

**Universidade Federal da Bahia
Instituto de Ciências da Saúde**



**PMBqBM
Programa Multicêntrico de
Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular**

Jéssica Lais Almeida dos Santos

**ORIGEM E EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO HTLV-1
NA BAHIA: UM PLANO PILOTO**

**Salvador
2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**Curso de Pós-graduação
Programa Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular**

JÉSSICA LAÍS ALMEIDA DOS SANTOS

**ORIGEM E EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO HTLV-1 NA
BAHIA: UM PLANO PILOTO**

**Dissertação apresentada ao curso
de Pós-graduação Programa
Multicêntrico em Bioquímica e
Biologia Molecular para obtenção
do Título de Mestre.**

**Orientadora: Profa. Dra. Aline Cristina Andrade Mota
Miranda Mascarenhas**

Co-orientadora: Profa. Dra. Helena Nader

SALVADOR-BA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Processamento Técnico, Biblioteca Universitária de Saúde,
Sistema de Bibliotecas da UFBA

S237 Santos, Jéssica Laís Almeida dos.

Origem, epidemiologia molecular do HTLV-1 na Bahia: um plano piloto / Jéssica Laís Almeida dos Santos. - Salvador, 2016.
106 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Aline Cristina Andrade Mota Miranda Mascarenhas ; Coorientadora: Profa. Dra. Helena Bonciani Nader.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde, Salvador; Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, São Paulo, Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular (PMBqBM), 2016.

Área de concentração: Bioquímica e Biologia Molecular.
Linha de pesquisa: Genômica Funcional (GF).

1. Vírus 1 Linfotrópico T Humano - Historia. 2. Infecções por HTLV-I - Epidemiologia - Bahia, Brasil. 3. Sequências repetidas terminais. 4. Epidemiologia molecular. 5 Vírus de RNA. 6. Virologia. I. Mascarenhas, Aline Cristina Andrade Mota Miranda. II. Nader, Helena Bonciani. III. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde. IV. Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. V. Título.

CDU: 575.111

"Quando você acha que sabe todas as perguntas,
vem a vida e muda todas as respostas"

Bob Marley

Dedico este trabalho aos meus pais,
Gílson Luíz Ramos dos Santos e Simone Raimunda Almeida dos
Santos, pelo incentivo e apoio em todas as minhas escolhas e decisões.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ser a luz do meu caminho, minha força e meu norte.

Aos meus pais, Gilson e Simone, pelo amor incondicional, pelo suporte e por ter doado suas vidas para minha felicidade.

Aos meus irmãos Igor e Dênisson, pelo incentivo e torcida.

À toda a minha família pela força e torcida.

À Pablo Arturo pelo companheirismo e apoio.

À minha orientadora, a professora Dra. Aline Miranda Mascarenhas, por todos os ensinamentos, oportunidades e confiança no meu trabalho, bem como, toda doçura e competência profissional.

À minha co-orientadora Dra. Helena Nader pela importante colaboração.

Ao Dr. Bernardo Galvão Castro Filho pela oportunidade de realizar o trabalho, pelo desenho de estudo e concepção dele e por todos os ensinamentos.

À toda equipe do Centro Integrativo Multidisciplinar de HTLV (CHTLV): em especial à Viviana Olavarria pelo suporte diário, à Noilson Gonçalves pelo auxílio no manejo dos pacientes e a Cláudio Paulo pelo apoio dado. Obrigada pelo carinho de todos os profissionais ali presentes.

A Thessika Hiala Almeida Araújo (Laboratório de Hematologia, Genética e Biologia Computacional/FIOCRUZ-Ba), Luciane Amorim Santos (Laboratório de Imunoparasitologia/FIOCRUZ-Ba) e Marta Giovanetti (Laboratório de Hematologia, Genética e Biologia Computacional/FIOCRUZ-Ba) pela dedicação e pelo suporte técnico/científico dado durante todos os momentos.

Ao Dr. Luiz Carlos Júnior Alcântara, pelo suporte nas análises de Bioinformática.

A Evelin Costa e Davi Nascimento, pela iniciação científica deste estudo.

Ao PMBqBM por toda estrutura e ensinamento, em especial a Professora Dra. Luzimar Gonzaga Fernandez.

Aos meus colegas do PMBqBM pela convivência, amizade e por todos os momentos incríveis que passamos, que tornaram nossa turma única.

A FAPESB pelo auxílio financeiro e pelo investimento nas atividades científicas desenvolvidas neste projeto.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

O HTLV-1 (*Human T-Cell Lymphotropic Virus*) foi o primeiro retrovírus humano a ser descrito. As principais complicações clínicas associadas ao HTLV-1 são: doenças malignas como a ATLL; síndromes inflamatórias, como a TSP/HAM; e complicações infecciosas, como a dermatite infecciosa. Estima-se que aproximadamente 15 a 20 milhões de pessoas estejam infectadas pelo HTLV em todo o mundo. Algumas áreas são, conhecidamente, endêmicas para esta infecção, sendo elas: sudoeste do Japão, África sub-Saara, regiões do Caribe, áreas localizadas no Irã e Melanésia. No Brasil, existem cerca de dois milhões de portadores do vírus. Na Bahia, estimativas indicam que a prevalência global da infecção pelo HTLV-1 na população geral de Salvador é de 1,8%. No entanto, ainda existe uma escassez de informações sobre a história evolutiva do HTLV-1 no Estado da Bahia, e a maioria dos dados sobre a epidemiologia molecular do HTLV-1 dizem respeito à isolados virais originados da cidade de Salvador, ou região metropolitana (RMS) e mais outras duas mesorregiões do estado, regiões Sul (S) e Vale do São Francisco (VSF). Em outras quatro mesorregiões nenhum outro isolado viral já foi identificado e caracterizado. Portanto, o principal objetivo deste trabalho foi investigar a origem e a disseminação do HTLV-1 na Bahia. Este estudo, de corte transversal, foi desenvolvido a partir de uma amostra de conveniência, composta por 50 amostras de indivíduos, de ambos os sexos, infectados pelo HTLV-1 que nasceram e residem no estado da Bahia, separadas por mesorregiões. Outras sequências LTR do vírus já disponíveis no GenBank foram utilizadas para, perfazer o maior número possível de mesorregiões a serem investigadas. Deste modo, 78 sequências LTR do HTLV-1 foram analisadas neste estudo. Inicialmente, o DNA genômico foi extraído utilizando kit de extração e submetido à nested-PCR para a região LTR. Os produtos da PCR foram purificados e sequenciados. Das 50 amostras selecionadas para a busca pelo HTLV-1, apenas foi possível gerar 11 sequências LTR do HTLV-1, e portanto, foi possível identificar a infecção em outras duas mesorregiões: nordeste (N) e centro-sul (CS). Os cálculos de diversidade genética foram feitos utilizando o modelo de distância Tamura Nei, com suporte estatístico. Três diferentes inferências filogenéticas foram realizadas: uma análise de subtipagem das novas sequências LTR do HTLV-1, uma análise filogenética apenas com sequências de isolados virais do Subtipo a, e uma última inferência filogenética, apenas com sequências de isolados virais do Subtipo a Subgrupo Transcontinental (A). Para essas inferências utilizamos de programas de bioinformática que possibilitaram alinhamento, edição e análise das sequências geradas, bem como inferir árvores filogenéticas e predizer a taxa evolutiva destes isolados. Foi possível identificar que a mesorregião que apresenta maior diversidade genética, entre suas sequências, foi a (CS), seguida da região N, enquanto as regiões S e RMS apresentaram resultados semelhantes. A análise filogenética, para subtipagem, das novas 11 sequências LTR do HTLV-1, geradas neste trabalho, demonstrou que todas elas pertencem ao subgrupo Transcontinental (A), do subtipo Cosmopolita (a). As sequências LTR do HTLV-1 originadas da mesorregião VSF apresentaram diferentes características filogenéticas, e as sequências originadas de casos de infecção RMS tiveram uma distribuição difusa no subgrupo Transcontinental, formando grupamentos com sequências originadas de diferentes regiões do país. No entanto, 32 (74,4%) sequências, se posicionaram em clados mais ancestrais do subgrupo. Fenômeno semelhante foi observado com a distribuição das sequências originadas de casos de infecção do Sul do estado. Também, a partir desta análise, é possível observar que houve a formação de cluster único com as sequências do N e CS (Bootstrap entre 50% e 74%). Todas as sequências originadas do CS mostraram proximidade filogenética com sequências do Sul do estado. O valor encontrado para a taxa evolutiva foi de 1.0×10^{-4} substituição/sítio/ano (95% IC: 4.2752E-6, 2.7948E-4). Por isso, as principais conclusões são: identificação de 11 novos isolados virais, originados de casos de infecção pelo HTLV-1 em diferentes mesorregiões do Estado

da Bahia; com a caracterização filogenética, percebemos que todos pertencem ao subtipo a, subgrupo A; sendo possível identificação da presença do Subtipo a/Subgrupo A nas mesorregiões N e CS; as sequências LTR do HTLV-1, originadas de casos de infecção na mesorregião RMS, revelam características de ancestralidade destas sequências em comparação com as de outras mesorregiões, sugerindo a introdução do HTLV-1 a partir dessa mesorregião; As sequências LTR do HTLV-1, originadas de casos de infecção na mesorregião S, apresentaram características semelhantes as sequências da RMS, o que pode sugerir origem dessas sequências na RMS, ou até introduções semelhantes nestas duas mesorregiões;- proximidade filogenética das sequências LTR do HTLV-1, originadas de casos de infecção das mesorregiões N, CS e S, sugere rotas migratórias populacionais entre elas.

Palavras-chave: Origem, Epidemiologia Molecular, HTLV-1, LTR, mesorregião e Bahia.

ABSTRACT

The Human T-Cell Lymphotropic Virus (HTLV-1) was the first human retrovirus to be identified. HTLV-1 is classically the etiological agent of TSP/HAM, and it has also been implicated as the cause of ATLL and of other inflammatory disorders. Data estimate that 15 to 20 million people are HTLV-1 infected around the world. Some areas are known to be endemic for this infection, and they are: south-west of Japan, Africa Sub-Saharan, regions of Caribe, and some areas from Irã and Melanesia. In Brazil, around 2 million people are HTLV-1 infected, and at the Bahia state the seroprevalence of HTLV-1 infection, at general population, is about 1.8%. However there are few information about the evolutive history of HTLV-1 in the Bahia state, and the majority of HTLV-1 epidemiological data are related to viral isolates from Salvador, or Metropolitan Region (SMR), and from two others mesoregions, South (S) and San Francisco Valley (SFV). Any HTLV-1 isolate was already identified or characterized at the four others mesoregion from Bahia state. Therefore, the main of this study was to investigate the origin, epidemiology and dissemination of HTLV-1 at Bahia State. This study, cross-sectional, was developed from a convenience sample consisting of 50 samples of individuals of both sexes infected with HTLV-1 who were born and reside in the state of Bahia, separated by mesoregions. Others HTLV-1 LTR sequences, already available at Genbank, were used to increase the number of mesoregions to be investigated. That way 78 HTLV-1 LTR sequences were analyzed at this study. DNA was extracted using spin column and submitted to a nested-PCR using the HTLV-1 long terminal repeat (LTR) 5' region primers. All PCR products were purified and submitted to sequencing. From 50 blood samples, only 11 HTLV-1 LTR sequences were generated, and therefore, it was possible to identify the HTLV-1 infection in two others mesoregions: Northeast (N) and South center (SC). The mean inter-patient genetic distances were measured using the Tamura Nei model. Three different phylogenetic analyses were performed: the first analysis was carried out to identify the subtype of the new LTR sequences, generated in this study; a second analysis was performed using only sequences from subtype a, and the third analysis using only sequences from Subtype a Subgroup A. For these inferences use of bioinformatics programs that allowed alignment, editing and analysis of the generated sequences and infer phylogenetic trees and predicting the evolutionary rate of these isolates. From 50 blood samples, only 11 HTLV-1 LTR sequences were generated, and therefore, it was possible to identify the HTLV-1 infection in two others mesoregions: Northeast (N) and South center (SC). It was possible to identify that the mesoregion SC showed the highest genetic diversity among sequences, while the N region was the second with the highest diversity. The subtyping analysis of the new 11 HTLV-1 LTR sequences, generated at this study, showed that all of them are classified as subtype a, subgroup A. The HTLV-1 LTR sequences from SFV region showed distinct phylogenetic behaviors, and HTLV-1 LTR sequences from SMR revealed a diffuse distribution at the Transcontinental Subgroup, forming clusters with sequences originated from Brazil different regions. However 32 sequences (74.4%), were positioned in ancestors clades of subgroup. A similar phenomenon was observed in the distribution of the sequences originating from cases of infection from South region. We can also see that there was a single cluster with the sequences of N and SC regions (Bootstrap between 50% and 74%). All of sequences originated from SC region showed phylogenetic proximity with the

sequences from S region. The HTLV-1 evolutive rate, estimated at this study, was 1.0×10^{-4} substitutions/site/year (95% CI: 4.2752E-6, 2.7948E-4). That is why the major conclusions, of this study, are: - identification of 11 new viral isolates, originated of cases of infection at different mesoregions of Bahia state; - phylogenetic characterization of these 11 new isolates, as subtype a Subgroup A; - the first identification of presence of Subtype a/Subgroup A at mesoregions N and SC; - the HTLV-1 LTR sequences originated from mesoregion SMR showed higher ancestry, in comparison with sequences from others mesoregions, what suggest a possible introduction of HTLV-1, in the state, through this mesoregion; - the HTLV-1 LTR sequences originated from S mesoregion showed similar characteristics in comparison to SMR mesoregion sequences, suggesting a possible origin of these sequences at the SMR or similar introductions of the virus in these mesoregions; - phylogenetic proximity of HTLV-1 LTR sequences, originated from cases of infection in N, SC and S mesoregions, which suggests population migration routes between them.

LISTA DE FIGURAS E QUADROS

Figura 1: Fluxograma simplificado sobre o diagnóstico do HTLV (Adaptado de CARNEIRO-PROIETTI et al, 2002).	16
Figura 2: Estrutura do HTLV-1 (Adaptado do PROIETTI et al, 2006).....	17
Figura 3: Estrutura genômica do HTLV-1 e seus transcritos (Adaptado de Edwards et al, 2011).....	19
Figura 4: Distribuição mundial dos subtipos e subgrupos do HTLV-1 (Adaptado de PROIETTI et al, 2005).	21
Figura 5: Distribuição do HTLV-1 no mundo (Adaptado de MOTA-MIRANDA, 2012).	25
Figura 6: Prevalência de HTLV-1/2 entre doadores de sangue em capitais de 26 estados brasileiros e no Distrito Federal (Adaptado de CATALAN-SOARES et al.,2004).....	28
Figura 7: Distribuição das mesorregiões no território baiano. (Disponível em: https://upload.wikimedia.org).	36
Figura 8: Distribuição das 78 sequências LTR do HTLV-1 do estado da Bahia, por mesorregiões.....	48
Figura 9: Árvore de distância (<i>Neighbour Joining</i>) baseada em um fragmento de 483pb da região LTR do HTLV-1.	52
Figura 10: Árvore ML (<i>Maximum Likelihood</i>) baseada em um fragmento de 483pb da região LTR do HTLV-1 Subtipo a (Cosmopolita).....	53
Figura 11: Árvore ML (<i>Maximum Likelihood</i>) baseada em um fragmento de 483pb da região LTR do HTLV-1 Subtipo a/Subgrupo A (Cosmopolita/Transcontinental).. ..	56
Figura 12: Árvore Bayesiana baseada em um fragmento de 483pb da região LTR do HTLV-1.....	58
Figura 13: Possíveis rotas de disseminação do HTLV-1, entre as mesorregiões, do estado da Bahia.....	64
Quadro 1: Informações sobre as Sequências LTR do HTLV-1, distribuídas nas diferentes mesorregiões do Estado da Bahia.	37
Quadro 2: <i>Primers</i> utilizados nas reações de <i>Nested PCR</i> e sequenciamento.	39
Quadro 3: Número de Acesso das Sequências Referência utilizadas na Análise de Subtipagem.....	41
Quadro 4: Informações sobre as Sequências LTR do HTLV-1, das diferentes regiões do Brasil, utilizadas na Análise Filogenética do Subtipo Cosmopolita (a) e do Subgrupo Transcontinental (A).	43
Quadro 5: Tamanho e Localização Nucleotídica, em relação ao ATK1, das 11 sequências LTR do HTLV-1, geradas neste trabalho.....	47
Quadro 6: Distância p das sequências LTR do HTLV-1 dentro de cada mesorregião e entre elas (N=78).	49
Quadro 7: Distância p das sequências LTR do HTLV-1 dentro de cada mesorregião e entre elas (N=30).	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HTLV	<i>Human T-cell Lymphotropic Virus</i>	Vírus Linfotrópico de células T humanas
HTLV-1	<i>Human T-cell Lymphotropic Virus type 1</i>	Vírus Linfotrópico de células T humanas tipo 1
HTLV-2	<i>Human T-cell Lymphotropic Virus type 2</i>	Vírus Linfotrópico de células T humanas tipo 2
HTLV-3	<i>Human T-cell Lymphotropic Virus type 3</i>	Vírus Linfotrópico de células T humanas tipo 3
HTLV-4	<i>Human T-cell Lymphotropic Virus type 4</i>	Vírus Linfotrópico de células T humanas tipo 4
ATLL	<i>Adult T-cell Leukemia-Lymphoma</i>	Leucemia de células T do Adulto
STLV	<i>Simian T-Cell Leukemia Virus</i>	Vírus Linfotrópico de Células T de Símios
HEMOMINAS		Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>	Ácido ribonucleico
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>	Extremidades em repetições longas
TR		Transcriptase reversa
IN		Integrase
DNA	<i>Desoxiribonucleic Acid</i>	Ácido desoxirribonucleico
ENV		Envelope viral
gp21		Glicoproteína 21
gp46		Glicoproteína 46
ORF	<i>Open Reading Frame</i>	Fase de leitura aberta
SU		Proteína de superfície
TM		Proteína Transmembrana
GLUT-1	<i>Glucose Transporter 1</i>	Molécula Transportadora de glicose
NRP-1	<i>Neuropilin-1</i>	Neurofilina-1
HSPG	<i>Heparan Sulfate Proteoglican</i>	Proteoglicano Heparan Sulfato
mRNA		RNA mensageiro
tRNA		RNA transportador
iRNA		RNA de interferência
p15		Proteína do nucleocapsídeo
p19		Proteína da matriz
p24		Proteína do capsídeo
SUS		Sistema Único de Saúde
WB	<i>Western Blot</i>	Teste imunoenzimático
ELISA	<i>Enzyme linked Immuno Sorbent Assay</i>	Teste imunoenzimático

TSP/HAM	<i>Tropical Spastic Paraparesis/HTLV Associated Myelopathy</i>	Paraparesia Espástica Tropical/Mielopatia Associada ao HTLV
SINAN		Sistema de Informações de Agravos de Notificação
PNH		Primatas não humanos
CAR	<i>Central African Republic</i>	República Centro Africana
BEN		Benin
SEN		Senegal
IBGE		Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
CHTLV		Centro Integrativo Multidisciplinar de HTLV
TCLE		Termo de Consentimento Livre Esclarecido
Nested PCR	<i>Nested Polymerase Chain Reaction</i>	Reação em cadeia da Polimerase do tipo <i>Nested</i>
NJ	<i>Neighbor-Joining</i>	Método de Inferência filogenética “Agrupamento de Vizinhos”
ML	<i>Maximum-Likelihood</i>	Método de Inferência filogenética “Máxima Verossimilhança”
Nm		Nanômetros
pb		Pares de bases
kDA		Kilodalton
HEMOPA		Centro de Hemoterapia e Hematologia do Pará
PTLV	<i>Primate T-cell Lymphotropic Virus</i>	Vírus Linfotrópico de células T de Primatas
WHO/OMS	World Health Organization	Organização Mundial da Saúde
HBZ	<i>HTLV-1 bZIP factor gene</i>	Gene Regulatório do HTLV-1
MTOC	<i>Microtubule-organizing center</i>	Centro de Organização Microtubular
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>	Células Mononucleares de Sangue Periférico
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>	

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	O HTLV E A INFECÇÃO	14
1.1.1	Estrutura da partícula viral	16
1.1.2	Estrutura genômica	17
1.1.2.1	Subtipos virais	19
1.1.3	Ciclo de Multiplicação Viral	21
1.1.4	Patologias associadas ao HTLV-1	23
1.2	Epidemiologia da infecção pelo HTLV-1.....	24
1.3	A origem do HTLV-1	30
2	OBJETIVOS	34
2.1	Geral	34
2.2	Específicos.....	34
3	METODOLOGIA.....	35
3.1	Amostra e Desenho do Estudo.....	35
3.2	Detecção Molecular do HTLV-1 nas amostras de Sangue Total	39
3.3	Estimativa da Distância p , entre os isolados virais das diferentes mesorregiões do estado da Bahia.....	39
3.4	Análise Filogenética dos isolados virais do HTLV-1 oriundos de casos de infecção no estado da Bahia.....	40
3.5	Análise Bayesiana das sequências LTR do HTLV-1 oriundas do estado da Bahia e Estimativa da Taxa Evolutiva a partir desses isolados virais.	44
4	RESULTADOS	46
4.1	Detecção Molecular do HTLV-1 nas amostras de Sangue Total	46
4.2	Estimativa da Distância p , entre os isolados virais das diferentes mesorregiões do estado da Bahia.....	47
4.3	Análise Filogenética dos isolados virais do HTLV-1 oriundos de casos de infecção no estado da Bahia.....	50
4.3.1	Subtipagem das sequências LTR do HTLV-1, geradas neste trabalho.....	50
4.3.2	Análise Filogenética dos isolados virais do HTLV-1 oriundos de casos de infecção no estado da Bahia, e pertencentes apenas ao Subtipo a.....	51
4.4	Análise Bayesiana das sequências LTR do HTLV-1 oriundas do estado da Bahia e Estimativa da Taxa Evolutiva a partir desses isolados virais.	57

5	DISCUSSÃO	59
6	CONCLUSÕES	67
	REFERÊNCIAS	68
	ANEXO I	76
	ANEXO II.....	82
	ANEXO III.....	92
	APÊNDICEI.....	100

1 INTRODUÇÃO

1.1 O HTLV e a infecção

O HTLV-1 (*Human T-Cell Lymphotropic Virus*) foi o primeiro retrovírus humano descrito, isolado por Poiesz e colaboradores (1980), a partir da investigação de um paciente com linfoma cutâneo de células T. Entretanto, anos antes, no sudoeste do Japão foi definida em pacientes, uma forma distinta de leucemia com características clínicas e com morfologia celular especial, nomeada de Leucemia de células T do Adulto (ATLL) (UCHIYAMA et al, 1977). Em 1980, os soros destes pacientes foram analisados, sendo positivos para anticorpos anti-HTLV-1 fornecendo evidências para a ligação do HTLV-1 às células T malignas da ATLL (GALLO et al, 1981). Em 1982, por sua vez, o HTLV-2, foi isolado de um paciente com uma forma atípica de Leucemia de células T pilosas (KALYANARAMAN et al, 1982), e mais recentemente, os isolados HTLV-3 e HTLV-4 foram descritos em indivíduos de Camarões, na África Central (WOLFE et al, 2005; CALATTINI et al, 2005). Entre os quatro tipos viriais, o HTLV-1 é considerado como principal causador de doenças graves no hospedeiro infectado (YDY et al, 2009).

O HTLV pertence à família *Retroviridae* (Família de vírus que possuem genoma constituído por RNA e que, portanto, dependem da transcrição reversa para a replicação), à subfamília *Orthoretrovirinae* e ao gênero *Deltaretrovirus*. O HTLV pertence ainda ao grupo de retrovírus, previamente identificado, como PTLV (*Primate T-cell Lymphotropic Virus*), e, portanto, a principal hipótese de transmissão viral sugere que esta deve ter ocorrido a partir de primatas não humanos infectados por STLV (*Simian T-cell Lymphotropic Virus*) através de atividades de caça e uso da carne destes animais para alimentação (SLATTERY et al, 1999).

A transmissão do HTLV-1 ocorre, principalmente, por três vias: a horizontal com o contato sexual, pela presença de linfócitos infectados no sêmen e na secreção vaginal; a vertical (da mãe para o filho) por meio da transmissão transplacentária durante o parto e pela amamentação; e por fim, a parenteral, que ocorre através da transfusão de sangue contaminado e uso de

seringas contaminadas (SANTOS et al, 2005). Estima-se que existe cerca de 60% de eficiência na transmissão sexual do homem para mulher e aproximadamente 4%, quando da mulher para o homem (MOXOTO et al, 2007). Dados do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais (HEMOMINAS) mostraram que a soropositividade para o HTLV está associada especialmente à história pregressa de transfusão de sangue, ao nível educacional (socioeconômico) dos infectados e ao uso de drogas ilegais endovenosas, o que demonstra a importância de um monitoramento e refinamento do processo de seleção dos doadores de sangue (DOS SANTOS et al, 2009).

Partindo do pressuposto de que a maioria das proteínas virais é imunogênica e que, portanto, anticorpos são produzidos para reagir contra elas, estes são detectados no soro de indivíduos infectados pelo HTLV, o que torna viável a existência dos testes sorológicos para diagnóstico, como ELISA e *Western Blot* (WB) (CONSTATINE et al, 1992).

O diagnóstico sorológico da infecção pelo HTLV baseia-se na detecção de anticorpos específicos contra o vírus. Os métodos sorológicos podem ser classificados em duas categorias: os testes de triagem e os de confirmação (**Figura 1**). Os ensaios de triagem detectam anticorpos contra o HTLV-1 e HTLV-2, porém ao serem usados em população de baixo risco como doadores de sangue, o valor preditivo positivo pode ser muito baixo, sendo necessária a confirmação do resultado por meio dos ensaios confirmatórios, que detêm maior especificidade e que podem também discriminar a presença de anticorpos específicos contra o HTLV-1 e HTLV-2. Proteínas estruturais codificadas pelos genes *gag* e *env* têm importância no reconhecimento laboratorial da infecção. A Organização Mundial de Saúde (OMS) adotou um critério que inclui a reatividade para as proteínas codificadas pelo gene *gag* (p19 e p24) e para as glicoproteínas do envelope viral (gp46 e gp21), para que uma amostra seja considerada positiva.

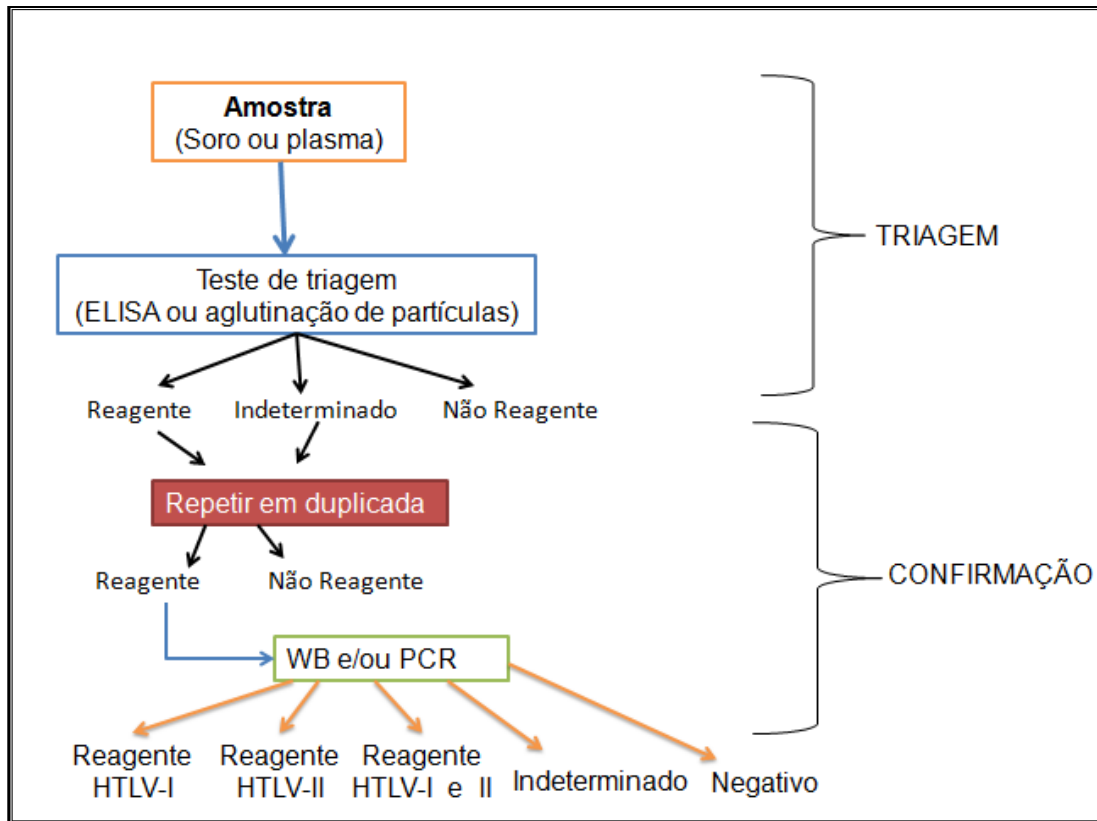


Figura 1: Fluxograma simplificado sobre o diagnóstico do HTLV
(Adaptado de CARNEIRO-PROIETTI et al, 2002).

1.1.1 Estrutura da partícula viral

O HTLV-1 é um vírus envelopado, com diâmetro de aproximadamente 100 a 140 nanômetros (nm), possui um nucleocapsídeo icosaédrico com cerca de 80 a 100 nm. O vírus possui um genoma composto por duas fitas simples de RNA (Ácido Ribonucléico) com polaridade positiva. O genoma do vírus está associado a três enzimas: transcriptase reversa, integrase e protease. Estas estão confinadas em um capsídeo viral composto pela proteína p24, que por sua vez é envolto por uma matriz proteica formada pela proteína p19. Por se tratar de um vírus envelopado, o HTLV-1 possui como camada mais externa, o envelope viral, onde se encontram as proteínas gp21 e gp46 (BEZERRA et al, 1998) **(Figura 2)**.

O HTLV-1 e o HTLV-2 têm propriedades biológicas similares incluindo o tropismo para linfócitos T, porém já se sabe que o tipo 1 infecta preferencialmente linfócitos T CD4⁺, enquanto o tipo 2 tem maior tropismo para

linfócitos T CD8⁺, gerando assim um efeito hematológico diferente do HTLV-1 (HALL et al, 1994; HASHIMOTO et al, 1998).

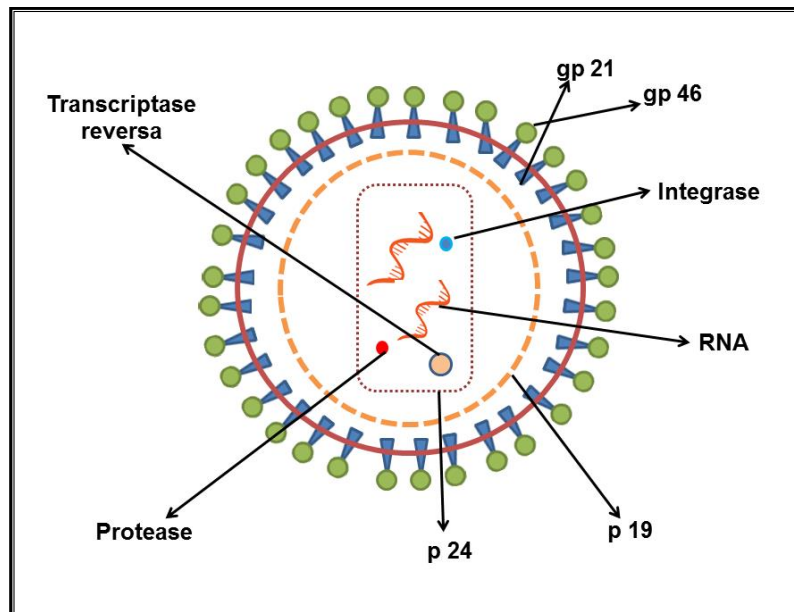


Figura 2: Estrutura do HTLV-1 (Adaptado do PROIETTI et al, 2006).

1.1.2 Estrutura genômica

O material genético do vírus é formado pelos genes *gag*, *pol*, *env* e *pX*, além de ser flanqueado por duas regiões repetidas, chamadas LTR (*Long Terminal Repeats*) (**Figura 3**), compostas por 720 pares de bases, sendo estas importantes na integração do material genômico viral no DNA cromossômico do hospedeiro e na regulação transcricional do genoma do HTLV (GREEN & CHEN, 2001; EDWARDS et al, 2011). Quando comparamos os tipos 1 e 2 do vírus observa-se diferenças principalmente no gene *pX*, sendo, no entanto, similares em cerca de 60%. O HTLV-1, HTLV-2, HTLV-3 e HTLV-4 possuem o DNA proviral de 9032, 8952, 8553 e 8791 pares de bases (pb), respectivamente (SEIKI et al, 1983; TSUJIMOTO et al, 1988; CALATTINI et al, 2005; WOLFE et al, 2005). O genoma do HTLV-1 apresenta alta estabilidade genotípica, e tal característica é provavelmente devido à replicação viral por meio da expansão clonal das células infectadas, e ao uso mínimo da transcriptase reversa (WATTEL et al, 1995; BANGHAM & OSAME, 2005). O genoma do HTLV-1 por ser considerado pouco variável, é amplamente utilizado como bom marcador molecular para traçar eventos de migração das

populações humanas ancestrais, bem como para o entendimento dos mecanismos da evolução viral e monitoramento dos meios de transmissão (GESSAIN et al, 1992).

O gene *gag* codifica as proteínas estruturais do capsídeo viral, e seu final 3' sobrepõe-se ao início da ORF (*Open Reading Frames*) que codifica para protease. Essa região é inicialmente traduzida como um precursor poliprotéico, cuja subsequente clivagem dá origem às proteínas estruturais maduras do gene *gag*: a proteína da matriz de 19kDa (p19), a proteína do capsídeo de 24 kDa (p24) e a proteína do nucleocapsídeo de 15kDa (p15). A protease atua sobre as cadeias poliprotéicas, clivando-as para formação das proteínas estruturais maduras encontradas na partícula viral.

O gene *pol* codifica as enzimas virais transcriptase reversa (TR), RNaseH e integrase (IN). A TR é responsável pela síntese do DNA (Ácido Desoxirribonucléico) viral a partir do seu genoma RNA, estando presente no cerne da partícula viral. A RNase atua na remoção da fita de RNA molde após a síntese da cadeia de DNA, degradando seletivamente o RNA da molécula híbrida DNA-RNA e, por fim, a IN, que é a enzima responsável pela integração do DNA viral no genoma da célula hospedeira. O gene *env* codifica as proteínas do envelope viral (ENV). A proteína precursora do ENV é clivada para gerar os produtos maduros, a glicoproteína de superfície (gp46 – SU) e uma proteína transmembrana (gp21- TM) (SHIMOTOHNO et al, 1993) ambas são importantes para a interação com a célula alvo e posterior infecção.

A região situada imediatamente antes da região *LTR* 3' (*Long terminal repeat*), denominada *pX*, contém 4 ORFs. A ORF-I do gene *pX* codifica a proteína p12 (KORALNIK et al, 1992; FUKUMOTO et al, 2009). As proteínas p13 e p30 são codificadas pela ORF-II do gene *pX* (KORALNIK et al, 1992; CIMINALE et al, 1992) e as proteínas Rex (p27) e Tax (p40) responsáveis pela regulação da replicação viral, são codificadas pelas ORFS III e VI, respectivamente (**Figura 3**). Tais proteínas contribuem com a infectividade viral, manutenção de altas cargas provirais, ativação e regulação da transcrição gênica (MICHAEL et al, 2004). As duas regiões LTR idênticas, localizadas nas extremidades do DNA viral, contêm regiões promotoras virais, bem como outros elementos regulatórios.

Recentemente foi identificado o gene *HBZ* (*HTLV-1 bZIP factor gene*) que é, por sua vez, codificado pela fita complementar negativa (3' → 5') na região 3'LTR do HTLV-1. Dois transcritos são gerados na codificação do HBZ: o *spliced* (sHBZ) e o *unspliced* (usHBZ) (MATSUOKA & GREEN, 2009). O transcrito sHBZ tem múltiplos sítios transcrpcionais de iniciação nos domínios U3 e U5 da região 3'LTR, enquanto que o transcrito usHBZ se inicia no gene *pX*.

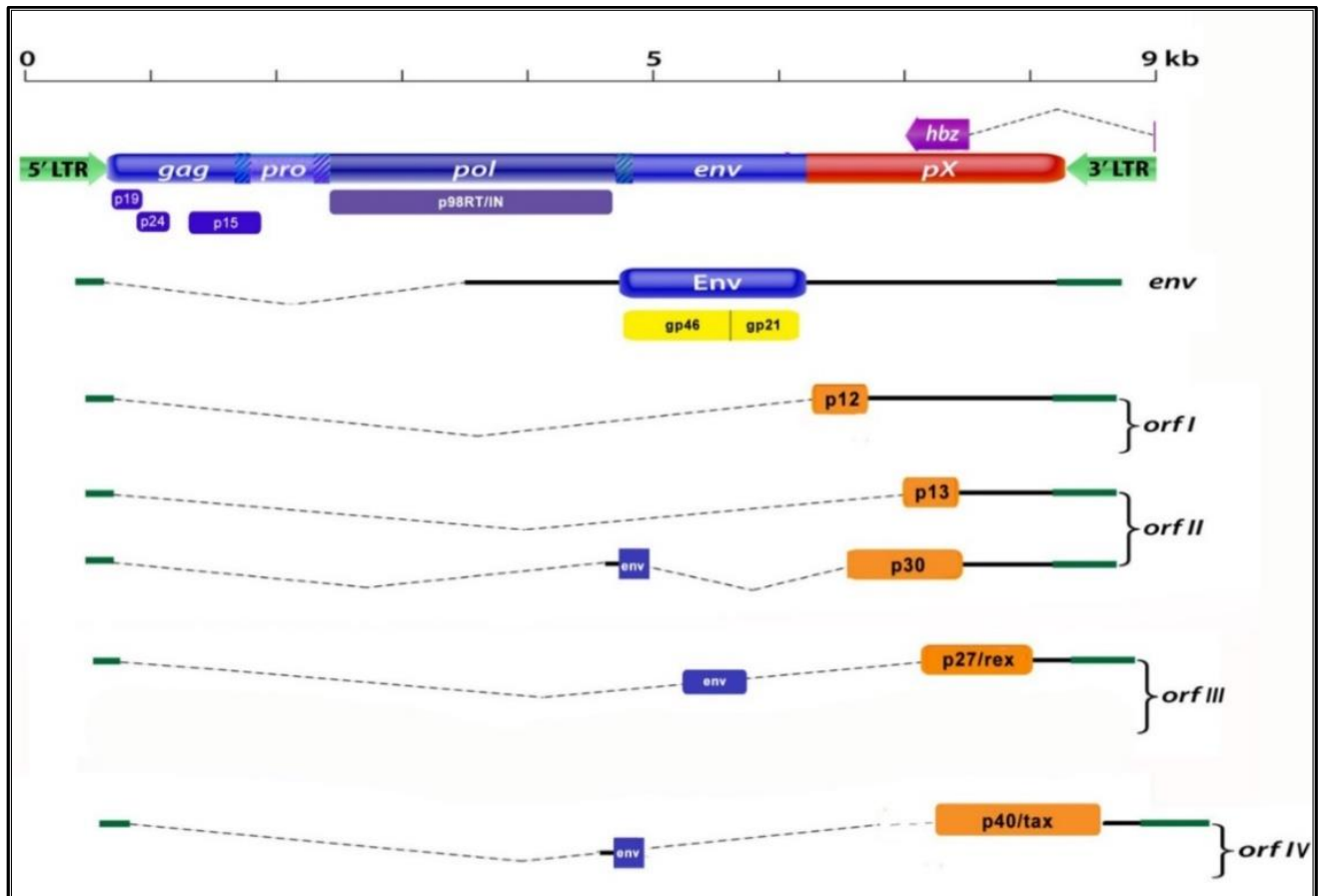


Figura 3: Estrutura genômica do HTLV-1 e seus transcritos (Adaptado de EDWARDS et al, 2011).

1.1.2.1 Subtipos virais

Estudos de caracterização molecular, no genoma viral, demonstram que as regiões LTR e em menor grau, o gene *env* do HTLV-1 apresentam maior variabilidade genômica, quando comparado com os genes *gag* e *pol* que apresentam elevada similaridade entre os diferentes isolados virais. Desta forma, as sequências LTR são preferencialmente utilizadas para a

caracterização genotípica dos subtipos virais, pois apenas com estas regiões é possível alcançar sinal filogenético (SANTOS et al, 2005).

O HTLV-1 é classificado em sete subtipos virais baseados em diferenças nas sequências da região LTR do genoma viral, sendo estratificados em: “a” ou Cosmopolita (SEIKI et al, 1982) que é encontrado em áreas endêmicas em todo o mundo; “b” ou Central Africano; “c” ou da Melanésia (GESSAIN et al, 1991); “d”, isolado de pigmeus em Camarões e no Gabão (CHEN et al, 1995; MAHIEUX et al, 1997), “e” isolado de pigmeus na República Democrática do Congo (SALEMI et al, 1998); “f”, de um indivíduo do Gabão (SALEMI et al, 1998); e “g”, recentemente descrito como um novo subtipo em Camarões, na África Central (WOLFE et al, 2005). Esta caracterização filogenética, baseada na região LTR, permite não só a classificação do HTLV-1 em sete subtipos, mas também permite a classificação do subtipo Cosmopolita em subgrupos (SANTOS et al, 2005).

O subtipo Cosmopolita (a) é dividido em 5 subgrupos, nomeados a depender da origem e identificação geográfica dos primeiros isolados (**Figura 4**): A – Transcontinental, B – Japonês, C – Oeste Africano, D – Norte Africano e E – Negro Peruano, F- Espanha (GESSAIN et al, 1991; MIURA et al, 1994 e 1997; SANTOS et al, 2005; WOLFE et al, 2005; GALVÃO-CASTRO et al, 2009; TREVINO et al, 2014).

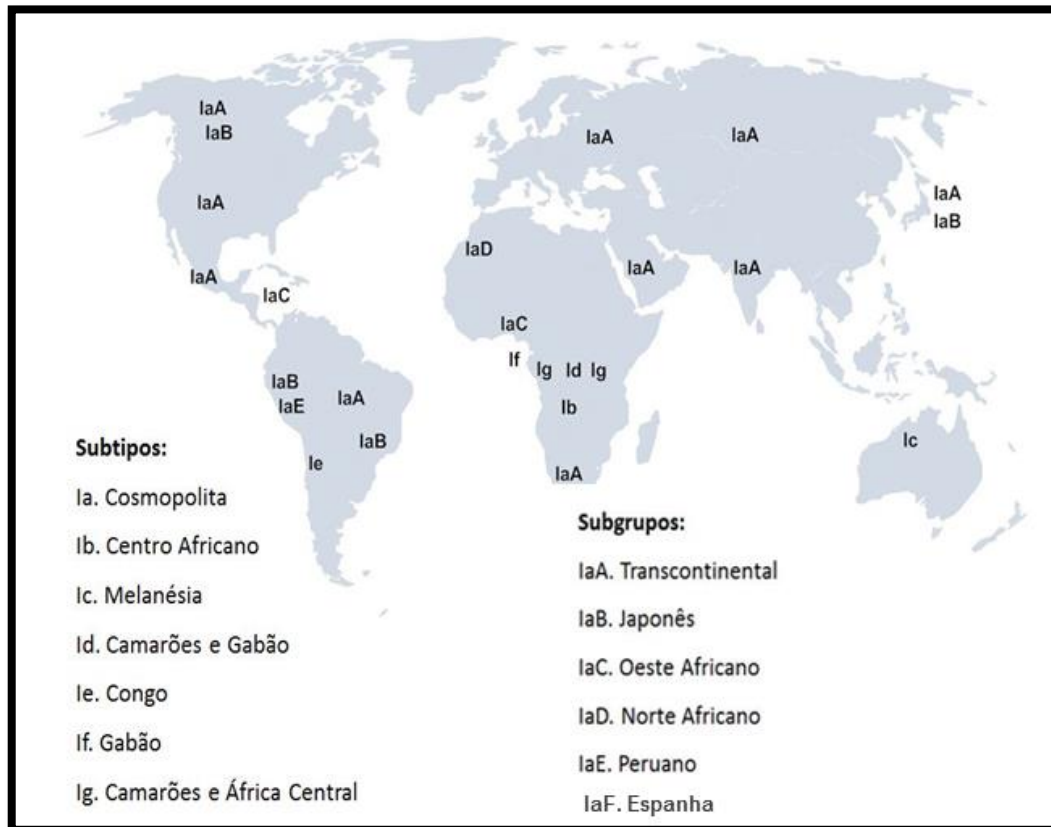


Figura 4: Distribuição mundial dos subtipos e subgrupos do HTLV-1 (Adaptado de PROIETTI et al, 2005).

1.1.3 Ciclo de Multiplicação Viral

Assim como outros retrovirus, o HTLV-1 possui seu ciclo de replicação dividido em fase precoce e tardia (MANEL et al, 2005). Sendo a fase precoce dividida nas etapas: adsorção, fusão membranar e integração ao genoma do hospedeiro. Enquanto a fase tardia se subdivide em: transcrição, tradução, empacotamento, montagem, brotamento e por fim, a etapa de maturação. A primeira etapa, a adsorção, ocorre por meio da participação de pelo menos três moléculas distintas que formam um complexo receptor: o transportador de glicose, GLUT1 (BATTINI et al, 2003; MANEL et al, 2004; COSKUN & SUTTON, 2005); a glicoproteína de superfície, neurofilina-1 (NRP-1) (GHEZ et al, 2006); e o proteoglicano, Heparan Sulfato (HSPG) (PINON et al, 2003), todas elas presentes na superfície da célula. Deste modo, muito mais que uma molécula receptora, acredita-se que seja necessário um complexo receptor na superfície da célula hospedeira, para o sucesso da infecção pelo HTLV-1. O princípio da existência deste complexo receptor se baseia na cooperação entre

as moléculas para que a infecção ocorra. Tal cooperação pode ser exemplificada pelos ensaios realizados por Jin e cols. (2009) que revelaram que a infecção pelo vírus só pode ser inibida se houver bloqueio da NRP-1 e de GLUT-1 e, além disso, das interações entre eles.

Após o processo de fusão membranar, ocorre a introdução do cerne viral no citoplasma da célula infectada. Dentro do cerne viral ocorre a retrotranscrição do genoma de RNA para DNA pela enzima transcriptase reversa, podendo assim ser integrado ao genoma do hospedeiro. A integração acontece com a utilização da proteína integrase, e assim o genoma viral é então incorporado ao genoma da célula. A fase tardia pode então acontecer, sendo esta, mediada pelas enzimas do hospedeiro. Posteriormente o RNA viral é transcrito a partir do provirus integrado. Esse transcrito primário dá origem ao mRNA e ao RNA genômico para novas partículas virais. O mRNA vai dar origem as proteínas do vírus incluindo as enzimas acessórias e o RNA genômico será empacotado, devido a regiões Psi existentes na porção terminal 5'. Um tRNA é empacotado junto com o genoma viral para servir como molde para síntese da fita negativa de DNA. Os precursores de GAG, sintetizados na etapa de tradução do mRNA vão ser clivados, liberando as proteínas da matriz (p19), proteínas do capsídeo (p24) e proteína do nucleocapsídeo (p15); estas são importantes para as etapas finais de montagem e brotamento do HTLV-1 (PROIETTI et al, 2006). Por fim, a etapa de maturação trata-se de um processo complexo que origina a partícula infecciosa. Esta última etapa consiste no processamento proteolítico de proteínas do capsídeo, que conferem a maturidade necessária para que esta partícula viral infecte novas células (MANEL et al, 2005).

Em modelos clássicos de replicação dos retrovírus, as proteínas recém-sintetizadas são montadas em novas partículas virais infectivas, que brotam da superfície celular para reiniciar o ciclo em outra célula hospedeira. No entanto, ensaios funcionais disponíveis, até o momento, sugerem que o HTLV-1 é pouco replicativo e que a replicação viral *in vivo* ocorre, principalmente, devido à expansão clonal das células infectadas, via mitose (WATTEL et al, 1995; CIMARELLI et al, 1996). Além disso, o vírus induz eventos de polarização das células facilitando a passagem viral, num fenômeno conhecido como sinapse viral (BANGHAM, 2003). Quando uma célula infectada entra em contato com

outra célula, porém, não infectada, há a formação de um centro de organização microtubular (MTOC-*Microtubule-organizing center*) que é polarizado na junção célula-célula, formando a interface onde ocorrerá a sinapse virológica. A formação desta estrutura permite o acúmulo de proteínas de GAG e de material genômico (RNA), na interface da sinapse, culminado com a passagem desse material para a célula não infectada (MATSUOKA & JEANG, 2007; MAJOROVITS et al, 2008).

1.1.4 Patologias associadas ao HTLV-1

As complicações clínicas associadas ao HTLV-1 são organizadas em três grupos: (1) doenças malignas, grupo no qual está incluída a ATLL; (2) síndromes inflamatórias, grupo que abriga a Paraparesia Espástica Tropical/Mielopatia Associada ao HTLV (TSP/HAM), uveíte e síndrome do olho seco; e por fim, (3) complicações infecciosas, como estrogiloidíase e dermatite infecciosa (MOTA-MIRANDA, 2012).

A primeira manifestação clínica que foi associada à infecção pelo HTLV-1 foi a Leucemia/Linfoma de Células T de adulto (*Adult T-cell leukemia/lymphoma*) (POIESZ et al, 1980), cujas primeiras ocorrências foram relatadas em indivíduos infectados no Japão. Posteriormente, foram descritas em 1985, a Paraparesia Espástica Tropical (*Tropical Spastic Paraparesis-TSP*), e a e Mielopatia Associada ao HTLV (*HTLV Associated Myelopathy-HAM*), em 1986, como sendo manifestações associadas ao HTLV-1 (GESSAIN et al, 1985; OSAME et al, 1986). Porém anos mais tardes, concluiu-se que se tratava da mesma etiologia e desta forma, atualmente, o HTLV-1 é conhecido como o agente etiológico de uma síndrome neurológica denominada TSP/HAM. Outras manifestações como as artropatias (NISHIOKA, 1996), polimiosites (MORGAN et al, 1989), uveítes (MOCHIZUKI et al, 1996), e dermatites infectivas (LA GRENADE, 1996) também podem estar relacionadas à infecção por este vírus.

O efeito patogênico do HTLV-1 pode estar ligado à capacidade que o vírus tem de alterar o ciclo celular. A proteína Tax composta por 353 aminoácidos (40 KDa), vêm se mostrando de interesse significativo quando falamos da patogênese do HTLV-1, uma vez que ela é um potente ativador das vias de transcrição e demonstrou ser suficiente para alterar o ciclo celular e imortalizar

as células T, *in vitro*, com conseqüente transformação celular, o que corrobora com o fato de o HTLV-1 ser o agente etiológico da ATLL. Isso porque, a proteína Tax contém domínios que permitem interagir com fatores celulares que afetam um grande número de funções celulares e produtos de reações (CURRER et al, 2012). Ela impulsiona a transformação celular através de sua capacidade de alterar a expressão celular de genes, vias de sinalização e funcionamento do ciclo celular (ANUPAM et al, 2013).

Várias proteínas derivadas do HTLV-1 além de interagir com fatores de transcrição podem manipular o ciclo de vida deste vírus pela regulação positiva ou negativa do RNA interferência (iRNA). O mecanismo de desregulação do ciclo celular por iRNA pode gerar entre outros efeitos, o silenciamento do mRNA e silenciamento de genes de transcrição, tendo como consequência alterações que podem levar a um aumento da sobrevivência celular, o que pode aumentar a capacidade de invasão, proliferação e diferenciação celular (SAMPEY et al, 2012).

1.2 Epidemiologia da infecção pelo HTLV-1

Estima-se que aproximadamente 15 a 20 milhões de pessoas estejam infectadas pelo HTLV em todo o mundo (DE THE & KAZANJI, 1996; CARNEIRO-PROIETTI et al, 2002; MOXOTO et al, 2007; ZIHLMANN et al, 2012; PESSÔA et al, 2014). As taxas de soroprevalência diferem, de acordo com a região geográfica, com a composição sócio-demográfica da população estudada e os comportamentos de risco individuais. O aumento da soroprevalência está relacionado com a idade e com o gênero do indivíduo, devido à soroconversão tardia, sendo a soropositividade para o HTLV-1 mais comum após os 40 anos, com soroprevalência mais elevada em mulheres (CARNEIRO-PROIETTI et al, 2002).

Dados epidemiológicos mostram que a infecção pelo HTLV-1 tem distribuição mundial, no entanto, algumas áreas são endêmicas para esta infecção, sendo elas: sudoeste do Japão (YAMAGUCHI et al, 1994), África sub-Saariana (DE THE et al, 1996), regiões do Caribe, áreas localizadas no Irã e Melanésia (MUELLER, 1991) (**Figura 5**).

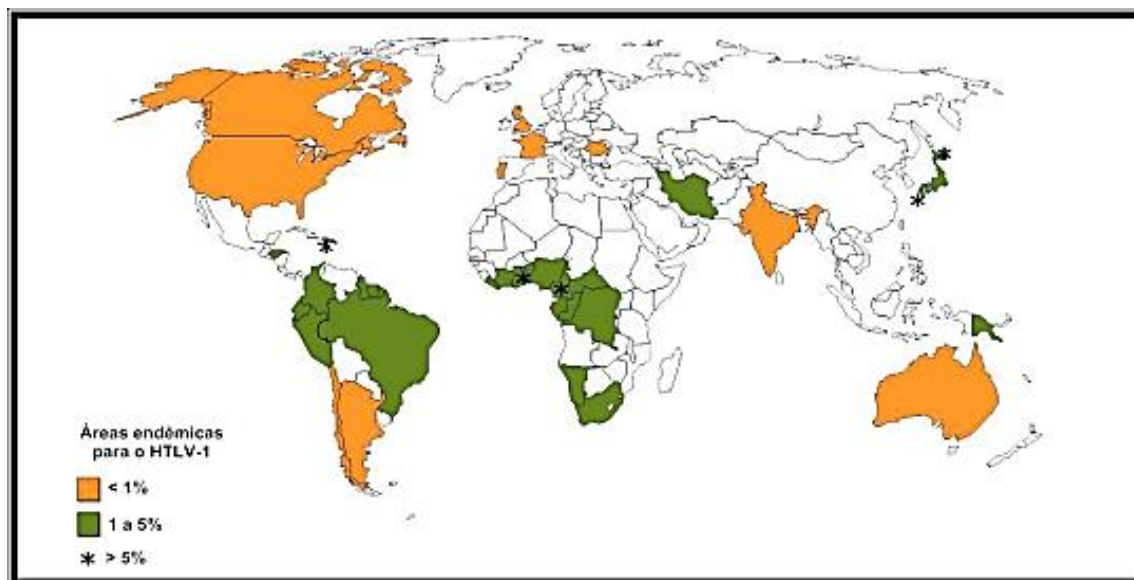


Figura 5: Distribuição do HTLV-1 no mundo (Adaptado de MOTA-MIRANDA, 2012).

O Japão, primeira área identificada como endêmica para o HTLV-1/2, possui taxas de prevalência chegando a 37%, sendo as áreas localizadas no sudoeste do país (Shikoku, Kyushu e Okinawa), as que apresentam maiores índices (CATALAN-SOARES et al, 2001). Desta forma, a maioria dos casos positivos no mundo ocorre em imigrantes japoneses, descendentes africanos, e em índios nativos (SANTOS et al, 2005).

A África, por sua vez, é notificada como área endêmica para o HTLV-1, no entanto, tomando como base estudos com grandes populações, principalmente de doadores de sangue, mulheres grávidas, adultos doentes ou grupos de controle hospitalizados, é possível ter uma noção geral sobre as cinco grandes áreas geoclimatológicas do continente (Norte da África, África Ocidental, África Central, África Oriental, e, por último Sul da África), e percebe-se a heterogeneidade na distribuição dos casos da infecção pelo HTLV-1 neste continente (GESSAIN & CASSAR, 2012). A soroprevalência do HTLV-1 em indivíduos (doadores de sangue ou poli transfundidos) no Egito, Marrocos e Tunísia (Norte da África), parece ser muito baixo, ou negativo. No Oeste da África, no entanto, a soroprevalência em doadores de sangue variou de 0,2 a 3%. Na África Central, por sua vez, destaca-se que a prevalência do HTLV-1 em adultos vivendo em Camarões varia de 0,5 a 2%, dependendo da localização geográfica, da população estudada, e do grupo étnico (FILIPPONE et al, 2012). O leste da África, com a exceção de Moçambique, parece ser

muito menos endêmica para o HTLV-1 do que a África Ocidental e Central. E por fim, no Sul da África, a soroprevalência do HTLV-1, em doadores de sangue, varia de 0 a 5% (GESSAIN & CASSAR, 2012).

De modo geral, a prevalência do HTLV-1 nas Américas é bem heterogênea. Na América do Norte, em 2001, estudo relatou que o HTLV-1 apresentou seroprevalência de 0,02% entre 21.000 doadores de sangue (POIESZ et al, 2001). No Canadá, a infecção pelo HTLV-1 parece ser rara e, portanto, o número de casos é desconhecido. Da mesma forma, no México, há pouca informação sobre a prevalência do HTLV-1 na população em geral (GESSAIN & CASSAR, 2012). A América Central, por sua vez, é composta por sete países (Belize, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicarágua e Panamá). Apesar do fato de que alguns destes países têm fortes laços comerciais e culturais com áreas endêmicas, como as ilhas do Caribe, existem relativamente poucos estudos sobre o HTLV-1 e as doenças associadas, nesta população (GESSAIN & CASSAR, 2012). Os raros estudos revelaram taxas relativamente baixas, sobre a prevalência do HTLV-1 (0,2-0,7%), entre a Nicarágua e populações adultas da Costa Rica (KHABBAZ et al, 1990; QIU et al, 2008).

A América do Sul, por sua vez, compreende 13 países, incluindo Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Colômbia, Equador, Guiana Francesa, Guiana, Paraguai, Peru, Suriname, Uruguai e Venezuela. Este vasto continente representa, como um todo, uma grande área com focos endêmicos para o HTLV-1 e doenças associadas. No Peru, na população Quechua, e também na Colômbia (Área de Tumaco) ou na Guiana Francesa (População Noir-Marron), (grupos específicos de origem Africana) representam área endêmica para esta infecção. (GESSAIN & CASSAR, 2012). No Peru, por exemplo, a prevalência para a infecção pelo HTLV-1 em doadores de sangue está entre 1,2% e 1,7%, dependendo da região (QUISPE et al, 2009) e 1,3% e 3,8% em mulheres grávidas (ALARCON et al, 2006). Na Venezuela e no Paraguai, no entanto, a soroprevalência para o HTLV-1 parece bastante baixa (GESSAIN & CASSAR, 2012), o mesmo observado, nos resultados de numerosos estudos realizados em doadores de sangue e mulheres grávidas de diferentes áreas da Argentina, onde a prevalência chega a 0,1% (CATALAN-SOARES et al, 2001).

Em 1986, o HTLV-1 foi identificado, pela primeira vez, no Brasil entre imigrantes japoneses provenientes de Okinawa, que residiam na Cidade de Campo Grande (Mato Grosso do Sul) (MOXOTO et al, 2007). No entanto, estudos epidemiológicos da infecção pelo HTLV-1/2, no Brasil, se iniciaram em 1993, após a obrigatoriedade feita pelo Ministério da Saúde quanto à triagem sorológica desse vírus em bancos de sangue. Nesta população de imigrantes japoneses vindo de Okinawa, a prevalência da infecção pelo HTLV-1 foi de 6,8% (BANDEIRA et al, 2015).

O Brasil é o país com maior número absoluto de indivíduos infectados pelo HTLV-1, onde existem cerca de dois milhões de portadores (NASCIMENTO et al, 2009). Dos Santos e cols. (2009), afirmam que a prevalência para a infecção pelo HTLV-1 varia de 0,07% a 0,13%, enquanto que a prevalência do HTLV-2 varia entre 0,02% a 0,03% de infectados. A infecção pelo HTLV-1 e pelo HTLV-2 é encontrada em todas as regiões brasileiras, com diferenças apenas em relação às prevalências que variam de um estado para o outro. Prevalências de 17,5% e 13,7% foram demonstradas em inquéritos epidemiológicos realizados em 13 populações indígenas, respectivamente, nas regiões Centro-oeste do Brasil (Mato Grosso) e Norte (Amazonas e Pará) (CATALAN-SOARES et al, 2001).

No Brasil, apesar dos dados epidemiológicos serem relativamente escassos, já que, em sua maioria, são restritos quase que exclusivamente à descrição da prevalência em populações específicas, também se pode observar o fenômeno de distribuição heterogênea do vírus, sendo as maiores prevalências observadas nos estados do Maranhão (São Luis- 10.0/1000 doadores de sangue), Bahia (Salvador-1,8% na população geral, ou 9.4/1000 doadores de sangue), Pará (Belém-9.1/1000 doadores de sangue) e Pernambuco (Recife-7.5/1000 doadores de sangue) (**Figura 6**) (DOURADO et al., 2003; CATALAN-SOARES et al., 2005).

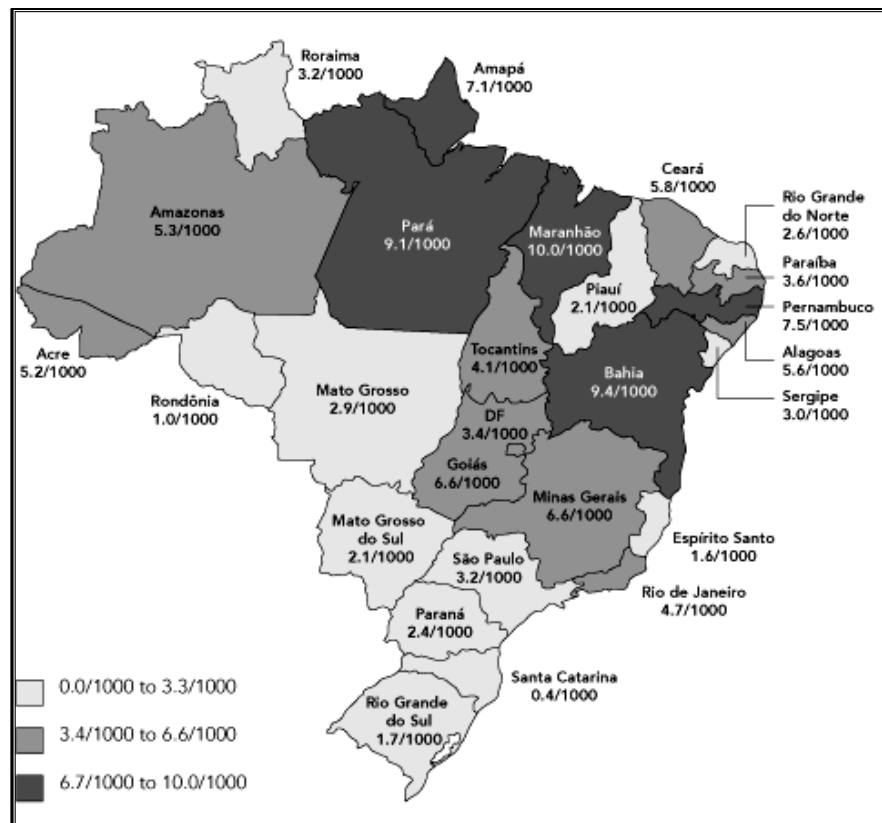


Figura 6: Prevalência de HTLV-1/2 entre doadores de sangue em capitais de 26 estados brasileiros e no Distrito Federal (Adaptado de CATALAN-SOARES et al, 2004).

Buscando entender um pouco mais sobre a prevalência do HTLV-1 no Brasil e sua distribuição ao longo deste vasto território, outros estudos foram realizados. Como no estudo de corte transversal que definiu a prevalência da infecção em puérperas atendidas em três maternidades públicas de Cuiabá (MT), dentre 2.965 puérperas atendidas pelo Sistema Único de Saúde (SUS), observou-se a prevalência de 0,3% e 0,2% de infecção pelo HTLV-1 e pelo HTLV-2, respectivamente, em diagnóstico feito por ELISA e por *Western Blot* (YDY et al, 2009). Em uma pesquisa quantitativa, utilizando dados secundários do Sistema de Informações de Agravos de Notificação (SINAN) e da Fundação Nacional de Saúde, foi feito um levantamento do número de casos de doenças sexualmente transmissíveis entre a população indígena do Distrito Sanitário Especial Indígena de Mato Grosso do Sul, durante o período dos anos de 2001 a 2005 (FERRI & GOMES, 2010). Neste estudo, foi possível observar que o HTLV é um dos vírus sexualmente transmissível entre indígenas brasileiros (ameríndios) e pode ser considerado endêmico nesta população, em especial

os indígenas da região Amazônica, podendo ser justificado pelo fato de que a população indígena acaba sendo um grupo vulnerável à transmissão de doenças sexualmente transmissíveis, como é o caso do HTLV, devido à pobreza, condutas nas relações de gênero; a intolerância à diversidade, especialmente de orientação sexual e o limitado diálogo (FERRI & GOMES, 2010).

No que diz respeito ao estado da Bahia, estimativas indicam que a prevalência global da infecção pelo HTLV-1 na população geral de Salvador foi de 1,8%, aproximadamente, sendo as taxas da infecção de 1,2% para o gênero masculino e 2,0% para o gênero feminino e com prevalência de 9.4/1000 para doadores de sangue (DOURADO et al, 2003; CATALAN-SOARES et al, 2005). Nesse trabalho, de Dourado e cols. (2003), ainda foi possível observar correlação da prevalência do HTLV-1 com o gênero e idade dos analisados, mostrando-se evidente principalmente no gênero feminino (9%) e em mulheres acima de 51 anos (DOURADO et al, 2003). Inclusive, a maior soroprevalência do HTLV-1, já observada no Brasil, foi encontrada em estudo feito entre usuários de drogas endovenosas, em Salvador, que chegou a 25,3% (CATALAN-SOARES et al, 2001). Em gestantes, a prevalência nacional chega a 0,28 %, e no estado da Bahia é de 0,9, em Salvador, e 1,0% em Cruz das Almas, no Recôncavo Baiano (SANTOS et al, 1995; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1997; BITTENCOURT et al, 2001; MAGALHÃES et al, 2008).

Um grande problema enfrentado para se estimar a população real acometida pela infecção pelo HTLV-1 está no fato de que a grande maioria dos estudos publicados tem a amostragem referente a populações específicas, o que nem sempre são amostras representativas da população geral (YDY et al, 2009). Além dos aspectos étnicos parecerem estar relacionados com a taxa de soroprevalência ao HTLV-1, aspectos socioeconômicos parecem também estar relacionados. A baixa escolaridade está associada com maior soroprevalência de HTLV-1, segundo Moxotó e cols. (2007). Além disso, não existem estatísticas de casos precisos para ATLL ou TSP/HAM, isso porque essas doenças não são reportáveis pela Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization-WHO*). No entanto, já existem inúmeros achados científicos sobre essas manifestações ou sobre a biologia molecular do HTLV-

1, portanto, a infecção pelo HTLV-1 é considerada, uma doença negligenciada (ZIHLMANN et al, 2012).

1.3 A origem do HTLV-1

Análises moleculares, tais como em marcadores genômicos de ancestralidade dos seres humanos e do polimorfismo genético do HTLV foram utilizadas como base para estudos de origem, disseminação e evolução dos retrovírus (GALVÃO-CASTRO et al, 2009). Pesquisas sugerem que a origem geográfica do HTLV-1, no mundo, tenha sido na África, pela transmissão interespecies (transmissão zoonótica ao homem), a partir de primatas não humanos (CARNEIRO-PROIETTI et al, 2002; SANTOS et al, 2005). Essa transmissão provavelmente aconteceu, há milhares de anos (Cerca de 75.000-287.000 anos) antes da separação das populações africanas e não africanas, a partir do STLV-1 de primatas não humanos (PNH) para a espécie humana, o que corrobora essa ideia é a existência de Pigmeus Efe Mbuti, isolados e infectados pelo HTLV-1 na República do Congo, descendentes dos povos proto-africanos (GALVÃO-CASTRO et al, 2009).

A origem do HTLV-1 na América, ainda gera muitas controvérsias, por conta disso, alguns estudos sobre a heterogeneidade molecular entre os isolados virais de várias regiões estão sendo feitos (CARNEIRO-PROIETTI et al, 2002). Estudos revelam que substituições de nucleotídeos em alguns fragmentos do genoma do HTLV-1 foram específicas para determinar a origem geográfica dos pacientes analisados (PESSÔA et al, 2014)

Atualmente existem duas teorias principais acerca da introdução e disseminação do HTLV-1 na América. Estudos genéticos e suas contribuições indicam pelo menos duas hipóteses para dar suporte à origem do HTLV-1 na América. A primeira hipótese é a Pré-Colombiana, baseada na migração de populações oriundas do norte da Ásia, através do Estreito de Bering, há cerca de 15.000-35.000 anos atrás (LAIRMORE et al, 1990; NEEL et al, 1994; BIGGAR et al, 1996; SANTOS et al, 2005). A segunda, Pós-Colombiana, especula que o HTLV-1 tenha sido disseminado da África para o Novo Mundo, durante o tráfico de escravos, no período compreendido entre os séculos XVI a

XIX (MIURA et al, 1994; VAN DOOREN et al, 1998; YAMASHITA et al, 1999; PAIVA & CASSEB, 2015).

Alcântara e cols., 2003, através de estudos do haplótipo da β globina observaram que de 34 indivíduos infectados pelo HTLV-1 na região de Salvador, Bahia, 29,4% pertenciam ao haplótipo originado da República Centro Africano (*Central African Republic*) (CAR); 45,6% ao haplótipo de Benin (BEN) e 25% pertenciam ao grupo do Senegal (SEN). Esses resultados são favoráveis à hipótese de múltiplas introduções pós-colombianas de cepas de HTLV-1 vindas da África (ALCANTARA et al, 2003).

As migrações das populações africanas ocorreram principalmente do oeste e centro da África para as Américas, sendo que 40% dos quase 10 milhões de africanos que desembarcaram em portos brasileiros, no período compreendido entre os séculos XVI e XIX, abrangeram os seguintes ciclos: a) Ciclo da Guiné, durante a 2ª metade do século XVI; b) Ciclo de Angola e do Congo no século XVII; c) Ciclo da Costa da Mina, durante os três primeiros quartos do século XVIII e d) Ciclo da baía de Benin nos séculos XVIII e XIX. Atualmente sabemos que o ciclo da Costa da Mina contribuiu com mais efetividade no número de africanos trazidos para o Brasil. Além disso, regiões como do sul da África, conhecidas hoje como sul de Angola, África do Sul e Moçambique também tiveram contribuição como origem dos negros escravizados (GALVÃO-CASTRO et al, 2009).

Dados históricos e análise filogenética da região LTR embasaram a hipótese de que a introdução do HTLV-1 na Bahia tenha ocorrido durante o período de comércio de escravos, a partir do século XVI a XIX (ALCANTARA et al, 2003). Em um estudo sobre epidemiologia e origem do HTLV-1 no Brasil feito por Galvão-Castro e colaboradores (2009), em 243 sequências da região LTR de isolados de regiões distintas do território brasileiro, o Subtipo Cosmopolita, Subgrupo A, foi o mais prevalente em Salvador, Bahia. Adicionalmente, desta forma, a hipótese da introdução do vírus por meio do tráfico negreiro durante os séculos XVI e XIX, seria mais bem aplicada devido a grande variedade genética e ampla distribuição deste subgrupo A, uma vez que miscigenação ocorria. Além disso, populações asiáticas (Filipinos, chineses, japoneses e indianos), no século XX, migraram para o Brasil em busca de

trabalho, especialmente para o estado de São Paulo, e, portanto, estas populações podem ter contribuído para a entrada e dispersão do HTLV aqui no Brasil. Devido à elevada taxa da infecção pelo HTLV-1 e pelo grande contingente de negros escravizados, oriundos da África do Sul pelos Ingleses durante o século XVII e XVIII, a Bahia se torna uma área de importância para o estudo sobre a origem e disseminação do HTLV-1.

Salvador é uma cidade com cerca de 80% da população constituída por afrodescendentes (AZEVEDO et al, 1982), no entanto, ainda existe uma escassez de informações sobre a história evolutiva do HTLV-1 no Estado da Bahia. Além disso, apesar de já ter sido encontrada elevadas prevalências do HTLV-1 em diferentes grupos, e mesmo tendo sido associado à diversas manifestações clínicas, não existe ainda um estudo epidemiológico, com metodologia adequada, em populações gerais, no país, ou mesmo no estado da Bahia.

Em investigações, em populações específicas, já foi possível verificar que isolados virais originados de outras cidades do estado da Bahia (além de Salvador) foram classificados com subtipo Cosmopolita, subgrupo A, transcontinental com sequências que se agrupam com as da África do Sul, e apresentando um ancestral comum com um isolado da África Central e da África do Sul, sugerindo que o HTLV-1 poderia ter se originado na África Central e se disseminado para a África do Sul pela migração dos bantos (RATHSAM-PINHEIRO et al, 2009). No entanto, a maioria dos dados sobre a epidemiologia molecular do HTLV-1 e sua distribuição genotípica no estado da Bahia dizem respeito à isolados virais originados da cidade de Salvador, ou região metropolitana. Apenas mais outras duas mesorregiões do estado, regiões Sul e Vale do São Francisco, já tiveram alguma caracterização molecular de cepas circulantes do HTLV-1. Em outras quatro mesorregiões nenhum outro isolado viral já foi identificado e caracterizado. Mesmo os dados moleculares já gerados nas três mesorregiões citadas, não foram ainda utilizados numa avaliação global com a perspectiva de gerar inferências evolutivas e filogeográficas sobre esta infecção. Do contrário, a maior parte dos dados moleculares gerados dos estudos de investigação epidemiológica não são aproveitados e avaliados mais profundamente e articuladamente, como

forma de fornecer outras informações e inferências adicionais sobre a infecção pelo HTLV-1 (ARAÚJO et al, 2014).

Portanto, é importante caracterizar, genotipicamente, os isolados do HTLV-1 de diferentes regiões mesorregiões geográficas do estado da Bahia, inclusive com contribuições étnicas distintas, para obter informações mais detalhadas sobre as possíveis rotas migratórias do vírus dentro do estado, e até correlacionar com possíveis rotas de introdução no território nacional. Com o rastreamento do subtipo viral do HTLV-1 mais prevalente no estado da Bahia, pode-se tentar coletar informações sobre a origem deste subtipo viral, bem como, avaliar correlação com a ancestralidade viral e região geográfica.

Além disso, e apesar de a infecção pelo HTLV-1 na população brasileira já ter sido identificada há quase 40 anos, ainda não é possível determinar o comportamento evolutivo das cepas virais circulantes no Brasil. Dados de 2006 estimam que a taxa evolutiva do HTLV-1 seja de 2×10^{-5} substituições por sítio por ano para cada mutação fixada (ALCANTARA et al, 2006), estes dados foram gerados a partir de cepas oriundas de populações não brasileiras. Investigações semelhantes deveriam ser conduzidas com representantes virais do território nacional, e em especial na Bahia, devido à sua importante contribuição no cenário global da infecção pelo HTLV-1 no Brasil. Desse modo, os dados gerados a partir do cálculo da taxa evolutiva das cepas virais, podem indicar qual o ancestral comum a eles (mais antigo), correlacionando à origem geográfica da cepa mais antiga e a possibilidade de introdução do HTLV-1 na Bahia. O HTLV-1 é um vírus altamente conservado, ou seja, possui uma elevada estabilidade genética. Com o cálculo da taxa evolutiva por meio do estudo da região LTR viral, que consiste em medir o número de substituições de nucleotídeos por local/por ano, é possível estimar o comportamento da população viral ao longo de várias gerações (VAN DOOREN et al, 2004). Essa análise pode fornecer informações quanto ao crescimento populacional, o ancestral mais antigo e o comportamento do vírus na região de estudo.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Investigar a origem e a disseminação do HTLV-1 na Bahia.

2.2 Específicos

- Identificar os subtipos virais circulantes em outras mesorregiões do estado, ainda não caracterizadas;
- Sugerir possíveis rotas de disseminação do vírus no estado da Bahia, através do estudo dos isolados virais separados por mesorregiões;
- Relacionar os genótipos virais com o perfil de disseminação do vírus na Bahia;
- Contribuir com a caracterização molecular do HTLV-1, através da estimativa da taxa evolutiva dos isolados virais oriundos do estado da Bahia.

3 METODOLOGIA

3.1 Amostra e Desenho do Estudo

Este estudo, de corte transversal, foi desenvolvido a partir de uma amostra de conveniência, já que foram utilizadas apenas amostras de Sangue total e/ou PBMC (Células Mononucleares de Sangue Periférico) previamente armazenadas no Centro Integrativo Multidisciplinar de HTLV (CHTLV). Por isso, este estudo dispensa a assinatura do Termo de Consentimento Livre Esclarecido-TCLE, devido ao fato de os indivíduos serem anônimos não-vinculados e das amostras já estarem estocadas. No entanto, é importante ressaltar que o projeto foi aprovado pelo CEP da Escola Bahiana de Medicina de Saúde Pública, nº 1.392.835 (**APÊNDICE I**), instituição docente-assistencial que abriga o CHTLV.

Inicialmente, foram selecionadas 50 amostras de indivíduos, de ambos os sexos, infectados pelo HTLV-1 com WB positivo e que nasceram e residem no estado da Bahia. Todos os indivíduos, cujas amostras estocadas foram selecionadas, foram devidamente diagnosticados como positivos para o HTLV-1, sendo submetidos à triagem, pelo ELISA (Cambridge Biotech Corporation, Worcester, MA) e as amostras que se mostraram reagentes neste teste foram submetidas à confirmação pelo teste de *Western Blot* (HTLV Blot 2.4, Genelabs Diagnostics, Science Park Drive, Singapore).

No que diz respeito a esse conjunto de amostras de sangue total, selecionadas do biobanco do CHTLV, pode-se estabelecer dois importantes critérios de inclusão: a informação sobre a origem geográfica, dentro do estado da Bahia; e a data da coleta, dado necessário à Análise Bayesiana. A escolha desta amostragem teve como princípio contemplar, ao máximo, as diferentes origens da infecção pelo HTLV-1, distribuídas entre as mesorregiões da Bahia, visto que, até o momento, apenas foram descritos casos de infecção em três das sete mesorregiões do estado. Segundo o IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) pelo senso 2010, entende-se por mesorregiões uma área individualizada em uma unidade de federação que possui sua área

geográfica definida por parâmetros específicos que dão ao local uma identidade regional. Esses parâmetros são: o processo social, o quadro natural e a rede de comunicação e de lugares. As mesorregiões, por sua vez, são subdivididas em microrregiões de acordo com a presença de especificidades quanto à organização do espaço. Sendo assim, este estado é composto por 7 (sete) mesorregiões (**Figura 7**). Essa distribuição da amostragem permitiu melhor eficiência na avaliação da origem e disseminação do vírus no estado.



Figura 7: Distribuição das mesorregiões no território baiano. 1. Centro-Norte (CN), 2. Centro sul (CS), 3. Extremo Oeste (EO), 4. Região Metropolitana de Salvador (RMS), 5. Nordeste (N), 6. Sul (S) e 7. Vale do São Francisco (VSF) (Disponível em: <https://upload.wikimedia.org/>).

Para a melhor investigação sobre a origem e disseminação do HTLV-1 no estado da Bahia, outras sequências LTR do vírus já disponíveis no Banco Mundial de Sequências (GenBank) foram utilizadas para, ao serem adicionadas ao grupo de sequências geradas neste trabalho, perfazer o maior número possível de mesorregiões a serem investigadas. Deste modo, o **Quadro 1** lista as informações sobre todas as 78 sequências LTR do HTLV-1 da região da Bahia, analisadas neste estudo (Total igual à soma entre as sequências

geradas neste estudo, e as sequências já disponíveis no GenBank), para investigação da infecção pelo HTLV-1 no estado.

Quadro 1: Informações sobre as Sequências LTR do HTLV-1, distribuídas nas diferentes mesorregiões do Estado da Bahia.

Nome do Isolado	Mesorregião/ Cidade	Código/ TAG	Ano de coleta	Número de Acesso
HB3194	RMS/Salvador	BRBa69.RMS	2004	DQ471209.1
HB3202	RMS/Salvador	BRBa70.RMS	2004	DQ471208.1
HB3134	RMS/Salvador	BRBa73.RMS	2004	DQ471207.1
HB3120	RMS/Salvador	BRBa66.RMS	2004	DQ471206.1
HB3203	RMS/Salvador	BRBa39.RMS	2004	DQ471205.1
HB3102	RMS/Salvador	BRBa55.RMS	2004	DQ471204.1
HB3230	RMS/Salvador	BRBa42.RMS	2004	DQ471203.1
HB3119	RMS/Salvador	BRBa57.RMS	2004	DQ471202.1
HB3160	RMS/Salvador	BRBa7.RMS	2004	DQ471201.1
HB3166	RMS/Salvador	BRBa77.RMS	2004	DQ471200.1
HB3135	RMS/Salvador	BRBa4.RMS	2004	DQ471199.1
HB3205	RMS/Salvador	BRBa29.RMS	2004	DQ471198.1
HB2562	RMS/Salvador	BRBa1.RMS	2003	DQ471197.1
HB3114	RMS/Salvador	BRBa35.RMS	2004	DQ471196.1
HB3229	RMS/Salvador	BRBa20.RMS	2004	DQ471195.1
HB3311	RMS/Salvador	BRBa22.RMS	2004	DQ471194.1
HB3170	RMS/Salvador	BRBa23.RMS	2004	DQ471193.1
HB3171	RMS/Salvador	BRBa32.RMS	2004	DQ471192.1
HB3168	RMS/Salvador	BRBa40.RMS	2004	DQ471191.1
HB2966	RMS/Salvador	BRBa30.RMS	2004	DQ471190.1
HB3104	RMS/Salvador	BRBa41.RMS	2004	DQ471188.1
HB3133	RMS/Salvador	BRBa21.RMS	2004	DQ471189.1
HB3167	RMS/Salvador	BRBa38.RMS	2004	DQ471187.1
FNN159	RMS/Salvador	BRBa72.RMS	NI	DQ005554.1
FNN158	RMS/Salvador	BRBa46.RMS	NI	DQ005553.1
FNN156	RMS/Salvador	BRBa6.RMS	NI	DQ005552.1
FNN155	RMS/Salvador	BRBa68.RMS	NI	DQ005551.1
FNN153	RMS/Salvador	BRBa34.RMS	NI	DQ005550.1
FNN149	RMS/Salvador	BRBa33.RMS	NI	DQ005549.1
FNN148	RMS/Salvador	BRBa75.RMS	NI	DQ005548.1
FNN100	RMS/Salvador	BRBa48.RMS	NI	DQ005547.1
FNN9	RMS/Salvador	BRBa49.RMS	NI	DQ005546.1
FS105	RMS/Feira de Santana	BRBa27.RMS	2008	FJ853490.1
FS84	RMS/Feira de Santana	BRBa26.RMS	2008	FJ853491.1
FS157	RMS/Feira de Santana	BRBa45.RMS	2008	GU225732.1
FS67	RMS/Feira de Santana	BRBa47.RMS	2008	GU225731.1
VSF842	Vale do São Francisco	BRBa64.VSF	2005	EF672337.1
VSF310	Vale do São Francisco	BRBa63.VSF	2005	EF672336.1
VSF287	Vale do São Francisco	BRBa51.VSF	2005	EF672335.1
VSF279	Vale do São Francisco	BRBa65.VSF	2005	EF672334.1
VSF273	Vale do São Francisco	BRBa78.VSF	2005	EF672333.1

Nome do Isolado	Mesorregião/ Cidade	Código/ TAG	Ano de coleta	Número de Acesso
IL384	Sul/Ilhéus	BRBa52.S	2009	KF202327.1
IL263	Sul/Ilhéus	BRBa2.S	2009	KF202326.1
IL245	Sul/Ilhéus	BRBa9.S	2009	KF202325.1
IL568	Sul/Ilhéus	BRBa43.S	2009	KF202324.1
IL1787	Sul/Ilhéus	BRBa67.S	2009	KF202323.1
IL1657	Sul/Ilhéus	BRBa54.S	2009	KF202322.1
IL735	Sul/Ilhéus	BRBa44.S	2009	KF202319.1
IL1171	Sul/Ilhéus	BRBa74.S	2009	KF202317.1
IL1504	Sul/Ilhéus	BRBa31.S	2009	KF202315.1
IL1068	Sul/Ilhéus	BRBa36.S	2009	KF202313.1
IL1451	Sul/Ilhéus	BRBa28.S	2009	KF202311.1
IL174	Sul/Ilhéus	BRBa8.S	2008	KF202309.1
IL945	Sul/Ilhéus	BRBa10.S	2009	KF202307.1
IT196	Sul/Itabuna	BRBa50.S	NI	KF202308.1
IT1092	Sul/Itabuna	BRBa3.S	2010	KF202321.1
IT1036	Sul/Itabuna	BRBa58.S	NI	KF202320.1
IT923	Sul/Itabuna	BRBa76.S	2010	KF202318.1
IT766	Sul/Itabuna	BRBa5.S	NI	KF202316.1
IT260	Sul/Itabuna	BRBa56.S	NI	KF202314.1
IT190	Sul/Itabuna	BRBa62.S	2009	KF202312.1
IT82	Sul/Itabuna	BRBa71.S	2009	KF202310.1
BA03	RMS/Salvador	BRBa24.RMS	2006	KU992925
BA05	RMS/Salvador	BRBa60.RMS	2014	KU992926
BA21	Centro Sul/Itagibá	BRBa16.CS	2003	KU992922
BA22	Centro Sul/Itambé	BRBa13.CS	2014	KU992919
BA23	Nordeste/Araci	BRBa18.N	2006	KU992924
BA24	Nordeste/Alagoinhas	BRBa14.N	2014	KU992920
BA25	Centro Sul/Jequié	BRBa12.CS	2003	KU992918
BA26	Sul/Ituberá	BRBa17.S	2014	KU992923
BA27	Sul/Ituberá	BRBa15.S	2014	KU992921
BA29	Sul/Valença	BRBa61.S	2008	KU992927
BA30	Sul/Itabuna	BRBa11.S	2014	KU992917
CA421	RMS/Cruz das Almas	BRBa19.RMS	NI	EU108723
CA422	RMS/Cruz das Almas	BRBa25.RMS	NI	EU108721
CA423	RMS/Cruz das Almas	BRBa37.RMS	NI	EU108724
CA253	RMS/Cruz das Almas	BRBa59.RMS	NI	EU108722
IDUSSA	RMS/Salvador	BRBa53.RMS	NI	DQ005555

RMS= Região Metropolitana de Salvador; CS=Centro Sul; S=Sul; N=Nordeste; VSF= Vale do São Francisco; NI=Não informado.

3.2 Detecção Molecular do HTLV-1 nas amostras de Sangue Total

A detecção molecular do HTLV-1 nas amostras de sangue total foi realizada nos Laboratórios de Biologia Molecular do CHTLV. Inicialmente, as células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram obtidas de algumas amostras através de gradiente de centrifugação e em seguida, o DNA genômico foi extraído utilizando o kit de extração Qiagen (QIAamp® DNA Blood Kit) do sangue total ou PBMC disponível, sendo a concentração final de DNA medida por espectrofotometria (Gene Quantpro RNA/DNA Calculator). O DNA foi submetido à *nested-PCR* para a região LTR, como descrito previamente por Valleso, e cols. 1995, gerando um fragmento de um pouco mais de 550 pb. Os produtos da PCR foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose, e em seguida purificados utilizando o kit de purificação da QIAGEN (QIAquick® PCR Purification Kit) e sequenciados no sequenciador automático ABI3100 utilizando o kit Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), pertencente ao Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-Ba). As reações de sequenciamento foram conduzidas em duplicata e com utilização dos *primers* LTRN1 e LTRN2 (**Quadro 2**) utilizados na PCR. A geração da sequência consenso, bem como a avaliação da qualidade do sequenciamento foram realizadas utilizando o programa SeqScape (Applied Biosystems SeqScape Software v 2.5).

Quadro 2: Primers utilizados nas reações de Nested PCR e sequenciamento.

PRIMERS	SEQUÊNCIA DE OLIGONUCLEOTÍDEOS
LTR1	5'CAT TTC TAC TCT CAC ACG GCC TCA TAC AGT ACT CTT3'
LTR2	5'CGC AGT TCA GGA GGC ACC 3'
LTRN1	5'TTG AAG AAT ACA CCA ACA TCC C3'
LTRN2	5'GAA CGC GAC TCA ACC GGC GTG GAT 3'

3.3 Estimativa da Distância p , entre os isolados virais das diferentes mesorregiões do estado da Bahia

De posse das 78 sequências LTR do HTLV-1 do estado da Bahia (**Quadro 1**), foi realizado o cálculo da distância p , como análise preliminar, para estas sequências organizadas por mesorregiões. Mesmo sendo esta análise menos refinada que a inferência filogenética, os resultados encontrados foram incluídos na discussão da origem e epidemiologia do vírus na Bahia, respeitando o poder e a limitação desta análise. A distância genética foi calculada entre as sequências LTR do HTLV-1 das cinco diferentes mesorregiões, representadas neste estudo: Nordeste (N=2), Centro-Sul (N=3), Região Metropolitana de Salvador (N=43), Região Sul (N=25) e Região do Vale do São Francisco (N=5). Os cálculos de diversidade genética foram feitos utilizando o modelo de distância Tamura Nei, com suporte estatístico, desvio padrão e 1000 réplicas através da análise de *Bootstrap* implementado no pacote de programas do MEGA 3.0 (KUMAR et al, 1994).

3.4 Análise Filogenética dos isolados virais do HTLV-1 oriundos de casos de infecção no estado da Bahia

Três diferentes inferências filogenéticas foram realizadas, neste estudo: uma análise de subtipagem das novas sequências LTR do HTLV-1 (Alinhamento das sequências no **Anexo I**), uma análise filogenética apenas com sequências de isolados virais do Subtipo a (Alinhamento das sequências no **Anexo II**), e uma última inferência filogenética, apenas com sequências de isolados virais do Subtipo a Subgrupo Transcontinental (A), (Alinhamento das sequências no **Anexo III**). Esta estratégia foi escolhida, pois todas as sequências LTR do HTLV-1 avaliadas neste estudo pertenciam ao Subtipo a Subgrupo A, inclusive as novas sequências geradas neste trabalho.

Para todas as inferências, outras sequências LTR do HTLV-1, já disponíveis no Banco Mundial de Sequências (GenBank), foram selecionadas e organizadas em três diferentes conjuntos de sequências (*Dataset*). A esses

conjuntos, de sequências já depositadas, foram acrescentadas as novas sequências LTR do HTLV-1 geradas neste trabalho.

Os *datasets*, portanto, utilizados para cada uma das inferências filogenéticas apresentavam características específicas. O *dataset* da inferência filogenética de subtipagem (**Quadro 3**), foi composto por 73 sequências referências distribuídas entre os sete subtipos e os cinco subgrupos do HTLV-1. A este conjunto de sequências foi adicionado apenas as novas sequências LTR do HTLV-1, geradas neste trabalho, e que eram o alvo da subtipagem. As inferências filogenéticas do Subtipo a e do Subtipo a/Subgrupo A tinham como objetivo, sugerir possíveis rotas de disseminação do vírus, bem como características epidemiológicas da infecção pelo HTLV-1 no estado da Bahia, por isso, os *datasets* constituídos para estas inferências tinham como característica maior a prevalência de sequências LTR de isolados virais provenientes das diferentes regiões do Brasil, e principalmente de sequências LTR de isolados virais oriundos de casos de infecção das diferentes mesorregiões do estado da Bahia.

Quadro 3: Número de Acesso das Sequências Referência utilizadas na Análise de Subtipagem.

Isolado	Número de Acesso	Subtipo Subgrupo	Isolado	Número de Acesso	Subtipo Subgrupo
ATK1	J02029	aB	MWVG	Z31662	b
HS35	D13784	aC	12503	L76309	b
MeI5	L02534	c	GAB7	L76311	b
AINU	D23694	aA	PH236	L76307	b
CH26	D23690	aA	STDen	L76306	b
GH78	D23693	aC	H24	L76308	b
AMA	X88871	aA	T49	L76305	b
FCR	X88873	aA	Pyg19	L76310	d
HKN	X88874	aB	Qu3	Y16477	aA
JCP	X88875	aA	Qu2	Y16476	aA
MAQS	X88876	aA	Me3	Y16480	aA
MASU	X88877	aA	BL1	Y16481	aE
CR1	K02722	aA	Me1	Y16478	aA
H5	M37299	aB	Ni3	Y16485	aB
MT4	Z31661	aB	Me2	Y16479	aA
Bo	U12804	aD	BI3	Y16483	aB
OD	U12805	aD	Boi	L36905	aA
PR52	U12806	aD	MT2	L03562	aA

TBH1	L76026	aA	NM1626	AF063821	aC
TBH2	L76025	aA	BI2	Y16482	aA
TBH3	L76034	aA	Afs911	L77212	aA
FNN155	DQ005551	aA	CA423	EU108724	aA
FNN159	DQ005554	aA	FNN100	DQ005547	aA
TSP1	M86840	aA	CA421	EU108723	aA
HTLV30	DQ005567	aA	CA422	EU108721	aA
HTLV25	DQ005566	aA	FNN153	DQ005550	aA
HTLV15	DQ005562	aA	ITIS	Z32527	b
HTLV18	DQ005563	aA	MOMJ	Z31659	b
FNN158	DQ005553	aA	Nar	AF0633820	aA
FNN156	DQ005552	aA	FNN148	DQ005548	aA
IDUSSA	DQ005555	aA	Qu1	Y16475	aA
CA253	EU108722	aA			

O *dataset* para a inferência filogenética dentro do Subtipo a, foi composto por: 46 sequências LTR do HTLV-1 pertencentes ao Subtipo a e previamente utilizadas na análise de subtipagem, e, portanto, seus números de acesso já foram apresentados no Quadro 3; 30 outras sequências LTR do HTLV-1, não incluídas na análise de subtipagem, oriundas de isolados virais de diferentes regiões do Brasil (**Quadro 4**); e por fim, pelas 78 sequências LTR do HTLV-1 provenientes de casos de infecção nas diferentes mesorregiões do estado da Bahia (**Quadro 1**), sendo já incluídas neste total, as novas sequências LTR, geradas neste trabalho, e totalizando 154 sequências no *dataset* para a inferência filogenética do Subtipo a. Desta forma, o *data set* descrito no Quadro 1 representa o total de sequências LTR do HTLV-1 provenientes de casos de infecção no estado da Bahia, que foram caracterizadas filogeneticamente para as sugestões de origem, disseminação, epidemiologia do HTLV-1 no estado.

Na terceira e última análise filogenética, concentrando as sequências apenas no Subgrupo A do Subtipo a, foi utilizado um *dataset* com 139 sequências LTR do HTLV-1 selecionadas a partir das 154 sequências LTR apresentadas na análise anterior. Deste *dataset* maior (154) foram retiradas apenas as 15 sequências LTR do HTLV-1 que pertenciam aos outros subgrupos do Subtipo a.

Para a melhor identificação, da origem geográfica, das sequências LTR do HTLV-1, na árvore filogenética, todas as sequências listadas nos Quadros 1 e 4

foram renomeadas (receberam um código/TAG). As novas sequências LTR do HTLV-1, geradas neste trabalho, já foram submetidas ao *Genbank* e seus números de acesso se encontram no **Quadro 1** (KU992917- KU992927).

Quadro 4: Informações sobre as Sequências LTR do HTLV-1, das diferentes regiões do Brasil, utilizadas na Análise Filogenética do Subtipo Cosmopolita (a) e do Subgrupo Transcontinental (A).

Nome do Isolado	Estado/Cidade	Código/TAG	Número de Acesso
OKW235	Mato Grosso	BR24.MT	KM023767
OKW143	Mato Grosso	BR25.MT	KM023766
HSH76	Mato Grosso	BR 12.MT	KM023763
BRSP88684-13	São Paulo	BR15.SP	KM211985
BRSP86578-13	São Paulo	BR9.SP	KM211984
BRSP205-09	São Paulo	BR10.SP	JF271848
BRSP42-09	São Paulo	BR14.SP	JF271847
BRSP118-10	São Paulo/São Paulo	BR18.SP	JX280955
BRSP171-10	São Paulo/São Paulo	BR6.SP	JX280956
BRPA3	Rio Grande do Sul/Porto Alegre	BR2.RGS	DQ028628
BRPA10	Rio Grande do Sul/Porto Alegre	BR1.RGS	DQ028626
BRPA2	Rio Grande do Sul/Porto Alegre	BR5.RGS	DQ028627
TB401	Rio de Janeiro/Manguinhos	BR17.RJ	JX184922
TB83	Rio de Janeiro/Manguinhos	BR4.RJ	JX184921
TB305	Rio de Janeiro/Manguinhos	BR13.RJ	JX184920
K710	Rio de Janeiro	BR29.RJ	GQ443756
K535	Rio de Janeiro	BR19.RJ	GQ443757
BS132	Rio de Janeiro	BR7.RJ	GQ443753
BS006	Rio de Janeiro	BR8.RJ	GQ443754
BRLO47-02	Paraná/Londrina	BR3.PR	JF271841.1
BRLO37-02	Paraná/Londrina	BR11.PR	JF271840.1
BRLO34-02	Paraná/Londrina	BR26.PR	JF271839.1
BRLO30-02	Paraná/Londrina	BR27.PR	JF271838.1
BRLO15-02	Paraná/Londrina	BR28.PR	JF271837.1
BRLO14-02	Paraná/Londrina	BR16.PR	JF271836.1
MAQS	Ceará/Fortaleza	BR22.CE	X88876
FCR	Ceará/Fortaleza	BR21.CE	X88873
MASU	Ceará/Fortaleza	BR20.CE	X88877
AMA	Ceará/Fortaleza	BR30.CE	X88871
JCP	Ceará/Fortaleza	BR23.CE	X88875

De um modo geral, as inferências filogenéticas foram realizadas seguindo um protocolo comum. Inicialmente, as sequências foram alinhadas usando o *software* Clustal X (JEANMOUGIN et al, 1998) e editadas manualmente no programa GeneDoc (NICHOLAS et al, 1997). O HKY + G foi escolhido o melhor modelo evolutivo, para as três análises, através do *software* Modeltest (POSADA & CRANDALL, 1998). As reconstruções baseadas nos métodos *Neighbor-Joining* (NJ) e *Maximum-Likelihood* (ML) foram geradas pelo PAUP* 4.0b10 (SWOFFORD, 1998). A reprodutibilidade da topologia NJ foi assegurada através da análise de *Bootstrap* com 1000 réplicas. A topologia da análise ML, gerada no PAUP, foi confirmada usando o PhyML 3.0 disponível da Plataforma de Bioinformática Montpellier (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>) (GUINDON et al, 2010). O teste da razão de verossimilhança foi usado para calcular o suporte estatístico do tamanho dos ramos, sendo $p < 0,001$ considerado altamente significativo (**) e $p < 0,005$ considerado significativo (*). As topologias foram visualizadas no TreeView (PAGE, 1996) e no FigTree v1.4.2 (DRUMMOND AND RAMBAUT, 2007).

3.5 Análise Bayesiana das sequências LTR do HTLV-1 oriundas do estado da Bahia e Estimativa da Taxa Evolutiva a partir desses isolados virais.

A análise Bayesiana, utilizada para o cálculo da taxa evolutiva bem como para a inferência filogenética das sequências LTR do HTLV-1 oriundas do estado da Bahia, foi realizada utilizando o pacote do BEAST v1.8.2, (DRUMMOND AND RAMBAUT, 2007). Este pacote permite a incorporação do ano de coleta da amostra na construção filogenética, dado necessário para a estimativa da taxa evolutiva. Portanto, das 78 sequências LTR do HTLV-1 geradas a partir de casos de infecção nas diferentes mesorregiões do estado da Bahia (**Quadro 1**), utilizadas neste trabalho, apenas 60 foram incluídas nesta análise, já que 18 delas não apresentavam a informação sobre a data de coleta em seu registro no Banco Mundial de Sequências. Este conjunto de 61 sequências LTR do HTLV-1 constitui um novo *dataset*, específico para a análise Bayesiana. O referido *dataset* foi testado para os modelos de relógio molecular estrito e relaxado (*Constant Size*, *Exponential Growth*, *Bayesian*

Skyline e *GMRF Bayesian Skyride*) e os parâmetros para cada modelo foi estimado usando o método de MCMC (*Markov Chain Monte Carlo*), rodando 150.000.000 gerações, com amostragem a cada 15.000 gerações. Os resultados foram analisados no *Tracer* v1.6, onde os diferentes modelos utilizados foram comparados para selecionar o modelo mais adequado para esse conjunto de dados. O *Tree Annotator* v1.8.2, incluído no pacote do BEAST, foi utilizado para obtenção da árvore de máxima credibilidade a partir da distribuição de árvores após um *burnin* de 50%. A edição e visualização das árvores foram realizadas utilizando o *FigTree* v1.4.2 (DRUMMOND AND RAMBAUT, 2007).

Todas as análises utilizando ferramentas de Bioinformática (Inferência filogenética, cálculo de distância p , e análise Bayesiana) foram realizadas na Unidade de Bioinformática, do Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia.

4 RESULTADOS

4.1 Detecção Molecular do HTLV-1 nas amostras de Sangue Total

Inicialmente, foram selecionadas 50 amostras de sangue total, para serem submetidas à detecção molecular do HTLV-1. Esse número não pôde ser maior pois todas as amostras de sangue total, selecionadas no CHTLV, incluídas neste estudo, deveriam apresentar data de coleta e origem geográfica, com o objetivo de incluí-las no cálculo da taxa evolutiva. Além disso, como utilizamos amostras estocadas, muitas amostras que apresentavam estas informações não tinham quantidade de sangue total suficiente para as análises.

Outro aspecto que limitou o número de amostras de sangue total submetidas à busca pelo HTLV-1, foi a tentativa de incluir neste conjunto de 50 amostras, representantes de diferentes anos, para melhor calibrar a Análise Bayesiana, que foi realizada para o cálculo da taxa evolutiva. Algumas das 50 amostras de sangue total foram submetidas à separação de PBMC, e todas as amostras seguiram para extração de DNA e *nested*-PCR para a região LTR. No entanto, devido ao uso de um kit de purificação ineficiente, por conta do tempo de uso, toda a amostra de DNA de 20 dessas 50 amostras foi perdida nesta etapa, restando apenas 30 amostras para seguir o estudo. As 30 amostras positivas na PCR e purificadas adequadamente seguiram para o sequenciamento. O sequenciamento foi bem sucedido para apenas 11 dessas amostras, de forma que essas 11 sequências LTR do HTLV-1 geradas foram direcionadas para as inferências filogenéticas. Infelizmente, devido ao curto tempo que tínhamos no cronograma do estudo, bem como devido a outras intercorrências, como falta do polímero do sequenciador, não foi possível repetir o sequenciamento para aumentar este número. Entre as referidas perdas está a de uma cepa viral oriunda do único caso de infecção, registrado no CHTLV, da Mesorregião Centro-Norte.

Com estas 11 novas sequências LTR do HTLV-1 foi possível identificar a infecção em outras duas mesorregiões: nordeste e centro-sul, ainda não representadas em sequências publicadas no Genbank. Outras duas

mesorregiões, Oeste Baiano e Centro Norte, não estão representadas no Banco de DNA, do CHTLV, mesmo sendo este centro um dos mais importantes Centros de Referência para infectados pelo HTLV-1 no estado, com quase 1.800 indivíduos atendidos desde 2002.

Essas 11 sequências LTR do HTLV-1 apresentavam, em sua maioria, 480pb, e sua localização em relação ao ATK1 (Sequência Referência) está demonstrado no **Quadro 5**.

Quadro 5: Tamanho e Localização Nucleotídica, em relação ao ATK1, das 11 sequências LTR do HTLV-1, geradas neste trabalho.

Sequência	Tamanho (pb)	Localização
BRBa24.RMS	481	202nt-685nt
BRBa60.RMS	473	202nt-685nt
BRBa16.CS	482	202nt-685nt
BRBa13.CS	482	202nt-685nt
BRBa18.N	480	202nt-685nt
BRBa14.N	480	202nt-685nt
BRBa12.CS	479	202nt-685nt
BRBa17.S	482	202nt-685nt
BRBa15.S	480	202nt-685nt
BRBa61.S	476	202nt-685nt
BRBa11.S	480	202nt-685nt

4.2 Estimativa da Distância p , entre os isolados virais das diferentes mesorregiões do estado da Bahia

Como uma avaliação preliminar o cálculo da distância p foi realizado, inicialmente, entre as 78 sequências LTR do HTLV-1 utilizadas neste estudo e organizadas por mesorregiões (5 grupos) (**Figura 8**).

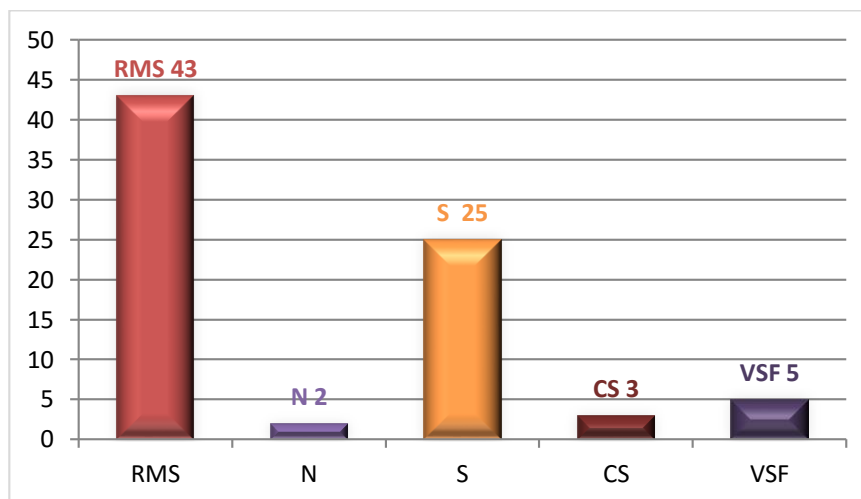


Figura 8: Distribuição das 78 sequências LTR do HTLV-1 do estado da Bahia, por mesorregiões. RMS= Região Metropolitana de Salvador (43 Sequências); VSF=Vale do São Francisco (05 Sequências); CS=Centro Sul (03 Sequências); S=Sul (25 Sequências); N=Nordeste (02 Sequências)

O quadro 6 está representado da seguinte forma: os valores na diagonal, correspondem aos valores de diversidade genética calculada entre os isolados da mesma mesorregião, sendo que os valores dos desvios-padrão desta análise estão representados na legenda do quadro; os valores na porção inferior do quadro (em rosa) são referentes aos valores de diversidade genética entre os diferentes grupos, sendo que os valores dos desvios-padrão desta análise estão organizados na parte superior do quadro. Desta forma, o cálculo foi feito dentro dos grupos e também comparando os grupos um a um. Na avaliação dentro de cada grupo, foi possível identificar que a mesorregião que apresenta maior diversidade genética, e, portanto, a maior diversidade entre suas sequências, foi a Região Centro Sul (0,019, DP: 0,005) (**Quadro 6**). Duas mesorregiões apresentaram resultados semelhantes, são elas as regiões Sul (0,012, DP:0,003) e Metropolitana de Salvador (0,011, DP:0,002). Nas comparações entre as mesorregiões, foi possível observar que as maiores divergências foram encontradas, ao comparar as sequências da região Centro Sul com as regiões Metropolitana de Salvador (0,020, DP:0,004), Vale do São Francisco (0,025, DP:0,005) e Sul (0,019, DP: 0,004). Além desses, destaca-se a diferença encontrada entre as regiões Vale do São Francisco e Nordeste (0,017, DP:0,004). Ressaltamos que também estes quatro últimos dados foram os que apresentaram os maiores valores para os desvios-padrão. Por outro

lado, as menores distâncias foram encontradas, quando as sequências da região Sul foram comparadas com as demais regiões.

Quadro 6: Distância p das sequências LTR do HTLV-1 dentro de cada mesorregião e entre elas (N=78).

	RMS	VSF	N	S	CS
RMS	0,011¹	0,003 ^A	0,003 ^B	0,002 ^C	0,004 ^D
VSF	0,013 ^A	0,008²	0,004 ^E	0,003 ^F	0,005 ^G
N	0,013 ^B	0,017 ^E	0,013³	0,003 ^H	0,004 ^I
S	0,011 ^C	0,012 ^F	0,013 ^H	0,012⁴	0,004 ^J
CS	0,020 ^D	0,025 ^G	0,014 ^I	0,019 ^J	0,019⁵

Os valores em negrito identificam as distâncias dentro de cada mesorregião, sendo os desvios-padrão numerados de 1 a 5: ¹(0,002); ²(0,003); ³(0,005); ⁴(0,003); ⁵(0,005). Os valores identificados pelas letras de A-J referem-se aos desvios-padrão das distâncias entre as mesorregiões (Representados no quadro na cor cinza). VSF= Vale do São Francisco, MS=Metropolitana de Salvador, N= Nordeste, S=Sul, CS=Centro-Sul.

Como os valores encontrados nesta análise preliminar foram muito semelhantes entre si, e como entendemos que um aspecto que poderia contribuir com a limitação dos resultados, é a diferença na quantidade de sequências analisadas em cada grupo, refizemos os cálculos de distância tentando equilibrar a composição numérica dos grupos. Por isso, aleatoriamente, foram escolhidas apenas 5 sequências da Região Metropolitana de Salvador (BRBa1.RMS, BRBa20.RMS, BRBa40.RMS, BRBa66.RMS e BRBa77.RMS), e outras 5 sequências da mesorregião Sul (BRBa3.S, BRBa15.S, BRBa28.S, BRBa43.S e BRBa71.S), ficando, portanto, a nova composição numérica dos grupos da seguinte maneira: RMS=5 Sequências; VSF=5 Sequências; CS=3 Sequências; S=5 Sequências; N=2 Sequências. Os resultados obtidos desta segunda análise estão organizados no **Quadro 7** na mesma disposição dos valores do Quadro 6.

Quadro 7: Distância p das sequências LTR do HTLV-1 dentro de cada mesorregião e entre elas (N=20).

	RMS	VSF	N	S	CS
RMS	0,015¹	0,003 ^A	0,004 ^B	0,003 ^C	0,005 ^D
VSF	0,013 ^A	0,008²	0,005 ^E	0,004 ^F	0,006 ^G
N	0,018 ^B	0,020 ^E	0,013³	0,003 ^H	0,004 ^I
S	0,013 ^C	0,013 ^F	0,015 ^H	0,012⁴	0,004 ^J
CS	0,025 ^D	0,028 ^G	0,017 ^I	0,020 ^J	0,019⁵

Os valores em negrito identificam as distâncias dentro de cada mesorregião, sendo os desvios-padrão numerados de 1 a 5: ¹(0,002); ²(0,003); ³(0,005); ⁴(0,003); ⁵(0,005). Os valores identificados pelas letras de A-J referem-se aos desvios-padrão das distâncias entre as mesorregiões (Representados no quadro na cor cinza). VSF= Vale do São Francisco, MS=Metropolitana de Salvador, N= Nordeste, S=Sul, CS=Centro-Sul.

Como se pode observar, no entanto, a nova composição numérica dos grupos não alterou o panorama já encontrado anteriormente, na comparação entre os grupos. A única mudança observada foi a alteração da distância p dentro do grupo das sequências originadas da Região Metropolitana de Salvador que se mostrou aumentada (0,015, DP: 0,002).

4.3 Análise Filogenética dos isolados virais do HTLV-1 oriundos de casos de infecção no estado da Bahia.

4.3.1 Subtipagem das sequências LTR do HTLV-1, geradas neste trabalho.

A análise filogenética, para subtipagem, das novas 11 sequências LTR do HTLV-1, geradas neste trabalho, demonstrou que todas elas pertencem ao subgrupo Transcontinental (A), do subtipo Cosmopolita (a), *cluster* formado com valor de *Bootstrap* de 94% e análise de *Maximum Likelihood* com $p < 0,001$. É importante ressaltar que nove das onze novas sequências formaram um *cluster* interno ao *Cluster A* da América Latina. Uma sequência (BRBa60) também se agrupou dentro do *cluster A* da América Latina, no entanto, fora do *cluster* exclusivo das novas sequências. Essa sequência foi originada de um caso de infecção da região Metropolitana de Salvador. Por fim, a décima primeira sequência (BRBa61), originada de um caso de infecção da região Sul, se agrupou no *Cluster B* da América Latina, que foi formado com valor de

Bootstrap de 53% (**Figura 9**). Observa-se que estas duas últimas sequências (BRBa60 e BRBa61) são as que apresentam o menor tamanho. A topologia da árvore NJ foi semelhante à árvore ML, por isso foi mantida a árvore NJ na apresentação, já que o objetivo dessa inferência era apenas a subtipagem das 11 novas sequências LTR do HTLV-1, e estas apresentaram o mesmo perfil filogenético na árvore ML.

4.3.2 Análise Filogenética dos isolados virais do HTLV-1 oriundos de casos de infecção no estado da Bahia, e pertencentes apenas ao Subtipo a.

Para melhor contribuir com o entendimento da epidemiologia do HTLV-1 no estado da Bahia, todas as sequências LTR do HTLV-1, geradas neste trabalho e selecionadas a partir do Banco Mundial de Sequências (Quadro 1– Seção Metodologia), foram submetidas à avaliação filogenética (**Figura 10**).

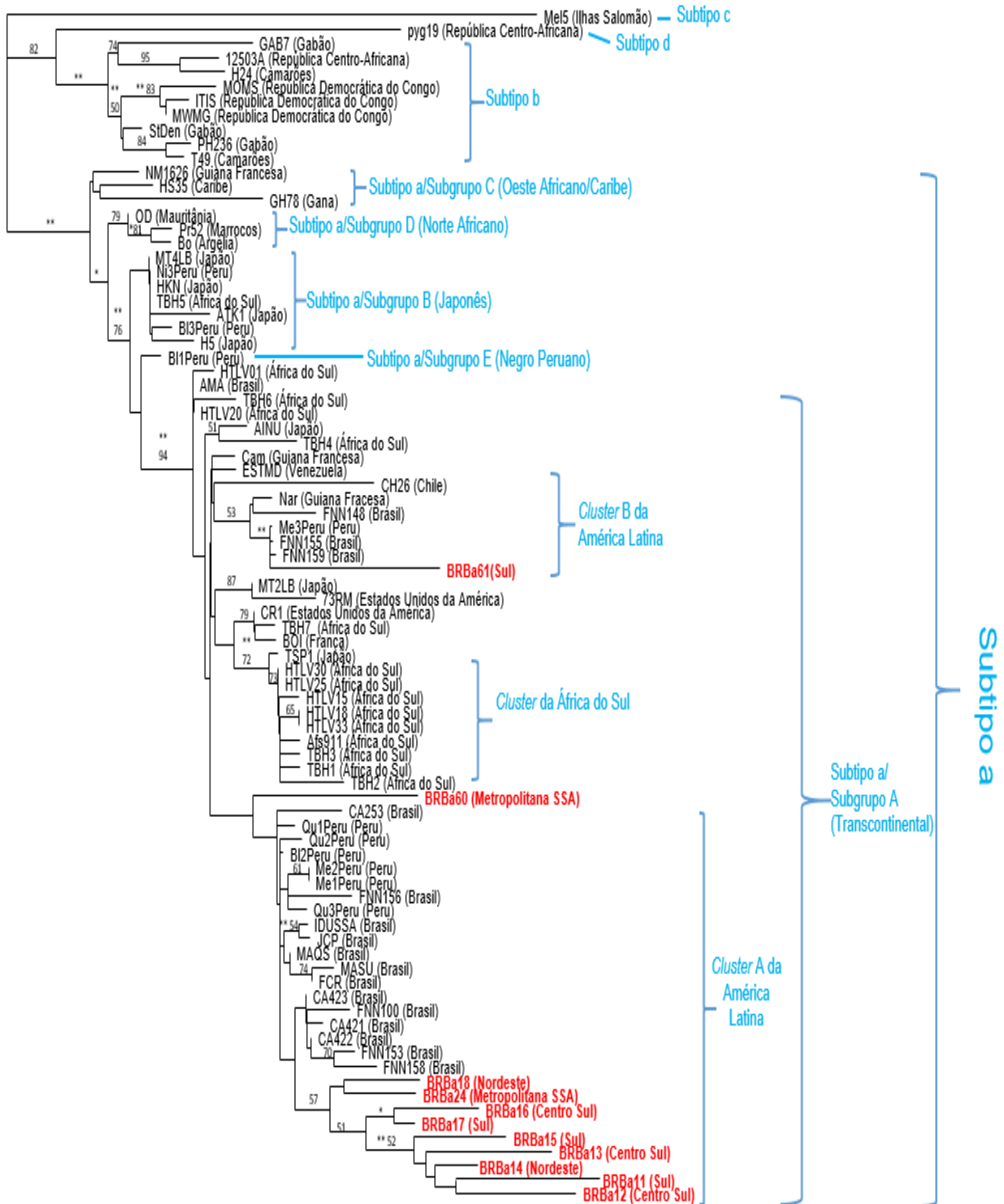


Figura 9: Árvore de distância (*Neighbor Joining*) baseada em um fragmento de 483pb da região LTR do HTLV-1. Os valores de bootstrap acima de 50% em 1000 réplicas, estão presentes nos ramos. Informações detalhadas (número de acesso ao GenBank) estão contidas na Metodologia. A árvore foi enraizada com o isolado MeI5, pertencente ao subtipo c, da Melanésia. Os valores de suporte estatístico oriundos do teste de Máxima verossimilhança estão descritos nos ramos como significativo ($p < 0,005^*$) e altamente significativo ($p < 0,001^{**}$).

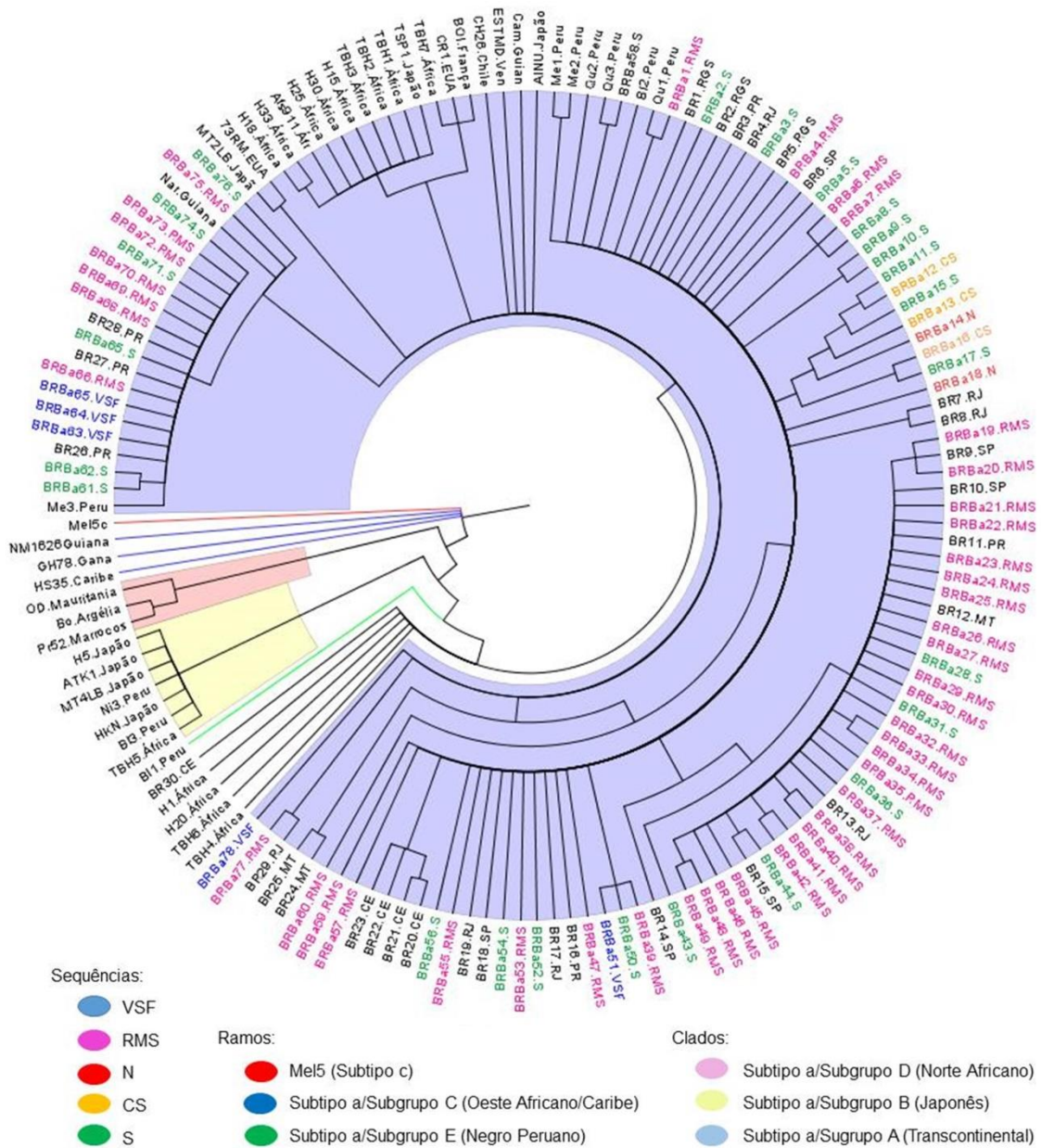


Figura 10: Árvore ML (*Maximum Likelihood*) baseada em um fragmento de 483pb da região LTR do HTLV-1 Subtipo a (Cosmopolita). Os valores de bootstrap entre 50% e 74% (*) e acima de 75% () em 1000 réplicas, estão presentes nos ramos. Informações detalhadas (número de acesso ao GenBank) estão contidas na Metodologia. A árvore foi enraizada com o isolado Mel5c (Ramo em vermelho).**

Desta inferência, é possível destacar que uma sequência (BRBa78.VSF) originada de um caso de infecção no Vale do São Francisco se posicionou no início da formação do subgrupo Transcontinental, no entanto, o mesmo comportamento não foi observado para as outras quatro sequências originadas desta mesorregião. Uma segunda sequência (BRBa51.VSF) foi inserida dentro de um clado posterior ao início da formação do subgrupo Transcontinental,

enquanto as outras três sequências desta mesorregião (BRBa63.VSF/BRBa64.VSF/BRBa65.VSF) se posicionaram dentro de um *cluster*, mais recente do mesmo Subgrupo, com outras sequências da mesorregião RMS e Sul. Desta forma, as sequências LTR do HTLV-1 originadas da mesorregião VSF apresentou diferentes características filogenéticas.

As sequências originadas de casos de infecção do HTLV-1 da Região Metropolitana de Salvador tiveram uma distribuição difusa no subgrupo Transcontinental, formando grupamentos com sequências originadas de diferentes regiões do país. No entanto, 32 (74,4%) sequências, das 43 que compõem o total de isolados virais originados da mesorregião RMS, se posicionaram em *clados* mais ancestrais do subgrupo Transcontinental. Sete delas formaram um *cluster* mais recente com outras sequências das mesorregiões Sul e Vale do São Francisco. Desta forma, a população viral circulante na Região Metropolitana de Salvador, nesta análise, apresentou como característica uma predominância de ancestralidade e divergência, em relação à população viral circulante nas outras mesorregiões.

Fenômeno semelhante foi observado com a distribuição das sequências originadas de casos de infecção do Sul do estado. Tais sequências formaram *clados* com sequências originadas da Região Metropolitana de Salvador, e das outras mesorregiões, bem como com sequências originadas de outras regiões do país. Inclusive, as sequências originadas de isolados virais identificados no Sul do estado, foram as únicas a apresentarem proximidade filogenética com as sequências originadas de casos de infecção nas regiões Nordeste e Centro Sul.

Também, a partir desta análise, é possível observar que houve a formação de *cluster* único com as sequências do Nordeste e Centro Sul do estado com valor de *Bootstrap* entre 50% e 74% (**Figura 10**). E todas as sequências originadas do Centro Sul do estado mostraram proximidade filogenética com sequências do Sul do estado. Este resultado inédito, inicia a caracterização da infecção pelo HTLV-1 nesta mesorregião e pode ser justificado pela proximidade geográfica entre elas.

Dentre os dois isolados virais originados da região Nordeste, um deles (BRBa14.N) se agrupou no *cluster* referido anteriormente, no entanto, não apresentou a mesma proximidade filogenética com as sequências do Sul do estado, que as sequências da Região Centro Sul apresentaram. A segunda sequência desta mesorregião (BRBa18.N), por sua vez, não apresentou o mesmo comportamento, tendo ficado fora do referido *cluster*.

Na tentativa de compreender melhor o comportamento dos isolados virais originados das diferentes mesorregiões do estado da Bahia, foi realizada uma segunda análise filogenética, apenas com as sequências do Subtipo a/Subgrupo Transcontinental, uma vez que todas as sequências analisadas pertencem a este subgrupo (**Figura 11**).

Desta inferência, destaca-se a formação do *cluster* da África do Sul (Em amarelo) com valor de *Bootstrap* acima de 75%. Próximo a este *cluster*, está o *cluster* B da América Latina (Destacado em rosa), formado por sequências originadas do Sul, Região Metropolitana de Salvador e Vale do São Francisco. Não sendo encontrado neste *cluster*, sequências das regiões Nordeste e Centro Sul. As demais sequências LTR do HTLV-1 oriundas do continente africano se encontram logo após da sequência AMA utilizada para enraizar a árvore, demonstrando ancestralidade em relação ao Subgrupo A.

O perfil filogenético de distribuição das sequências LTR do HTLV-1 do estado da Bahia, nesta inferência, foi o mesmo observado na inferência do Subtipo a e todos os demais subgrupos.

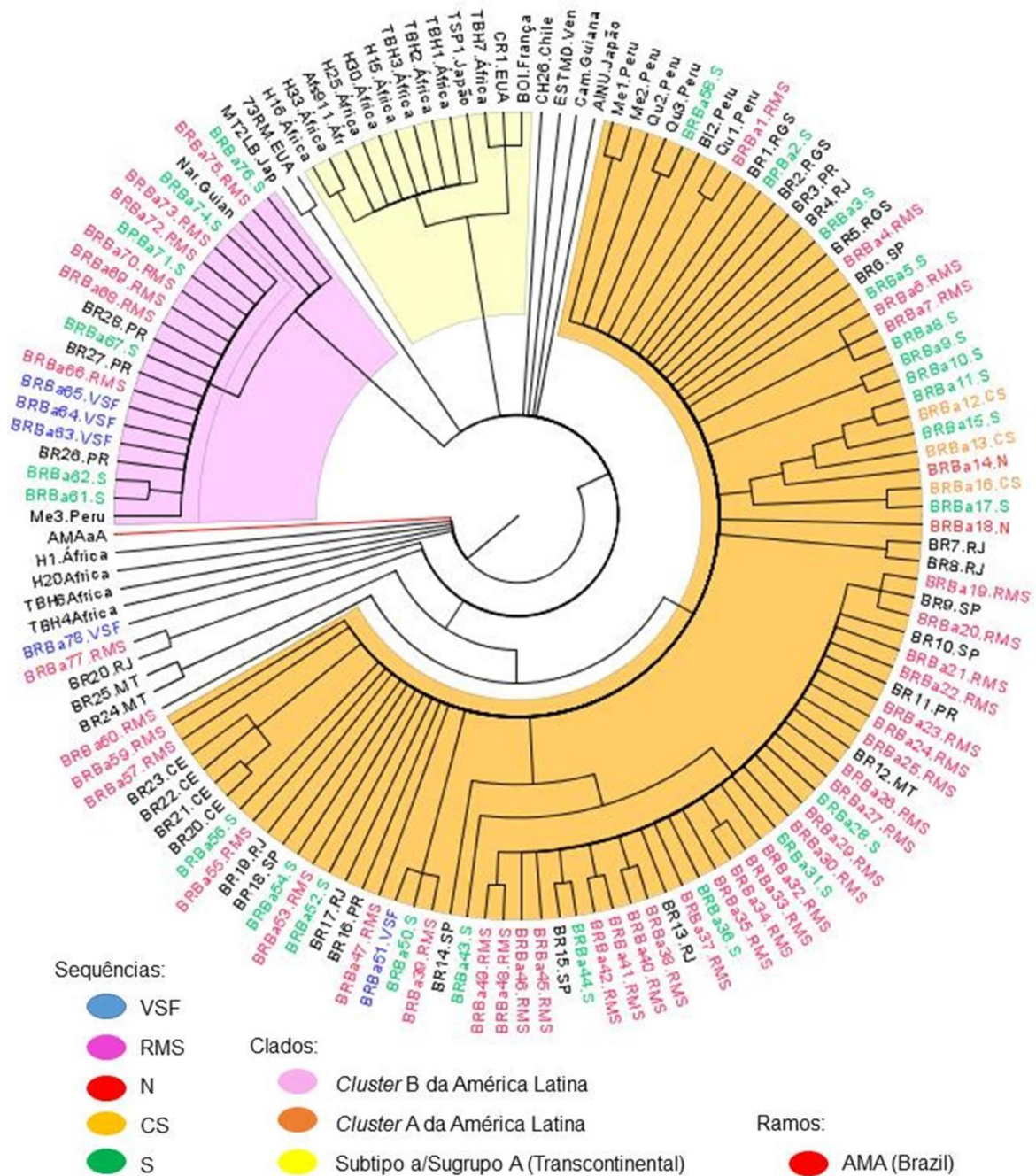


Figura 11: Árvore ML (*Maximum Likelihood*) baseada em um fragmento de 483pb da região LTR do HTLV-1 Subtipo a/Subgrupo A (Cosmopolita/Transcontinental). Os valores de *Bootstrap* acima de 50% (*) e acima de 75% () em 1000 réplicas, estão presentes nos ramos. Informações detalhadas (Número de acesso ao GenBank) estão contidas na Metodologia. A árvore foi enraizada com o isolado AMA (Ramo em vermelho).**

4.4 Análise Bayesiana das sequências LTR do HTLV-1 oriundas do estado da Bahia e Estimativa da Taxa Evolutiva a partir desses isolados virais.

O conjunto das 60 sequências LTR do HTLV-1 provenientes de casos de infecção no estado da Bahia, foi testado, por parâmetros evolutivos, para a identificação do melhor modelo para o referido conjunto de dados. Dentre os modelos testados, o que melhor reproduziu a realidade dessas sequências analisadas foi a do Relógio Molecular Relaxado com crescimento exponencial, modelo escolhido após uma amostragem de 150 milhões de árvores. Deste modo o valor encontrado para a taxa evolutiva foi de 1.0×10^{-4} substituição/sítio/ano (95% IC: $4.2752E^{-6}$, $2.7948E^{-4}$), dado inédito nesta população. Para confiabilidade do cálculo da taxa evolutiva outros valores de convergência foram analisados como a média da probabilidade posterior que foi de -1877.2573, variância de 2832.7381, mediana de -1872.2514, tempo de auto-correlação de $8.1185 \cdot 10^5$ e dimensão eficaz da amostra de 166.3057.

A inferência filogenética identificada pela análise como sendo a melhor para esse conjunto de dados, e que relaciona apenas as sequências oriundas do estado da Bahia entre si, está na **Figura 12**. A partir dessa análise, é possível identificar a maioria dos *clusters* formados reúnem as sequências LTR do HTLV-1 oriundas de cepas virais isoladas nas mesorregiões RMS e Sul. Esta proximidade filogenética, inclusive já havia sido verificada nas análises anteriores. Das cinco sequências LTR do HTLV-1 originadas de casos de infecção da mesorregião VSF, três delas formaram *clusters* com sequências originadas de casos de infecção da mesorregião RMS. As outras duas sequências estão inseridas em *clusters* maiores, porém também com sequências originadas da mesorregião RMS. Duas das três sequências LTR do HTLV-1 originadas de casos de infecção da mesorregião CS formou *clusters* com sequências originadas de cepas virais isolados do sul do estado. A terceira sequência LTR do HTLV-1 originada da mesorregião CS formou um *cluster* com uma sequência da mesorregião Nordeste. Estes três grupamentos estão inseridos em um *cluster* maior, destacado em azul. E por fim, a segunda sequência LTR do HTLV-1 originada da mesorregião nordeste formou um

cluster com outras duas seqüências originadas da mesorregião sul (destacado em verde).

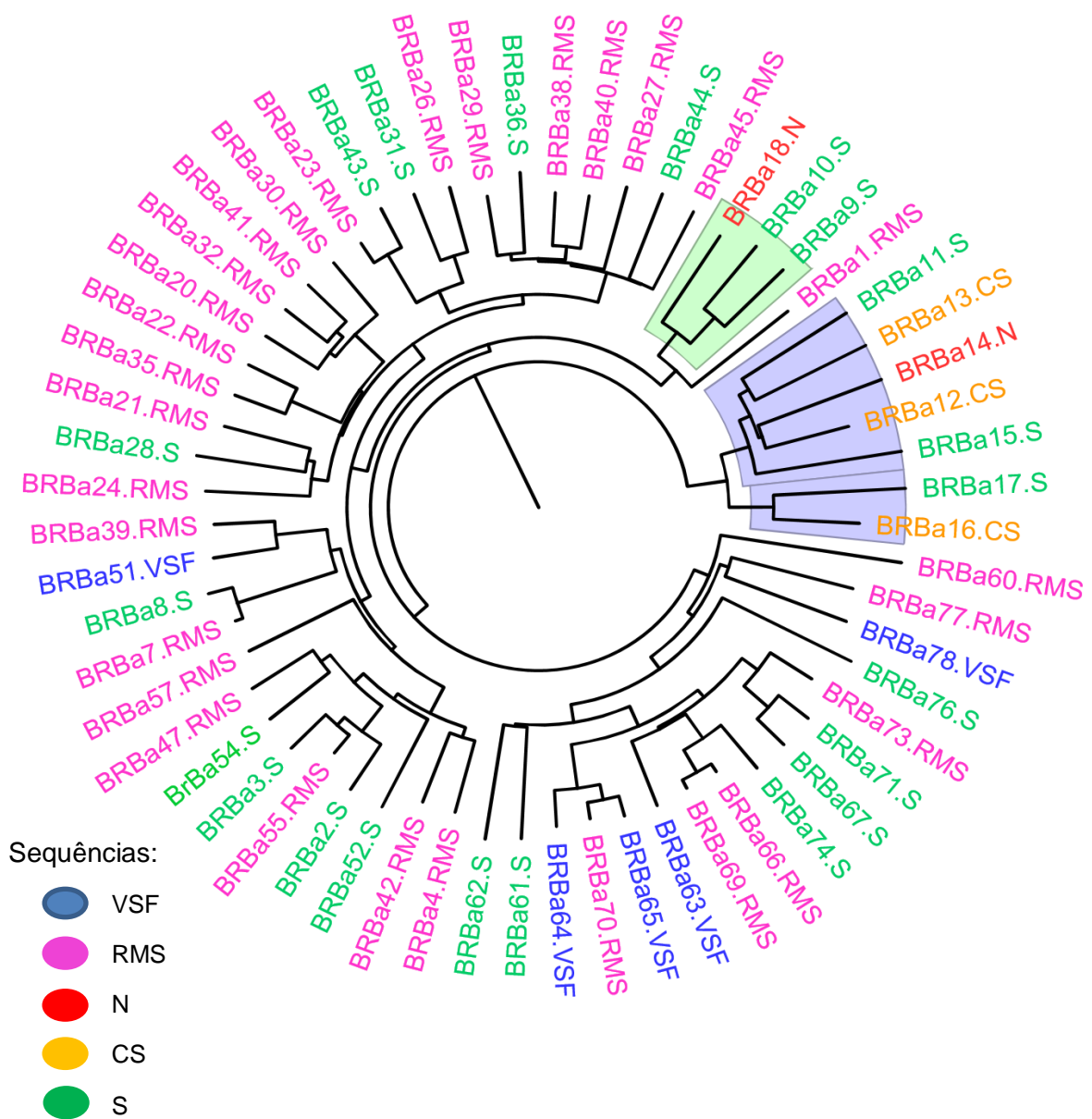


Figura 12: Árvore Bayesiana baseada em um fragmento de 483pb da região LTR do HTLV-1. Não enraizada, contendo 61 seqüências LTR do HTLV-1 originadas de casos de infecção de diferentes mesorregiões do estado da Bahia.

5 DISCUSSÃO

A busca por novos casos de infecção pelo HTLV-1, em diferentes mesorregiões, além da RMS, S e VSF, se baseou na seleção de amostras infectadas armazenadas no Biobanco do CHTLV. A amostra de conveniência era composta por 50 indivíduos, no entanto, ao final, apenas 11 sequências LTR do HTLV-1 foram geradas a partir desta busca. Como as novas sequências geradas não contemplaram todas as mesorregiões da Bahia, pois não tínhamos representação no Biobanco do CHTLV, acreditamos que isso se deve ao fato de que indivíduos infectados pelo HTLV-1 de outras mesorregiões possam estar se dirigindo a outros estados em busca de acompanhamento. Na mesorregião do Oeste baiano, por exemplo, é possível que os indivíduos infectados migrem para o estado vizinho na busca de diagnóstico e acompanhamento especializado, onde a distância em relação a Salvador é menor. Além disso, como as amostras foram retiradas do Biobanco do CHTLV, algumas delas eram antigas e com baixa qualidade, o que justifica a perda destas amostras ao longo do processo. Desta forma, estudos futuros mais abrangentes sobre a origem, epidemiologia e disseminação do HTLV-1 devem encontrar dificuldades semelhantes às encontradas por este estudo, no que diz respeito a identificar casos de infecção pelo HTLV-1, em outras mesorregiões do estado, mesmo que esta busca seja realizada em Centros de Referência ao Atendimento de Indivíduos infectados pelo HTLV-1, como é o caso deste estudo.

Em contrapartida, é importante ressaltar que este trabalho gerou informação genética sobre o HTLV-1 em mesorregiões que ainda não tinham sido estudadas: é o caso das mesorregiões Centro Sul e Nordeste. Outra observação que é importante fazer, a partir da experiência gerada neste trabalho, é a necessidade de aumentar o tamanho das sequências LTR do HTLV-1, tentando contemplar esta região genômica por completo, para aumentar a diferenciação entre os isolados virais, e conseqüentemente o poder filogenético. Neste trabalho, isto não foi possível já que o protocolo utilizado gera um fragmento de pouco mais de 550pb, aliado à impossibilidade de

refazer o sequenciamento, por dificuldades de ordem logística como falta de polímero, bem como falta de tempo hábil para repetir o sequenciamento.

Apesar de dados demonstrarem que milhões de pessoas foram infectadas com HTLV-1 em todo o mundo, a maior parte do que se sabe sobre genomas dessas estirpes, foi obtido principalmente a partir de sequências parciais (mais curtas) do genoma viral (PESSÔA et al, 2014). A escassez de sequências completas deste genoma leva a uma necessidade de uma caracterização de mais efetiva de modo a gerar materiais genéticos mais recentes e completos destes vírus, fornecendo assim ferramentas mais úteis para o estudo de origem e evolução, além de ajudar na vigilância epidemiológica.

O cálculo da distância p , é uma forma simples de obter informações sobre a diversidade genética de sequências nucleotídicas, e, portanto, seus resultados merecem cuidado e parcimônia na interpretação, especialmente quando se utiliza grupos pouco numerosos, como foi o caso do grupo de sequências das mesorregiões Nordeste e Centro Sul, com apenas duas e três sequências, respectivamente. Portanto, sobre os dados de distância p , é possível destacar que a maior divergência encontrada para a avaliação dentro das mesorregiões foi a da região Centro Sul, e isto pode ser devido ao reduzido número de sequências ($N=3$), neste grupo, o que apenas amplificou a diferença entre elas. De outro modo, também é possível sugerir que estas sequências podem, de fato, representar a ocorrência de casos de infecção pelo HTLV-1, oriundas de cepas virais, com características bem diferentes, seja esta diferença originada por ancestrais diferentes, ou mesmo pela ocorrência diferenciada de outros eventos de pressão seletiva. Discussão semelhante pode ser conduzida para o resultado obtido na avaliação da região Nordeste, que apresentou a segunda maior divergência entre as duas sequências deste grupo. Esta limitação provavelmente influencia os resultados de comparação da divergência entre as mesorregiões, o que limita outras extrapolações. Nos grupos mais numerosos, sendo eles das mesorregiões RMS e Sul, a divergência foi muito semelhante, não sendo possível com este resultado confirmar uma possível disseminação do HTLV-1 entre estas duas mesorregiões, por exemplo de Salvador para o Sul do estado, porém permite a

sugestão de que estas mesorregiões tenham introduções semelhantes do HTLV-1.

Sobre a análise filogenética de subtipagem, o agrupamento de todas as novas sequências geradas, neste trabalho, nos *clusters* que pertencem ao subtipo Cosmopolita e subgrupo A Transcontinental corrobora com dados anteriores, e indicam que existe uma predominância deste subtipo/subgrupo circulando no território nacional. Esse mesmo fenômeno é observado em dados anteriores do Estado da Bahia (ALCANTARA et al, 2003; ALCANTARA et al, 2006; MOTA et al, 2007; REGO et al, 2008; MAGALHÃES et al, 2008). Em um recente estudo de reconstrução da história filogenética do vírus no Brasil, realizado através da análise molecular de 88 sequências LTR do HTLV-1, foi possível observar que o comportamento filogenético das sequências, subtipadas como Cosmopolita, foi de formar diferentes grupamentos com cepas de diferentes origens geográficas: Europa, África, Ásia e, principalmente, América do Sul (cluster latino-americano). Esse agrupamento das sequências HTLV-1 brasileiras em diferentes *subclusters* apoia assim a hipótese de ocorrência de várias apresentações do subtipo Cosmopolita no Brasil. Estes resultados suportam que a introdução do HTLV-1 no país ocorreu em várias ocasiões e demonstram uma maior proximidade filogenética entre as sequências brasileiras e outras com origem na América Latina e com origem Africana (PESSÔA et al, 2014).

De acordo com a análise filogenética das sequências LTR do HTLV-1 originadas de casos de infecção no estado da Bahia, pertencentes apenas ao subtipo Cosmopolita (a), observamos comportamentos distintos. Desta inferência, é possível destacar que uma sequência (BRBa78.VSF) originada de um caso de infecção no Vale do São Francisco se posicionou no início da formação do subgrupo Transcontinental, sugerindo maior ancestralidade desta sequência em relação às outras sequências desta mesma mesorregião, especialmente porque as demais quatro sequências do VSF, estão mais recentes dentro deste subgrupo. Dados já publicados de investigação das características filogenéticas destas sequências (Mesorregião VSF), no estado, demonstraram ancestralidade com sequências da África Central e África do Sul, e proximidade genética com sequências originadas de Salvador, sugerindo

que a infecção pelo HTLV-1 tenha se disseminado de Salvador para esta região (REGO et al, 2008). Inferências semelhantes podem ser obtidas das análises realizadas neste trabalho, contudo, é importante destacar que essa distribuição das sequências do VSF em diferentes *clados* pode sugerir também casos de infecção mais antigos e mais recentes, mesmo que sejam originados da RMS.

As sequências originadas de casos de infecção do HTLV-1 da Região Metropolitana de Salvador tiveram uma distribuição difusa no subgrupo Transcontinental, formando grupamentos com sequências originadas de diferentes regiões do país, sugerindo a possibilidade de múltiplas introduções e não apenas uma introdução única do HTLV-1 nesta população. Desta forma, a população viral circulante na Região Metropolitana de Salvador parece apresentar como característica uma predominância de ancestralidade e divergência, em relação às outras mesorregiões. Esta inferência pode ser confirmada pelo que se tem demonstrado a respeito da introdução deste vírus em Salvador. Sugere-se que a introdução do HTLV-1 em Salvador ocorreu durante o período Pós-Colombiano, como resultado do tráfico de escravos, ocorrido para o Brasil, entre os séculos XVI e XIX (VAN DOOREN et al, 1998; ALCANTARA et al, 2006). Neste contexto, o fato de a Região Metropolitana de Salvador abrigar a Bahia de Todos os Santos, e por ela ter ocorrido a entrada de escravos, pode ser um argumento adicional na constatação desta maior diversidade e ancestralidade das sequências originadas da RMS.

As sequências originadas de casos de infecção pelo HTLV-1 do Sul da Bahia, por sua vez, se comportaram formando *clados* com sequências das outras quatro mesorregiões, bem como outras regiões do Brasil. A princípio sugere-se, por isso, que existe uma possível disseminação do HTLV-1 desta mesorregião (Bahia) para outros estados da federação, ao assumir ser este estado uma importante porta de entrada do HTLV-1 no país. Não excluindo também a possibilidade de entrada do HTLV-1 nesta mesorregião não apenas por casos de infecção da Região Metropolitana de Salvador, ou por outras introduções pós-colombianas, mas também através de casos de infecção de fora do estado da Bahia. Estudo recente, também realizado para tentar investigar a origem do HTLV-1 no sudeste do estado, concluiu que

possivelmente os casos de infecção detectados e analisados da região sudeste do estado se originaram da disseminação do vírus a partir da Região Metropolitana de Salvador (ALELUIA et al, 2015).

Também foi possível observar maior proximidade filogenética das sequências LTR do HTLV-1 da mesorregião Centro Sul, com sequências originadas de casos de infecção nas regiões Sul e Nordeste: sendo observada inclusive na análise Bayesiana. Por conta da disposição geográfica das mesorregiões Centro Sul, Nordeste e Sul, é possível que esta relativa proximidade filogenética tenha origem no mesmo foco de infecção, seja ela a região Sul ou a Região Metropolitana de Salvador, e as consequentes rotas migratórias internas entre as mesorregiões.

Especialmente na análise filogenética com isolados virais apenas do Subgrupo Transcontinental, do Subtipo Cosmopolita, destaca-se a formação do *cluster* da África do Sul (Em amarelo) com valor de *Bootstrap* acima de 75%, como já observado na literatura (VAN DOOREN et al, 1998; MOTA et al, 2007). A formação do *cluster* B da América Latina pode ser um indicativo de formação de rotas de disseminação do HTLV-1 no estado da Bahia, partindo da RMS, seguindo as rotas migratórias populacionais, pelo agrupamento das sequências das mesorregiões Sul, Região Metropolitana de Salvador e Vale de São Francisco. Por outro lado, o grupamento das sequências com dois *clusters* diferentes da América Latina sugere também múltiplas introduções do HTLV-1 no estado, uma vez que há relação filogenética com isolados da América Latina e da África do Sul (VAN DOOREN et al, 1998; MOTA et al, 2007).

Pode-se dizer que o fator migração é um dos principais fatores ecológicos que influenciam na diversidade genética de populações humanas. Assim se faz necessário, o entendimento das causas e efeitos das migrações para formação de uma população, uma vez que estas informações são importantes para interpretar a história evolutiva da nossa espécie e sua resposta a determinadas doenças (MACHADO et al, 2012). Com os avanços na área da biologia molecular, a análise da diversidade biológica atualmente é feita pela identificação de variantes no DNA. Assim, com a detecção de marcadores genéticos específicos é possível em uma região geográfica estimar a

contribuição das populações ancestrais na formação desta população em estudo (ABE-SANDES et al, 2010; FELIX et al, 2010). Portanto, inferências mais conclusivas podem ser alcançadas à medida que investigações no hospedeiro sejam adicionadas às avaliações virais.

No que diz respeito à dinâmica populacional, historicamente a ocupação do território baiano aconteceu de forma lenta e gradual, por meio de rotas de disseminação/migração interna, a partir do período colonial. A migração acontecia pela necessidade de espaço para plantação e manutenção da agricultura do estado além da criação de gado, comum na época. As expedições que ocorreram durante os séculos XVI, XVII e XVIII, foram de extrema importância para formação do território deste estado. Na grande maioria, estas saíam do litoral baiano e seguiam para diferentes regiões do território baiano, como recôncavo, sertão e nordeste, além de outras regiões do Brasil, como Goiás, Minas Gerais, Piauí e Maranhão. Ficando claro que a ocupação da Bahia aconteceu do litoral (Mais especificamente Salvador e ilha de Itaparica) seguindo para as outras regiões do estado e do País. Relatos históricos demonstram que o nordeste baiano, por exemplo, recebeu muitas expedições de cunho religioso (missões religiosas). Estudiosos da demografia baiana observam a expressiva contribuição de imigrantes na população do estado, na formação e ocupação do território. Os principais imigrantes são desde portugueses, espanhóis, italianos, alemães, franceses, ingleses; até, em menor número, judeus e sírio-libaneses. Apesar, na época, de os africanos não serem visto como imigrantes e sim como mão de obra barata (escrava), estes foram importantíssimos para composição da população baiana, dita como miscigenada. O relacionamento entre negros escravos e senhores era mantido em segredo, mas era muito comum na época. Além disso, algumas revoltas marcantes dos escravos contra suas condições de vida, destacando a Revolta dos Malês em Salvador (1835), promoveram fugas para outros territórios, pouco povoados. (TAVARES, 2008).

Portanto, sem a pretensão, de fazer aqui qualquer afirmação, esses resultados filogenéticos, embasados inclusive pelas relações na análise bayesiana, nos motiva a levantar algumas possibilidades de rotas de disseminação do HTLV-1 dentro do estado da Bahia, sendo necessário

confirmar ou mesmo negá-las em estudos posteriores. São elas: 1- a disseminação do HTLV-1 da RMS para as regiões Sul, N e VSF (Setas azuis) (**Figura 13A**); 2- a disseminação do HTLV-1 do Sul para o Centro Sul (Seta Vermelha) (**Figura 13B**); 3- a disseminação do HTLV-1 do Centro Sul para a Região Nordeste e vice-versa (Setas Pretas) (**Figura 13C**).

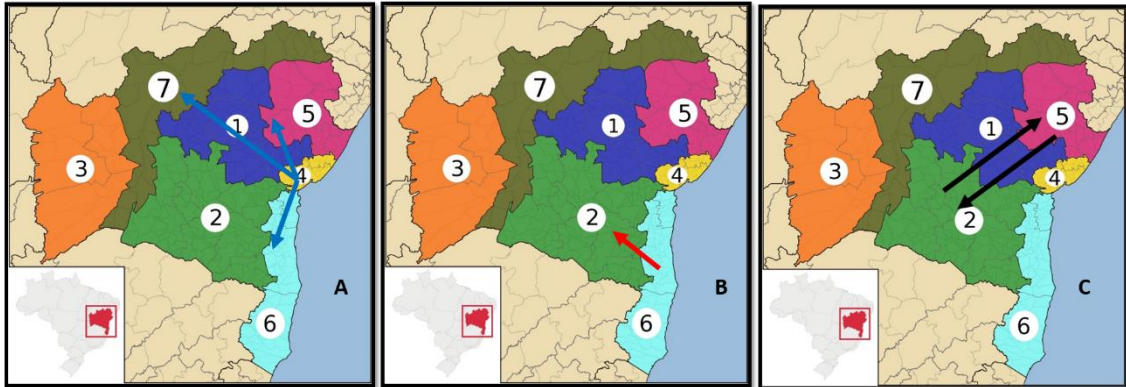


Figura 13: Possíveis rotas de disseminação do HTLV-1, entre as mesorregiões, do estado da Bahia. 1. Centro-Norte (CN), 2. Centro sul (CS), 3. Extremo Oeste (EO), 4. Região Metropolitana de Salvador (RMS), 5. Nordeste (N), 6. Sul (S) e 7. Vale do São Francisco (VSF)

A motivação para estimar a taxa evolutiva do HTLV-1 é exatamente a escassez desse tipo de dado, especialmente em populações brasileiras. Esse é o primeiro trabalho, que estuda isolados virais de casos de infecção no Brasil, para estimativa da taxa evolutiva. De acordo, com as análises realizadas, neste trabalho, a taxa encontrada é um pouco maior, quando comparamos com outros valores já descritos na literatura: a exemplo de 1.08×10^{-4} e 2.7×10^{-5} substituição/sítio/ano, para um *data set* com sequências originadas de casos de infecção em usuários de drogas; e 7.06×10^{-7} - 1.38×10^{-5} substituição/sítio/ano, em quimeras LTR-env (SALEMI et al, 1998; VAN DOOREN et al, 2004). Essa diferença pode ser real, revelando uma característica molecular dos isolados virais circulantes no Brasil, e especificamente na Bahia, no entanto, não podemos deixar de considerar que o ideal para uma melhor avaliação dessa natureza seria utilizar um *data set* com as seguintes características: - isolados virais separados em grupos com

diferentes datas de coleta; - estes referidos grupos com um número mínimo de isolados virais; - a separação temporal, para as datas de coleta, ser acima de 5 anos.

Finalmente, é preciso destacar que este trabalho se trata de um plano piloto para investigação da epidemiologia molecular do HTLV-1 em todo o estado da Bahia. Desta forma, os achados aqui mostrados ainda merecem validação posterior, em análises que disponham de um número maior de sequências nas mesorregiões Nordeste, Centro Sul e Vale do São Francisco, bem como sequências do Centro Norte e Oeste, mesorregiões ainda não caracterizadas quanto a presença do HTLV-1.

Contudo, independente das limitações enfrentadas neste trabalho, acreditamos que os ganhos gerados nele reforçam ainda mais a necessidade de se investigar melhor a origem e disseminação do HTLV-1 no estado da Bahia, já que o pouco conhecimento que se tem sobre este assunto, estava restrito a apenas três mesorregiões, e agora a cinco das sete mesorregiões do estado. Ou seja, não encontrar sequências oriundas de outras mesorregiões do estado, não significa de sobremaneira que ali não há a infecção pelo HTLV-1. Além disso, sendo Salvador uma das cidades com maior prevalência do vírus no país, e demonstrando filogeneticamente que possivelmente os casos de infecção pelo HTLV-1 nas outras mesorregiões do estado se originaram de Salvador, deve existir um cenário de infecção e disseminação do HTLV-1 em todas as demais mesorregiões que merece estudo e investigação (BRITTO et al, 1998; MOREIRA et al, 1993).

6 CONCLUSÕES

- Foi possível identificar 11 novos isolados virais, originados de casos de infecção pelo HTLV-1 em diferentes mesorregiões do Estado da Bahia;
- Foi realizada a caracterização filogenética desses 11 novos isolados, sendo todos eles, pertencentes ao subtipo a, subgrupo A;
- Pela primeira vez, foi identificada a presença do Subtipo a/Subgrupo A nas mesorregiões Nordeste e Centro Sul, regiões ainda não caracterizadas quanto à presença do HTLV-1;
- O cálculo de distância p , embora insuficientes, apontam para um perfil divergente e da infecção pelo HTLV-1 na mesorregião Centro-Sul;
- As sequências LTR do HTLV-1, originadas de casos de infecção na mesorregião RMS, revela características de ancestralidade destas sequências em comparação com as de outras mesorregiões, sugerindo a introdução do HTLV-1 a partir dessa mesorregião;
- A sequências LTR do HTLV-1, originadas de casos de infecção na mesorregião S, apresentaram características semelhantes as sequências da RMS, o que pode sugerir origem dessas sequências na RMS, ou até introduções semelhantes nestas duas mesorregiões;
- A proximidade filogenética das sequências LTR do HTLV-1, originadas de casos de infecção das mesorregiões N, CS e S, sugere rotas migratórias populacionais entre elas;
- Estima-se que a taxa evolutiva das cepas de HTLV-1 circulantes no estado da Bahia seja de 1.0×10^{-4} substituição/sítio/ano (95% IC: $4.2752E^{-6}$, $2.7948E^{-4}$).

REFERÊNCIAS

- ABE-SANDES, K; et al. Ancestralidade Genômica, nível socioeconômico e vulnerabilidade ao HIV/aids na Bahia, Brasil. **Saúde Soc (USP. Impresso)**. v. 19, p. 75-84, 2010.
- ALARCON, J. O.; et al. High endemicity of human T-cell lymphotropic virus type 1 among pregnant women in peru. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.** 42, 604–609, 2006.
- ALCANTARA, L. C. J. *et al.* Globin haplotypes of human T-cell lymphotropic virus type I-infected individuals in Salvador, Bahia, Brazil, suggest a post-Columbian African origin of this virus. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 33, n. 4, p. 536-42, 2003.
- ALCANTARA, L. C. J; et. al. Tracing the origin of Brazilian HTLV-1 as determined by analysis of host and viral genes. **AIDS 20: 780-782**, 2006.
- ALELUIA, M. M.; et al. The origin of HTLV-1 in southern Bahia by phylogenetic, mtDNA and β -globin analysis. **Virology Reports 5, 63–74**, 2015.
- ANUPAM, B; et al. The need to accessorize: molecular roles of HTLV-1 p30 and HTLV-2 p28 accessory proteins in the viral life cycle. **Frontiers in microbiology**. doi: 10.3389/fmicb.2013.00275, 2013.
- ARAUJO, T. H.; et al. Inferences about the global scenario of human T-cell lymphotropic virus type 1 infection using data mining of viral sequences. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2014 Jul;109(4):448-51, 2014.
- AZEVEDO, E. S., et al. Spread and diversity of human populations in Bahia, Brazil. **Hum Biol 54:329–341**, 1982.
- BANDEIRA, L. M.; et al. High Prevalence of HTLV-1 Infection among Japanese Immigrants in Non-endemic Area of Brazil. **PLoS Negl Trop Dis 9(4): e0003691. doi:10.1371/ journal.pntd.0003691**, 2015.
- BANGHAM, C. R. The Immune control and cell-to-cell spread of human T-lymphotropic virus type 1. **J Gen Virol 84, 3177-3189**, 2003.
- BANGHAM, C. R. M. & OSAME, M. Cellular immune response to HTLV-1. **Oncogene 24, 6035– 6046**, 2005.
- BATTINI, J. L.; et al. The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV. **Cell 115, 449-459**, 2003.
- BEZERRA, A. C. S.; et al. **HTLV-III - Triagem e diagnóstico sorológico em unidades hemoterápicas e laboratórios de saúde pública**. - Brasília: Ministério da Saúde, Coordenação Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids. 54 p.: il. (Série TELELAB),1998.
- BIGGAR RJ; TAYLOR ME; NEEL JV; HJELLE B; LEVINE PH; BLACK FL; SHAW GM; SHARP PM; HAHN BH. Genetic variants of Human T-lymphotropic virus type II in American Indian groups. **Virology 216, 165-173**, 1996.
- BITTENCOURT, A. L.; et al. Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 Infection Among Pregnant Women in Northeastern Brazil. **JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, 2001.

- BRITTO, A. P. C. R.; et al. Infecção pelo HTLV-I/II no Estado da Bahia. **Rev Soc Bras Med Trop** **31**: 35-41, 1998.
- CALATTINI, R.; et al. Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. **Retrovirology**, **2**:30 doi:10.1186/1742-4690-2-30, 2005.
- CARNEIRO-PROIETTI, A. B. F.; et al. Infecção e doença pelos vírus linfotrópicos humanos de células T (HTLV-I/II) no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** **35(5)**: 499-508, 2002.
- CARNEIRO-PROIETTI, A. B.; et al. HTLV in the Americas: challenges and perspectives. **Rev Panam Salud Publica**, Jan; **19(1)**:44-53, 2006.
- CATALAN-SOARES, B. C. Os vírus linfotrópicos de células T humanos (HTLV) na última década (1990-2000) Aspectos epidemiológicos. **Rev. Bras. Epidemiol.** Vol. **4**, Nº **2**, 2001.
- CATALAN-SOARES B.; et al. [Human T-cell lymphotropic virus in family members of seropositive blood donors: silent dissemination]. **Rev Panam Salud Publica.** Dec; **16(6)**:387-94, 2004.
- CATALAN-SOARES, B.; et al. Heterogeneous geographic distribution of human T-cell lymphotropic viruses I and II (HTLV-I/II): serological screening prevalence rates in blood donors from large urban areas in Brazil. **Cad Saúde Pública** **21(3)**, 926-931, 2005.
- CHEN, J; ZEKENG, L; YAMASHITA, M; TAKEISHA, J; MIURA, T; IDO, E; MBOUDJEKA, I; TSAGUE, JM; HAYAMI, M; KAPTUE L. HTLV isolated from a Pygmy in Cameroon is related but distinct from the known Central African type. **AIDS Res Hum Retroviruses** **11**, 1529-1531, 1995.
- CIMARELLI, A.; et al. Clonal expansion of human T-cell leukemia virus type II in patients with high proviral load. **Virology** **223**, 362-364, 1996.
- CIMINALE, V.; et al. Complex Splicing in the Human T-Cell Leukemia Virus (HTLV) Family of Retroviruses: Novel mRNAs and Proteins Produced by HTLV Type I. **JOURNAL OF VIROLOGY**, p. 1737-1745 0022-538X/92/031737-09\$02.00/0, 1992.
- CONSTANTINE, N. T.; et al. Retroviral testing. Essentials for Quality Control and Laboratory Diagnosis. **CRC Press**; 105-107, 1992.
- COSKUN, A. K. & SUTTON, R. E. Expression of glucose transporter 1 confers susceptibility to human T-cell leukemia virus envelope-mediated fusion. **J Virol** **79(7)**, 4150-4158, 2005.
- CURRER, R.; et al. HTLV Tax: a fascinating multifunctional co-regulator of viral and cellular pathways. **Frontiers in microbiology**. doi: 10.3389/fmicb.2012.00406, 2012.
- DE THE, G. & KAZANII M. An HTLV-I/II vaccine: from animal models to clinical trials? **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.** **13 Suppl 1**:S191-8, 1996.
- DRUMMOND, A. J. AND RAMBAUT, A. Beast: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. **BMC Evol Biol.**; **7**:214, 2007.
- DOS SANTOS, E. L.; et al. Caracterização molecular do HTLV-1/2 em doadores de sangue em Belém, Estado do Pará: primeira descrição do subtipo HTLV-2b na região

Amazônica. **Rev. da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 42(3):271-276, 2009.

DOURADO, I.; et al. HTLV-I in the general population of Salvador, Brazil: a city with African ethnic and sociodemographic characteristics. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes** 34:527-531, 2003.

EDWARDS, D; FENIZIA, C; GOLD, H; CASTRO-AMARANTE, MF; BUCHMANN, C; PISE-MASISON, CA; FRANCHINI, G. HTLV-1 *Orf-I* and *Orf-II*-Encoded Proteins in Viral Infection and Persistence. **Viruses**, 3, 2011.

FELIX, G. E. S.; et al. Ancestry informative markers and complete blood count 92 parameters in Brazilian blood donors. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** 32(4): 282-285, 2010.

FERRI, E. K.; GOMES, A. M. Doenças sexualmente transmissíveis e aids entre indígenas do Distrito Sanitário Especial Indígena do Mato Grosso do Sul de 2001 a 2005. **Saúde Coletiva** 2011;08 (47):07-12, 2010.

FILIPPONE, C.; et al. A new and frequent human T-cell leukemia virus indeterminate Western blot pattern: epidemiological determinants and PCR results in central African inhabitants. **J. Clin. Microbiol.** 50, 1663–1672, 2012.

FUKUMOTO, R.; et al. In vivo genetic mutations define predominant functions of the human T-cell leukemia/lymphoma virus p12I protein. **Blood First Edition paper, September 12; DOI 10.1182/blood-2008-04-146928**, 2009.

GALLO, R. C.; et al. Kyoto Workshop on Some Specific Recent Advances in Human Tumor Virology. **Cancer Res**;41:4738-4739, 1981.

GALVÃO-CASTRO, B.; et al. Epidemiologia E Origem Do Htlv-I Em Salvador Estado Da Bahia: A Cidade Com A Mais Elevada Prevalência Desta Infecção No Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**;79:1(Jan-Dez):3-10, 2009.

GESSAIN, A.; et al. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. **Lancet**; 2: 407- 410, 1985.

GESSAIN, A; et al. Genetic variability and molecular epidemiology of Human and Simian T-cell leukemia/ lymphoma virus type 1. **J Acq Imm Def Synd and Hum Retrov** 13 S1, 132-145, 1992.

GESSAIN, A.; et al. Highly divergent molecular variants of human T-lymphotropic virus type I from isolated populations in Papua New Guinea and the Solomon Islands. **Proc Natl Acad Sci**; 88:7694-7698, 1991.

GESSAIN, A. & CASSAR, O. Epidemiological aspects and world distribution of HTLV-1 infection. **Frontiers in Microbiology. doi: 10.3389/fmicb.2012.00388**, 2012

GHEZ, D.; et al. Neuropilin-1 is involved in Human T-cell Lymphotropic virus type 1 entry. **J Virol** 80, 6844-6854, 2006.

GREEN, P. L. & CHEN, I. S. Y. *Fields Virology* (4th edn. Knipe D, Howley P, Griffin D, Lamb R, Martin M and Straus S (eds.)) **Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia (pp.) 1941–1969**, 2001.

GUINDON, S.; et al. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. **Syst Biol.** May;59(3):307-21. doi: 10.1093/sysbio/syq010. Epub 2010 Mar 29, 2010.

HALL, W. W. et al. Human T-cell leukemia/lymphoma virus, type II (HTLV-II): emergence of an important newly recognized pathogen. **Semin Virol**, v. 5, p. 165-78, 1994.

HASHIMOTO, K. et al. Quantitative in situ PCR assay of HTLV-1 infected cells in peripheral blood lymphocytes of patients with ATL, HAM/TSP and asymptomatic carriers. **J Neurol Sci**, v. 159, n. 1, p. 67-72, 1998.

JEANMOUGIN, F., et al. Multiple sequence alignment with Clustal X. **Trends Biochem. Sci.**, 23, 403-405, 1998.

JIN, Q.; et al. Alternate receptor usage of neuropilin- 1 and glucose transporter protein 1 by the Human T-cell Leukemia viruua type 1. **Virology** 396, 203-212, 2009.

KALYANARAMAN, V. S.; et al. A new subtype of HTLV-II associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. **Science**; 218, 571-573, 1982.

KHABBAZ, R. F.; et al. Seroprevalence of human T-lymphotropic virus type I (HTLVI) in Costa Rica. **AIDS Res. Hum. Retroviruses** 6, 959-960, 1990.

KORALNIK I. J.; et al. Protein isoforms encoded by the pX region of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 89, pp. 8813-8817, Medical Sciences*, 1992.

KUMAR, S.; et al. MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software for microcomputers. **Comput Appl Biosci**, Apr;10(2):189-91, 1994.

LA GRENADE, L. HTLV-I associated infective dermatitis: past, present, and future. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol** 13 Suppl 1, S46-49, 1996.]

LAIRMORE MD; JACOBSON S; GRACIA F; DE BK; CASTILLO L; LARREATEGUI M; ROBERTS BD; LEVINE PH; BLATTNER WA; KAPLAN JE. Isolation of human T-cell lymphotropic virus type 2 from Guaymí Indians in Panama. **Proc Natl Acad Sci USA** 87, 8840-8844, 1990.

LAPERCHE, S. et al. Blood safety strategies for human T-cell lymphotropic virus in Europe. **Vox Sang.** 96, 104-110, 2009.

MACHADO, T. M. B. Migração, estrutura populacional, tipos de casamentos e doenças genéticas. **Tese de doutorado**, 2012.

MAJOROVITS, E.; et al. Human T-Lymphotropic Virus-1 Visualized at the Virological Synapse by Electron Tomography. **Plos One** 3, 2008.

MAGALHÃES, T.; et al. 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** 80:2040-2045, 2008.

MAHIEUX, R ; IBRAHIM, F ; MAUCLERE, P ; HERVE, V ; MICHEL, P; TEKAIA, F; CHAPPEY, C; GARIN, B; VAN DER RYST, E; GUILLEMAIN, B; LEDRU, E; DELAPORTE, E; DE THÉ, G; GESSAIN, A. 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. **Journal of Virology** 71, 1317-1333, 1997.
- MANEL, N.; et al. GLUT-1 is the receptor os retrovírus HTLV. **Med Sci** 20 (3), 277-279, 2004.
- MANEL, N.; et al. HTLV-1 tropism and envelope receptor. **Oncogene**, 24 (39) 6016-6025, 2005.
- MATSUOKA, M. & GREEN, P. L. The HBZ gene, a key player in HTLV-1 pathogenesis. **Retrovirology** 6, 71, 2009.
- MATSUOKA, M. & JEANG, K. T. Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. **Nature** 7, 2007.
- MICHAEL, B.; et al. Role of accessory proteins of HTLV-1 in viral replication, T cell activation and cellular gene expression. **Front. Biosci.** 9, 2527-2539, 2004.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, Brasil. Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS Projeto sentinela: gestantes / Sentinel Project- Pregnant Women Brasília; Brasil. **Ministério da Saúde**; 12 p., 1997.
- MIURA, T. M. Y.; et al. Molecular phylogeny of human T-cell leukemia vírus type I and II of Amerindians in Colombia and Chile. **Jornal of molecular Evolution**; 44:S76-S82, 1997.
- MIURA, T. T. F. & IGARASHI, T. Phylogenetic subtypes of human T-lymphotropic vírus types I and their relations to the anthropological background. **Proceedings of the National Academy of sciences of United States of America**; 91:1124-1127, 1994.
- MOCHIZUKI, M.; et al. Uveitis associated with human T lymphotropic virus type I: seroepidemiologic, clinical and virologic studies. **The Journal of Infectious Diseases** 166, 943-4, 1992.
- MOREIRA, E. D.; et al. Seroepidemiology of human T-cell lymphotropic vírus type I/II in Northeastern Brazil. **J of Acquir Immune Defic Syndr** 6:959-963, 1993.
- MORGAN, O. S.; et al. HTLV-1 and polymyositis in Jamaica. **Lancet** 18 (2), 1184-1187, 1989.
- MOTA A. C., et al. The close relationship between South Africa and Latin American HTLVI strains corroborated in a molecular epidemiological study of the HTLV-I isolates from a blood donor cohort. **AIDS Res Hum Retroviruses**23:503–507, 2007.
- MOTA-MIRANDA, A. C. A. Estudo molecular de proteínas estruturais (gp21 e gp46) e regulatórias (HBZ) do HTLV-1 em indivíduos com diferentes perfis clínicos. **Tese de Doutorado**, 2012.
- MOXOTO, I.; et al. Perfil sociodemográfico, epidemiológico e comportamental de mulheres infectadas pelo HTLV-1 em Salvador-Bahia, uma área endêmica para o HTLV. **Rev. da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 40(1):37-41, 2007.
- MUELLER, N. The epidemiology of HTLV-I infection. **Cancer Causes Control**.;2(1):37-52, 1991.
- NASCIMENTO, L. B.; et al. Prevalence of infection due to HTLV-1 in remnant quilombos in Central Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 42(6):657-660, 2009.

NEEL, JV; BIGGAR, RJ; SUKERNIK, RI. Virologic and genetic studies related Amerindian origins to the indigenous people of the Mongolia/ Manchuria/ southeastern Siberia region. **Proc Natl Acad Sci USA** 91, 10737-10741, 1994.

NICHOLAS K. B.; et al. GeneDoc: Analysis and visualization of genetic variation. **EMBNEW.NEWS** 4:14, 1997.

NISHIOKA, K. HTLV-I arthropathy and Sjogren syndrome. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol** 13 Suppl 1, S57-62, 1996.

OSAME, M.; et al. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. **Lancet**; 1: 1031-1032, 1986.

PAGE, R. D. M. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. **Computer Applications in the Biosciences**, 12, 357–358, 1996.

PAIVA, A. & CASSEB, J. Origin and prevalence of human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and type 2 (HTLV-2) among indigenous populations in the americas. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo** 57(1):1-13, 2015.

PESSÔA, R.; et al. Molecular Characterization of Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 Full and Partial Genomes by Illumina Massively Parallel Sequencing Technology. **PLOS ONE**. DOI: 10.1371/journal.pone.0093374, 2014.

PINON, J. D.; et al. Human T-cell leukemia virus type 1 envelope glycoprotein gp46 interacts with cell surface heparan sulfate proteoglycans. **J Virol** 77, 9922-9930, 2003.

POIESZ, B. J.; et al. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. **Proc NATLL Acad Sci USA**.77(12):74157419, 1980.

POIESZ, B. J; et al. Prevalence of HTLV-I-associated T-cell lymphoma. **Am. J. Hematol.** 66, 32–38, 2001.

POSADA, D. & CRANDALL, K. A. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**, 1998;14(9):817-8, 1998.

PROIETTI, FA; CARNEIRO-PROIETTI, ABF; CATALAN-SOARES, B; MURPHY, EL. Global Epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. **Oncogene** 24, 6058-6068, 2005.

PROIETTI, A. B. F. C. et al. **HTLV**. 4 ed. Atualizada e aumentada. Belo Horizonte: Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais, 304 p. v. XIII, 2006.

QIU, X.; et al. Evaluation of a new, fully automated immunoassay for detection of HTLV-I and HTLV-II antibodies. **J. Med. Virol.** 80, 484–493, 2008.

QUISPE, N. C.; et al. Confirming the presence of HTLV-1 infection and the absence of HTLV-2 in blood donors from Arequipa, Peru. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo** 51, 25–29, 2009.

RATHSAM-PINHEIRO, R. H., et al. Ocular lesions in HTLV-1 infected 109 patients from Salvador, State of Bahia: the city with the highest prevalence of this infection in Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop.** Nov-Dec;42(6):633-7, 2009.

REGO, F. F.; et al. HTLV type 1 molecular study in Brazilian villages with African characteristics giving support to the post- Columbian introduction hypothesis. **AIDS Res Hum Retroviruses** 24:673-677, 2008.

- SALEMI, M.; 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**, 1998.
- SAMPEY, G. C.; et al. Complex role of microRNAs in HTLV-1 infections. **Frontiers in genetics**. doi: **10.3389/fgene.2012.00295**, 2012.
- SANTOS, J. I.; et al. Seroprevalence of HIV, HTLV-I/II and other perinatally-transmitted pathogens in Salvador, Bahia. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo** vol.37 no 4, 1995
- SANTOS, F. L. N.; LIMA, F. W. M. Epidemiologia, fisiopatogenia e diagnóstico laboratorial da infecção pelo HTLV-I. **J Bras Patol Med Lab**. v. **41**, n. **2**, p. **105-16**, 2005.
- SEIKI, M.; et al. Human adult T-cell leukemia virus: Complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. **roc. NatL Acad. Sci. USA** Vol. **80**, pp. **3618-3622**, 1983.
- SHIMOTOHNO, K.; et al. The p12I, p13II, and p30II proteins encoded by human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I open reading frames I and II are localized in three different cellular compartments. **J Virol. Apr**;67(4):2360-6, 1993.
- SLATTERY, J. P.; et al. Genomic Evolution, Patterns of Global Dissemination, and Interspecies Transmission of Human and Simian T-cell Leukemia/Lymphotropic Viruses. **Genome Res**. **9**, **525-540**, 1999.
- SWOFFORD, D. L. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (and other methods). Version 4.0 (prerelease test version). **Sinauer, Sunderland, Mass. (in press)**, 1998.
- TAVARES, L H D. **História da Bahia**. Editora UFBA. Ed 11, P 53, 155 e 359, 2008.
- TREVINO, A. et al. Epidemiologia Molecular e características clínicas da T Humano celular linfotrópico Vírus Tipo 1 Infecção em Espanha. **AIDS Res Hum Retroviruses**: **856-862**.doi: **10,1089 / aid.2013.0128**, 2014.
- TSUJIMOTO A.; et al. Nucleotide sequence analysis of a provirus derived from HTLV-1-associated myelopathy (HAM). **Mol Biol Med**, **5(1):29-42**, 1988.
- UCHIYAMA, T.; et al., Adult T-Cell Leukemia: Clinical and Hematologic Features of 16 cases. **Blood**: **50 (3)**, 1977.
- VAN DOOREN, S. *et al.* Evidence for a post-Columbian introduction of human T-cell lymphotropic virus type I in Latin America. **J Gen Virol**, v. **79**, Pt **11**, p. **2695-708**, 1998.
- VAN DOOREN, S. V.; et al. The Low Evolutionary Rate of Human T-Cell Lymphotropic Virus Type-1 Confirmed by Analysis of Vertical Transmission Chains. **Mol. Biol. Evol.** **21(3):603–611**, 2004.
- WATTEL, E.; et al. Clonal expansion of human T-cell leukemia virus type I-infected cells in asymptomatic and symptomatic carriers without malignancy. **J Virol** **69(5)**, **2863-2868**, 1995.
- WOLFE, N. D.; et al. Emergence of unique primate T lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. **The National Academy of Sciences of the USA**, vol. **102**, 2005.

YAMAGUCH, K.; et al. Human T lymphotropic virus type 1 uveitis after Graves' disease. **British Journal of Ophthalmology** 1994; **78**: 163-166, 1994.

YAMASHITA, MR; VERONESI, M; MENNA-BARRETO, WJJ; HARRINGTON, C; SAMPIO, C; BRITES, R; BADARO, AS; ANDRADE-FILHO, S; OKHURA, T; IGARASHI, T; MIURA, D; CHAMONE, O; BIANCHINI, C; JARDIM, S; SONODA; 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-1s of Japan and Africa, as well as those of Japanese immigrants and their relatives in Brazil. **Virology** **261**, 59-69, 1999.

YDY, R. R. A.; et al. Prevalência da infecção pelo vírus linfotrópico humano de células T - HTLV-1/2 entre puérperas de Cuiabá, Estado de Mato Grosso, 2006. **Rev. da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** **42(1):28-32**, 2009.

ZANINOVIC, V. et al. Origins of T-cell leukemia virus. **Nature**, v. **344**, n. **6264**, p. **299**, 1990.

ZIHLMANN, K. F.; et al. Living Invisible: HTLV-1-Infected Persons and the Lack of Care in Public Health. **PLoS Negl Trop Dis**, Volume **6**, Issue **6**, e1705, 2012.

ANEXO I

	* 360	* 380	* 400	* 420	* 440	* 460	
aFNN159	: C	C	C	C	C	C	: 452
aFNN155	: C	C	C	C	C	C	: 452
aMe3Peru	: C	C	C	C	C	C	: 452
SEQ29	: C	C	C	C	C	C	: 445
HTLV24	: C	C	C	C	C	C	: 452
aNar	: C	C	C	C	C	C	: 452
aFNN148	: C	C	C	C	C	C	: 452
aCH26	: C	C	C	C	C	C	: 452
aMT21B	: C	C	C	C	C	C	: 452
a73RM	: C	C	C	C	C	C	: 451
aCMC	: C	C	C	C	C	C	: 456
aESTMD	: C	C	C	C	C	C	: 452
aCam	: C	C	C	C	C	C	: 452
aAfs911	: C	C	C	C	C	C	: 451
HTLV15	: C	C	C	C	C	C	: 453
HTLV18	: C	C	C	C	C	C	: 452
HTLV33	: C	C	C	C	C	C	: 452
HTLV25	: C	C	C	C	C	C	: 452
aTBH3	: C	C	C	C	C	C	: 454
aTBH1	: C	C	C	C	C	C	: 452
aTBH2	: C	C	C	C	C	C	: 452
HTLV30	: C	C	C	C	C	C	: 452
aTSP1	: C	C	C	C	C	C	: 455
aTBH7	: C	C	C	C	C	C	: 452
aCR1	: C	C	C	C	C	C	: 452
aBO1	: C	C	C	C	C	C	: 451
Seq22	: C	C	C	C	C	C	: 451
SEQ30	: C	C	C	C	C	C	: 449
SEQ27	: C	C	C	C	C	C	: 448
Seq25	: C	C	C	C	C	C	: 449
SEQ21	: C	C	C	C	C	C	: 451
SEQ26	: C	C	C	C	C	C	: 451
Seq3	: C	C	C	C	C	C	: 450
FNN153	: C	C	C	C	C	C	: 452
FNN158	: C	C	C	C	C	C	: 455
aCA422	: C	C	C	C	C	C	: 452
aCA423	: C	C	C	C	C	C	: 452
aCA421	: C	C	C	C	C	C	: 452
HTLV06	: C	C	C	C	C	C	: 452
aFNN100	: C	C	C	C	C	C	: 452
aMe2Peru	: C	C	C	C	C	C	: 455
aMe1Peru	: C	C	C	C	C	C	: 452
aB12Peru	: C	C	C	C	C	C	: 452
aFNN156	: C	C	C	C	C	C	: 452
aMASU	: C	C	C	C	C	C	: 452
aFCR	: C	C	C	C	C	C	: 452
aMAQS	: C	C	C	C	C	C	: 452
aIDUSSA	: C	C	C	C	C	C	: 452
aJCP	: C	C	C	C	C	C	: 452
aQu2Peru	: C	C	C	C	C	C	: 452
aQu1Peru	: C	C	C	C	C	C	: 452
aQu3Peru	: C	C	C	C	C	C	: 452
aCA253	: C	C	C	C	C	C	: 452
SEQ5	: C	C	C	C	C	C	: 444
aAINU	: C	C	C	C	C	C	: 452
aTBH4	: C	C	C	C	C	C	: 452
aTBH6	: C	C	C	C	C	C	: 451
HTLV20	: C	C	C	C	C	C	: 452
aAMA	: C	C	C	C	C	C	: 452
HTLV01	: C	C	C	C	C	C	: 452
aB11Peru	: C	C	C	C	C	C	: 452
aTBH5	: C	C	C	C	C	C	: 453
aNi1Peru	: C	C	C	C	C	C	: 453
aB13Peru	: C	C	C	C	C	C	: 453
aHKN	: C	C	C	C	C	C	: 453
aNi3Peru	: C	C	C	C	C	C	: 453
aMT41B	: C	C	C	C	C	C	: 453
aH5	: C	C	C	C	C	C	: 457
aNi2Peru	: C	C	C	C	C	C	: 453
aATK1	: C	C	C	C	C	C	: 453
aATM	: C	C	C	C	C	C	: 453
aPr52	: C	C	C	C	C	C	: 454
aBo	: C	C	C	C	C	C	: 454
aOD	: C	C	C	C	C	C	: 452
aHS35	: C	C	C	C	C	C	: 453
aNN1626	: C	C	C	C	C	C	: 453
aGH78	: C	C	C	C	C	C	: 453
bITIS	: C	C	C	C	C	C	: 452
bMWMG	: C	C	C	C	C	C	: 453
bMOMS	: C	C	C	C	C	C	: 452
bPH236	: C	C	C	C	C	C	: 452
bT49	: C	C	C	C	C	C	: 452
bStDen	: C	C	C	C	C	C	: 452
bGAB7	: C	C	C	C	C	C	: 454
b12503A	: C	C	C	C	C	C	: 453
bH24	: C	C	C	C	C	C	: 453
dpyg19	: C	C	C	C	C	C	: 453
cMe15	: C	C	C	C	C	C	: 451
CCTtgAGCCt CctAGActcagcGGCTCTCAGCCTTGGCTGACCCTGCTGCAACCTCCTTTGTTTCGTTTCTGTTCTGCGCGG TaGagatGAAAGtTCCAC							

```

*          480          *          500          *          520
aFNN159_ : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 506
aFNN155_ : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 506
aMe3Peru_ : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 506
SEQ29    : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 499
HTLV24_  : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 506
aNar_    : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 506
aFNN148_ : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 506
aCH26_   : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 506
aMT2LB_  : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 506
a73RM_   : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 505
aCMC_    : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 511
aESTMD_  : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 506
aCam_    : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 506
aAfe911_ : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 505
HTLV15_  : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 507
HTLV18_  : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 506
HTLV33_  : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 506
HTLV25_  : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 506
aTBH3_   : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 507
aTBH1_   : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 505
aTBH2_   : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 505
HTLV30_  : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 506
aTSB1_   : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 509
aTBH7_   : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 505
aCR1_    : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 505
aBOI_    : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 505
Seq22_   : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 505
SEQ30_   : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 503
SEQ24_   : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 503
Seq25_   : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 502
Seq27_   : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 503
SEQ21_   : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 505
...
SEQ26_   : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 505
SEQ23_   : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 503
Seq3     : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 504
FNN153_  : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 506
FNN158_  : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 509
aCA422_  : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 506
aCA423_  : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 506
aCA421_  : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 506
HTLV06_  : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 506
aFNN100_ : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 506
aMe2Peru_ : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 509
aMe1Peru_ : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 506
aBl2Peru_ : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 505
aFNN156_ : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 506
aMASU_   : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 506
aFCR_    : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 506
aMASG_   : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 506
aIDUSSA_ : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 506
aJCP_    : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 506
aQu2Peru_ : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 506
aQu1Peru_ : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 506
aQu3Peru_ : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 506
aCA253_  : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 506
SEQ5_    : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 496
aAINU_   : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 506
aTBH4_   : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 505
aTBH6_   : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 505
HTLV20_  : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 506
aAMA_    : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 506
HTLV01_  : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 506
aBl1Peru_ : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 506
aTBH5_   : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 506
aNiiPeru_ : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 507
aBl3Peru_ : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 507
aHKN_    : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 507
aNi3Peru_ : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 507
aMT4LB_  : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 507
aH5_     : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 511
aNi2Peru_ : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 507
aATK1_   : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 507
aATM_    : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 507
aPr52_   : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 508
aBo_     : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 508
aOD_     : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 506
aHS35_   : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 507
aNm1626_ : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 507
aGH78_   : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 507
bITiS_   : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 506
bMMMG_   : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 507
bMOMS_   : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 506
bPH236_  : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 506
bT49_    : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 506
bStDen_  : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 505
bCAB7_   : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 507
b12503A_ : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 507
bH24_    : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 508
dpyg19_  : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 506
cMe15_   : CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG : 505
CC-TTCCCTTTCATTACGACTCACTGCGGGC-TTGGCCACGGCOAAGTACCGG

```

ANEXO II

ALINHAMENTO PARA ANÁLISE COM SEQUÊNCIAS PERTENCENTES AO SUTIPO a (COSMOPOLITA)

Table with columns for sample names (e.g., Me3. Peru, Nar. Guiana) and nucleotide sequences. The sequences are aligned in blocks of 20, 40, 60, 80, and 100. Some positions are marked with asterisks (*). The table ends with sequence position numbers (e.g., : 108, : 109).


```

Pr52.Marro : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 485
Bo.Argélia : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 485
OD.Mauritâ : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 483
H835.Carib : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 484
GH78.Gana : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 484
NM1626.Gui : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 484
B11.Peru : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 483
Me1.Peru : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 483
Qu2.Peru : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 483
Qu3.Peru : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 483
B12.Peru : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 483
Qu1.Peru : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 483
Me2.Peru : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 486
BR1.RGS : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 486
BRBa1.SSA : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 480
BRBa2.Sul : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 484
BR2.RGS : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 483
BR3.PR : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 483
BR4.RJ : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 483
BRBa3.Sul : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 483
BR5.RGS : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 483
BRBa4.SSA : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 483
BR6.SP : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 483
BRBa5.Sul : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 483
BRBa6.SSA : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 483
BRBa7.SSA : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 485
BRBa8.Sul : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 483
BRBa9.Sul : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 483
BRBa10.Sul : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 483
BRBa11.Sul : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 480
BRBa12.Cen : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 479
BRBa13.Cen : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 482
BRBa14.Nor : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 480
BRBa15.Sul : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 480
BRBa16.Cen : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 482
BRBa17.Sul : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 482
BRBa18.Nor : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 480
BR7.RJ : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 483
BR8.RJ : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 483
BRBa19.SSA : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 483
BR9.SP : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 483
BRBa20.SSA : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 483
BR10.SP : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 483
BRBa21.SSA : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 484
BRBa22.SSA : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 483
BR11.PR : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 483
BRBa23.SSA : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 484
BRBa24.SSA : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 481
BRBa25.SSA : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 483
BR12.MT : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 483
BRBa26.SSA : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 483
BRBa27.SSA : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 483
BRBa28.Sul : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 483
BRBa29.SSA : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 484
BRBa30.SSA : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 485
BRBa31.Sul : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 484
BRBa32.SSA : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 484
BRBa33.SSA : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 483
BRBa34.SSA : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 483
BRBa35.SSA : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 483
BRBa36.Sul : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 483
BRBa37.SSA : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 483
BR13.RJ : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 483
BRBa38.SSA : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 483
BRBa39.SSA : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 483
BRBa40.SSA : AGTTCCACCCCTTTCCCTTTCATTTCACGACTACTGCGGG : 484

```

```

BRBa41.SSA : AGTTCCACCCC-TTCCCTTTCATTCACGACTCACTGCCGG : 484
BRBa42.SSA : AGTTCCACCCC-TTCCCTTTCATTCACGACTCACTGCCGG : 483
BRBa43.Sul : AGTTCCACCCC-TTCCCTTTCATTCACGACTCACTGCCGG : 483
BR14.SP : AGTTCCACCCC-TTCCCTTTCATTCACGACTCACTGCCGG : 483
BRBa44.Sul : AGTTCCACCCC-TTCCCTTTCATTCACGACTCACTGCCGG : 483
BR15.SP : AGTTCCACCCC-TTCCCTTTCATTCACGACTCACTGCCGG : 483
BRBa45.SSA : AGTTCCACCCC-TTCCCTTTCATTCACGACTCACTGCCGG : 483
BRBa46.SSA : AGTTCCACCCC-TTCCCTTTCATTCACGACTCACTGCCGG : 486
BRBa47.SSA : AGTTCCACCCC-TTCCCTTTCATTCACGACTCACTGCCGG : 483
BRBa48.SSA : AGTTCCACCCC-TTCCCTTTCATTCACGACTCACTGCCGG : 483
BRBa49.SSA : AGTTCCACCCC-TTCCCTTTCATTCACGACTCACTGCCGG : 484
BR16.PR : AGTTCCACCCC-TTCCCTTTCATTCACGACTCACTGCCGG : 483
BRBa50.Sul : AGTTCCACCCC-TTCCCTTTCATTCACGACTCACTGCCGG : 483
BRBa51.VSF : AGTTCCACCCC-TTCCCTTTCATTCACGACTCACTGCCGG : 483
BR17.RJ : AGTTCCACCCC-TTCCCTTTCATTCACGACTCACTGCCGG : 483
BRBa52.Sul : AGTTCCACCCC-TTCCCTTTCATTCACGACTCACTGCCGG : 483
BRBa53.SSA : AGTTCCACCCC-TTCCCTTTCATTCACGACTCACTGCCGG : 483
BRBa54.Sul : AGTTCCACCCC-TTCCCTTTCATTCACGACTCACTGCCGG : 483
BR18.SP : AGTTCCACCCC-TTCCCTTTCATTCACGACTCACTGCCGG : 483
BR19.RJ : AGTTCCACCCC-TTCCCTTTCATTCACGACTCACTGCCGG : 483
BRBa55.SSA : AGTTCCACCCC-TTCCCTTTCATTCACGACTCACTGCCGG : 483
BRBa56.Sul : AGTTCCACCCC-TTCCCTTTCATTCACGACTCACTGCCGG : 483
BR20.CE : AGTTCCACCCC-TTCCCTTTCATTCACGACTCACTGCCGG : 483
BR21.CE : AGTTCCACCCC-TTCCCTTTCATTCACGACTCACTGCCGG : 483
BR22.CE : AGTTCCACCCC-TTCCCTTTCATTCACGACTCACTGCCGG : 483
BR23.CE : AGTTCCACCCC-TTCCCTTTCATTCACGACTCACTGCCGG : 483
BRBa57.SSA : AGTTCCACCCC-TTCCCTTTCATTCACGACTCACTGCCGG : 484
BRBa58.Sul : AGTTCCACCCC-TTCCCTTTCATTCACGACTCACTGCCGG : 483
BRBa59.SSA : AGTTCCACCCC-TTCCCTTTCATTCACGACTCACTGCCGG : 483
BRBa60.SSA : AGTTCCACCCC-TTCCCTTTCATTCACGACTCACTGCCGG : 473
BR24.MT : AGTTCCACCCC-TTCCCTTTCATTCACGACTCACTGCCGG : 483
BR25.MT : AGTTCCACCCC-TTCCCTTTCATTCACGACTCACTGCCGG : 483
BRBa61.Sul : AGTTCCACCCC-TTCCCTTTCATTCACGACTCACTGCCGG : 476
BRBa61.Sul : AGTTCCACCCC-TTCCCTTTCATTCACGACTCACTGCCGG : 476
BRBa62.Sul : AGTTCCACCCC-TTCCCTTTCATTCACGACTCACTGCCGG : 485
BR26.PR : AGTTCCACCCC-TTCCCTTTCATTCACGACTCACTGCCGG : 483
BRBa63.VSF : AGTTCCACCCC-TTCCCTTTCATTCACGACTCACTGCCGG : 483
BRBa64.VSF : AGTTCCACCCC-TTCCCTTTCATTCACGACTCACTGCCGG : 483
BRBa65.VSF : AGTTCCACCCC-TTCCCTTTCATTCACGACTCACTGCCGG : 483
BRBa66.SSA : AGTTCCACCCC-TTCCCTTTCATTCACGACTCACTGCCGG : 485
BR27.PR : AGTTCCACCCC-TTCCCTTTCATTCACGACTCACTGCCGG : 483
BRBa67.Sul : AGTTCCACCCC-TTCCCTTTCATTCACGACTCACTGCCGG : 483
BR28.PR : AGTTCCACCCC-TTCCCTTTCATTCACGACTCACTGCCGG : 483
BRBa68.SSA : AGTTCCACCCC-TTCCCTTTCATTCACGACTCACTGCCGG : 483
BRBa69.SSA : AGTTCCACCCC-TTCCCTTTCATTCACGACTCACTGCCGG : 483
BRBa70.SSA : AGTTCCACCCC-TTCCCTTTCATTCACGACTCACTGCCGG : 483
BRBa71.Sul : AGTTCCACCCC-TTCCCTTTCATTCACGACTCACTGCCGG : 483
BRBa72.SSA : AGTTCCACCCC-TTCCCTTTCATTCACGACTCACTGCCGG : 483
BRBa73.SSA : AGTTCCACCCC-TTCCCTTTCATTCACGACTCACTGCCGG : 483
BRBa74.Sul : AGTTCCACCCC-TTCCCTTTCATTCACGACTCACTGCCGG : 483
BRBa75.SSA : AGTTCCACCCC-TTCCCTTTCATTCACGACTCACTGCCGG : 483
BRBa76.Sul : AGTTCCACCCC-TTCCCTTTCATTCACGACTCACTGCCGG : 483
BR29.RJ : AGTTCCACCCC-TTCCCTTTCATTCACGACTCACTGCCGG : 483
BRBa77.SSA : AGTTCCACCCC-TTCCCTTTCATTCACGACTCACTGCCGG : 483
BRBa78.VSF : AGTTCCACCCC-TTCCCTTTCATTCACGACTCACTGCCGG : 484
BR30.CE : AGTTCCACCCC-TTCCCTTTCATTCACGACTCACTGCCGG : 483
Mel5c : AGTTCCACCCC-TTCCCTTTCATTCACGACTCACTGCCGG : 482
Agttccacccc tTCCCTTTCatTCACGACTCACTGCCGG

```

ANEXO III

APÊNDICE I



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Origem, disseminação e caracterização genotípica do vírus linfotrópico de células T do tipo 1 (HTLV-1) na Bahia

Pesquisador: Bernardo Galvão Castro Filho

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 45360815.3.0000.5544

Instituição Proponente: Fundação Bahiana para Desenvolvimento das Ciências

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.392.835

Apresentação do Projeto:

A infecção do HTLV-1 (vírus T-linfotrópico humano tipo 1) tem distribuição mundial, atingindo cerca de 15 a 20 milhões de pessoas em todo o mundo. O Brasil é considerado uma área endêmica para esta infecção, sendo Salvador/Bahia a região com maior prevalência. O HTLV-1 é o agente etiológico da paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV (TSP/HAM), da Leucemia/Linfoma de Células T do Adulto (ATLL), além de outras doenças inflamatórias, como a dermatite infecciosa associada ao HTLV-1. A transmissão e dispersão deste vírus estão relacionadas com as migrações e características étnico-geográficas. Ressalta-se que a população brasileira é resultado da miscigenação entre Ameríndios, Europeus e Africanos além da influência de outros povos na sua formação. O trabalho proposto objetiva estudar a

Endereço: AVENIDA DOM JOÃO VI, 275

Bairro: BROTAS

UF: BA

Município: SALVADOR

CEP: 40.290-000

Telefone: (71)3276-8225

E-mail: cep@bahiana.edu.br



Continuação do Parecer: 1.392.835

origem e disseminação do HTLV-1 na Bahia, assim como identificar as variantes do HTLV-1 circulantes nas cidades do interior da Bahia, analisar filogeneticamente a região LTR dos isolados de HTLV-1 provenientes da Bahia para inferência em sua origem e por fim, analisar a descendência genômica dos pacientes infectados pelo HTLV-1 por estudo de marcadores genéticos. Para isso, serão utilizadas 50 pacientes, cujas amostras de células já estão estocadas no CHTLV, e que nasceram e residem no interior da Bahia. Todas as amostras serão submetidas às análises moleculares, seja em relação ao vírus que o indivíduo porta e relativo à sua ancestralidade. Espera-se a partir deste estudo, favorecer a identificação de grupos mais vulneráveis à infecção pelo HTLV-1 e consequentemente na elaboração de políticas públicas de saúde e controle da doença do estado da Bahia.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

1. Estudar a origem e disseminação do HTLV-1 na Bahia.

Objetivo Secundário:

1. Identificar os subtipos virais circulantes nas cidades do interior da Bahia.
2. Relacionar os genótipos virais com o perfil de entrada primária e disseminação do vírus na Bahia.
3. Correlacionar os dados de ancestralidade dos pacientes com os subtipos virais e origem da infecção.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O Pesquisador responsável declara que o projeto não envolve riscos, aos participantes, já que não haverá nenhum tipo de intervenção. Não há risco de perda de sigilo dos dados na condução das etapas de estudo, afinal as identidades das amostras não serão reveladas em nenhum momento do estudo. As

Endereço: AVENIDA DOM JOÃO VI, 275

Bairro: BROTAS

UF: BA

Município: SALVADOR

CEP: 40.290-000

Telefone: (71)3276-8225

E-mail: cep@bahiana.edu.br



Continuação do Parecer: 1.392.835

informações

obtidas das análises são informações moleculares que não acarretam nenhum tipo de constrangimento e significado

clínico.

Benefícios:

O benefício deste estudo é esperado em médio e longo prazo pois as informações moleculares advindas deste trabalho servirão para conhecer melhor as características e a origem das cepas virais circulantes no estado da Bahia. Este tipo de informação será utilizada para melhor desenhar as políticas de controle epidemiológico da infecção. Além disso, o perfil filogeográfico da infecção pelo HTLV-1 pode indicar novas rotas de disseminação do vírus, bem como microrregiões que devam ser melhor monitoradas e investigadas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Este projeto vai ser desenvolvido a partir da utilização do DNA provenientes de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) que foram separadas a partir de sangue total de cinquenta indivíduos anônimos não vinculados, provenientes do CHTLV. Estas amostras de sangue já foram coletadas e estão estocadas no CHTLV. Caso a pesquisa seja descontinuada, o Comitê de Ética será informado. Trata-se de um estudo de corte transversal, no qual as amostras de sangue total serão selecionadas aleatoriamente a partir das informações armazenadas no banco de dados de pacientes do CHTLV, de modo a agrupar os indivíduos a partir da origem geográfica dentro do estado da Bahia.

A amostra para o estudo de corte transversal será composta por 50 amostras biológicas de indivíduos, de ambos os sexos, infectados pelo HTLV-1 com WB positivo e que nasceram e residem no interior do

Endereço: AVENIDA DOM JOÃO VI, 275

Bairro: BROTAS

UF: BA

Município: SALVADOR

CEP: 40.290-000

Telefone: (71)3276-8225

E-mail: cep@bahiana.edu.br



Continuação do Parecer: 1.392.835

estado
da Bahia.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos obrigatórios foram anexados com os ajustes necessários referentes ao Cronograma. Referente ao TCLE para a população acessível, foi justificado pelos pesquisadores a dispensa desse termo "É importante ressaltar que este projeto vai ser desenvolvido a partir da utilização do DNA provenientes de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) que foram separadas a partir de sangue total de indivíduos anônimos não-vinculados, provenientes do CHTLV. As amostras serão selecionadas aleatoriamente, considerando a formação dos grupos com diferentes sub-regiões do estado da Bahia: Sul, Região Metropolitana de Salvador, Centro-Oeste, Vale do São Francisco e Norte.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após análise bioética em consonância com a Resolução 466/12 o protocolo de pesquisa foi considerado aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Atenção : o não cumprimento à Res. 466/12 do CNS abaixo transcrita implicará na impossibilidade de avaliação de novos projetos deste pesquisador.

XI DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL

XI.1 - A responsabilidade do pesquisador é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais.

XI.2 - Cabe ao pesquisador: a) e b) (...)

c) desenvolver o projeto conforme delineado;

d) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final;

e) apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento;

f) manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa;

g) encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto; e

h) justificar fundamentadamente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção do projeto ou

Endereço: AVENIDA DOM JOÃO VI, 275

Bairro: BROTAS

UF: BA

Município: SALVADOR

CEP: 40.290-000

Telefone: (71)3276-8225

E-mail: cep@bahiana.edu.br



ESCOLA BAHIANA DE
MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA /
FUNDAÇÃO BAHIANA



Continuação do Parecer: 1.392.835

a não publicação dos resultados

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Cronograma	Cronograma.docx	15/12/2015 09:31:48	Janieide de Souza Luz	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_408468.pdf	11/12/2015 21:22:42		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Modificado.docx	11/12/2015 21:20:39	Bernardo Galvão Castro Filho	Aceito
Outros	Resposta_ao_CEP.docx	11/12/2015 21:17:49	Bernardo Galvão Castro Filho	Aceito
Outros	Justificativa TCLE.pdf	16/07/2015 17:36:22		Aceito
Outros	Carta de resposta do parecer .doc	16/07/2015 17:33:49		Aceito
Outros	Termo de Compromisso do Pesquisador responsável.pdf	16/07/2015 12:21:33		Aceito
Folha de Rosto	20150522133223181_0001.pdf	22/05/2015 10:35:41		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto Origem e Disseminação (CEP).docx	04/05/2015 15:59:43		Aceito
Outros	20150504184307884_0008.pdf	04/05/2015 15:50:28		Aceito
Outros	20150504184307884_0007.pdf	04/05/2015 15:50:18		Aceito
Outros	20150504184307884_0006.pdf	04/05/2015 15:49:50		Aceito
Outros	20150504184307884_0005.pdf	04/05/2015 15:49:41		Aceito
Outros	20150504184307884_0004.pdf	04/05/2015 15:49:31		Aceito
Outros	20150504184307884_0003.pdf	04/05/2015 15:49:19		Aceito
Outros	20150504184307884_0002.pdf	04/05/2015 15:49:07		Aceito
Outros	20150504184307884_0001.pdf	04/05/2015 15:48:54		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: AVENIDA DOM JOÃO VI, 275

Bairro: BROTAS

CEP: 40.290-000

UF: BA

Município: SALVADOR

Telefone: (71)3276-8225

E-mail: cep@bahiana.edu.br



ESCOLA BAHIANA DE
MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA /
FUNDAÇÃO BAHIANA



Continuação do Parecer: 1.392.835

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SALVADOR, 21 de Janeiro de 2016

Assinado por:
CRISTIANE MARIA CARVALHO COSTA DIAS
(Coordenador)

Endereço: AVENIDA DOM JOÃO VI, 275

Bairro: BROTAS

UF: BA

Município: SALVADOR

CEP: 40.290-000

Telefone: (71)3276-8225

E-mail: cep@bahiana.edu.br