4, n 2. 2001.

Chen, J., L. Zekeng, et al. HTLV type I isolated from a Pygmy in Cameroon is related to but distinct from the known central African type. *AIDS Res Hum Retroviruses*, v.11, n.12, Dec, p.1529-31. 1995.

Coffin, J. M. Retroviridae: the viruses and their replication. In Fields BN, Knipe DM, Howley PM et al (Ed.). *Fields Virology*. 3rd edition. Philadelphia: Raven Publishers; v.2, p. 1767 – 847. 1996

Dooneief, G., R. Marlink, et al. Neurologic consequences of HTLV-II infection in injection-drug users. *Neurology*, v.46, n.6, Jun, p.1556-60. 1996.

Dube, D. K., M. P. Sherman, et al. Genetic heterogeneity in human T-cell leukemia/lymphoma virus type II. *J Virol*, v.67, n.3, Mar, p.1175-84. 1993.

Eiraku, N., P. Novoa, et al. Identification and characterization of a new and distinct molecular subtype of human T-cell lymphotropic virus type 2. *J Virol*, v.70, n.3, Mar, p.1481-92. 1996.

Etzel, A., G. Y. Shibata, et al. HTLV-1 and HTLV-2 infections in HIV-infected individuals from Santos, Brazil: seroprevalence and risk factors. *J Acquir Immune Defic Syndr*, v.26, n.2, Feb 1, p.185-90. 2001.

Ferreira, S., S. Sanabani, et al. Human herpesvirus type 8 among Brazilian blood donors. *Transfusion*, v.43, n.12, Dec, p.1764-5. 2003.

Franchini, G. Molecular mechanisms of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I infection. *Blood*, v.86, n.10, Nov 15, p.3619-39. 1995.

Gallo, R. C. Human retroviruses after 20 years: a perspective from the past and prospects for their future control. *Immunol Rev*, v.185, Jul, p.236-65. 2002.

Galvao-Castro, B., L. Loures, et al. Distribution of human T-lymphotropic virus type I among blood donors: a nationwide Brazilian study. *Transfusion*, v.37, n.2, Feb, p.242-3. 1997.

Guimaraes, M. L., F. I. Bastos, et al. Retrovirus infections in a sample of injecting drug users in Rio de Janeiro City, Brazil: prevalence of HIV-1 subtypes, and co-infection with HTLV-I/II. *J Clin Virol*, v.21, n.2, May, p.143-51. 2001.

Hisada, M., N. Chatterjee, et al. Increased hepatitis C virus load among injection drug users infected with human immunodeficiency virus and human T lymphotropic virus type II. *J Infect Dis*, v.188, n.6, Sep 15, p.891-7. 2003.

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

Kazanji, M., B. Benoit, et al. Molecular characterization and phylogenetic analysis of a human T cell leukemia virus type 2 strain from French Guiana. *AIDS Res Hum Retroviruses*, v.17, n.6, Apr 10, p.563-8. 2001.

Kazanji, M. e A. Gessain. Human T-cell Lymphotropic Virus types I and II (HTLV-I/II) in French Guiana: clinical and molecular epidemiology. *Cad Saude Publica*, v.19, n.5, Sep-Oct, p.1227-40. 2003.

Koralnik, I. J., J. F. Lemp, Jr., et al. In vitro infection of human macrophages by human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I (HTLV-I). *AIDS Res Hum Retroviruses*, v.8, n.11, Nov, p.1845-9. 1992.

Laurentino, R. V., I. G. Lopes, 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*, v.100, n.4, Jul, p.371-6. 2005.

Lewis, M. J., P. Novoa, et al. Isolation, cloning, and complete nucleotide sequence of a phenotypically distinct Brazilian isolate of human T-lymphotropic virus type II (HTLV-II). *Virology*, v.271, n.1, May 25, p.142-54. 2000.

Lowis, G. W., W. A. Sheremata, et al. Epidemiologic features of HTLV-II: serologic and molecular evidence. *Ann Epidemiol*, v.12, n.1, Jan, p.46-66. 2002.

Mahieux, R., F. Ibrahim, et al. Molecular epidemiology of 58 new African human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) strains: identification of a new and distinct HTLV-1 molecular subtype in Central Africa and in Pygmies. *J Virol*, v.71, n.2, Feb, p.1317-33. 1997.

Marchioli, C. C., J. L. Love, et al. Prevalence of human herpesvirus 8 DNA sequences in several patient populations. *J Clin Microbiol*, v.34, n.10, Oct, p.2635-8. 1996.

Miura, T., M. Yamashita, et al. Molecular phylogeny of human T-cell leukemia virus type I and II of Amerindians in Colombia and Chile. *J Mol Evol*, v.44 Suppl 1, p.S76-82. 1997.

Morimoto, H. K., A. Caterino-De-Araujo, et al. Seroprevalence and risk factors for human T cell lymphotropic virus type 1 and 2 infection in human immunodeficiency virus-infected patients attending AIDS referral center health units in Londrina and other communities in Parana, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses*, v.21, n.4, Apr, p.256-62. 2005.

Murphy, E. L. The clinical epidemiology of human T-lymphotropic virus type II (HTLV-II). *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, v.13 Suppl 1, p.S215-9. 1996.

Murphy, E. L., R. Mahieux, et al. Molecular epidemiology of HTLV-II among United States blood donors and intravenous drug users: an age-cohort effect for HTLV-II RFLP type aO. *Virology*, v.242, n.2, Mar 15, p.425-34. 1998.

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

Posada, D. e K. A. Crandall. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, v.14, n.9, p.817-8. 1998.

Renner, J. D., J. P. Laurino, et al. Molecular evidence of HTLV-II subtype B among an urban population living in South Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses*, v.22, n.4, Apr, p.301-6. 2006.

Rogers, J. S. e D. L. Swofford. A fast method for approximating maximum likelihoods of phylogenetic trees from nucleotide sequences. *Syst Biol*, v.47, n.1, Mar, p.77-89. 1998.

Roman, G. C. e M. Osame. Identity of HTLV-I-associated tropical spastic paraparesis and HTLV-I-associated myelopathy. *Lancet*, v.1, n.8586, Mar 19, p.651. 1988.

Roucoux, D. F. e E. L. Murphy. The epidemiology and disease outcomes of human T-lymphotropic virus type II. *AIDS Rev*, v.6, n.3, Jul-Sep, p.144-54. 2004.

Salemi, M., A. M. Vandamme, et al. Complete nucleotide sequence of the Italian human T-cell lymphotropic virus type II isolate Gu and phylogenetic identification of a possible origin of South European epidemics. *J Gen Virol*, v.77 (Pt 6), Jun, p.1193-201. 1996.

Salemi, M., S. Van Dooren, et al. Two new human T-lymphotropic 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, Jul 5, p.277-87. 1998.

Salemi, M., M. Lewis, et al. Different population dynamics of human T cell lymphotropic virus type II in intravenous drug users compared with endemically infected tribes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.96, n.23, Nov 9, p.13253-8. 1999.

Segurado, A. A., C. Biasutti, et al. Identification of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) subtypes using restricted fragment length polymorphism in a cohort of asymptomatic carriers and patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis from

Sao Paulo, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.97, n.3, Apr, p.329-33. 2002.

Seiki, M., S. Hattori, et al. Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. Proc Natl Acad Sci U S A, v.80, n.12, Jun, p.3618-22. 1983.

Shimotohno, K., Y. Takahashi, et al. Complete nucleotide sequence of an infectious clone of human T-cell leukemia virus type II: an open reading frame for the protease gene. Proc Natl Acad Sci U S A, v.82, n.10, May, p.3101-5. 1985.

Shindo, N., L. C. Alcantara, et al. Human retroviruses (HIV and HTLV) in Brazilian Indians: seroepidemiological study and molecular epidemiology of HTLV type 2 isolates. AIDS Res Hum Retroviruses, v.18, n.1, Jan 1, p.71-7. 2002.

Silva, A. F., C. Almeida, et al. Prevalence and molecular characterization of human T cell leukemia virus type 2 in a group of intravenous drug users coinfecting with HIV type 1 in Portugal. AIDS Res Hum Retroviruses, v.21, n.4, Apr, p.249-55. 2005.

Sodroski, J. G., W. C. Goh, et al. trans-Activation of the human T-cell leukemia virus long terminal repeat correlates with expression of the x-lor protein. J Virol, v.55, n.3, Sep, p.831-5. 1985.

Switzer, W. M., D. Pieniazek, et al. Phylogenetic relationship and geographic distribution of multiple human T-cell lymphotropic virus type II subtypes. J Virol, v.69, n.2, Feb, p.621-32. 1995.

Switzer, W. M., F. L. Black, et al. Endemicity and phylogeny of the human T cell lymphotropic virus type II subtype A from the Kayapo

Indians of Brazil: evidence for limited regional dissemination. *AIDS Res Hum Retroviruses*, v.12, n.7, May 1, p.635-40. 1996.

Taylor, G. P. The epidemiology of HTLV-I in Europe. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, v.13 Suppl 1, p.S8-14. 1996.

Thompson, J. D., T. J. Gibson, et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, v.25, n.24, Dec 15, p.4876-82. 1997.

Toro, C., B. Rodes, et al. [HIV-2 and HTLV-I/II infections in Spain]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, v.22, n.3, Mar, p.177-82. 2004.

Toro, C., B. Rodes, et al. Molecular epidemiology of HTLV-2 infection among intravenous drug users in Spain. *J Clin Virol*, v.33, n.1, May, p.65-70. 2005.

Vallejo, A., P. Ferrante, et al. Nucleotide sequence and restriction fragment-length polymorphism analysis of human T-cell lymphotropic virus type II (HTLV-II) in southern Europe: evidence for the HTLV-IIa and HTLV-IIb subtypes. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, v.13, n.4, Dec 1, p.384-91. 1996.

Vallinoto, A. C., M. O. Ishak, et al. Molecular epidemiology of human T-lymphotropic virus type II infection in Amerindian and urban populations of the Amazon region of Brazil. *Hum Biol*, v.74, n.5, Oct, p.633-44. 2002.

Vandamme, A. M., H. F. Liu, et al. Primate T-lymphotropic virus type I LTR sequence variation and its phylogenetic analysis: compatibility with an African origin of PTLV-I. *Virology*, v.202, n.1, Jul, p.212-23. 1994.

Vandamme, A. M., M. Salemi, 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*, v.72, n.5, May, p.4327-40. 1998.

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

Yamashita, M., E. Ido, et al. Molecular epidemiology of HTLV-I in the world. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, v.13 Suppl 1, p.S124-31. 1996.

Yoshida, M. HTLV-1 oncoprotein Tax deregulates transcription of cellular genes through multiple mechanisms. *J Cancer Res Clin Oncol*, v.121, n.9-10, p.521-8. 1995.

Zehender, G., C. De Maddalena, et al. High prevalence of human T cell lymphotropic virus type II infection in patients affected by human immunodeficiency virus type 1--associated predominantly sensory polyneuropathy. *J Infect Dis*, v.172, n.6, Dec, p.1595-8. 1995.

Zehender, G., C. Colasante, et al. Increased risk of developing peripheral neuropathy in patients coinfecting with HIV-1 and HTLV-2. *J Acquir Immune Defic Syndr*, v.31, n.4, Dec 1, p.440-7. 2002.

Zunt, J. R., K. Tapia, et al. HTLV-2 infection in injection drug users in King County, Washington. *Scand J Infect Dis*, v.38, n.8, p.654-63. 2006.