



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
SAÚDE



**Caracterização molecular do HTLV-1: impacto no
desenvolvimento de doenças associadas**

Marina Silveira Cucco

Dissertação de Mestrado

Salvador (Bahia), 2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
DA SAÚDE



**Caracterização molecular do HTLV-1: impacto no
desenvolvimento de doenças associadas**

Marina Silveira Cucco

Orientadora: Dra. Luciane Amorim Santos

Co-orientador: Dr. Ricardo Khouri

Dissertação apresentada ao Colegiado do
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS DA SAÚDE, da Faculdade de
Medicina da Universidade Federal da Bahia,
como pré-requisito obrigatório para obtenção do
grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Salvador (Bahia), 2023

Ficha catalográfica
Bibliotheca Gonçalo Moniz
Sistema Universitário de Bibliotecas
Universidade Federal da Bahia

C963 Cucco, Marina Silveira.
Caracterização molecular do HTLV-1: impacto no desenvolvimento de doenças associadas / Marina Silveira Cucco. – 2023.
94 f.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Luciane Amorim Santos.
Co-Orientador: Dr. Ricardo Khouri.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina da Bahia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2023.

Inclui anexos.

1. Sequenciamento de nucleotídeo 2. Genômica. 3. HTLV-1. I. Santos, Luciane Amorim. II. Khouri, Ricardo. III. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Medicina da Bahia. IV. Título.

CDU (2007): 601.4:577.212.3

Elaboração (Resolução CFB nº 184/2017):
Solange Mattos CRB-5/ 758

COMISSÃO EXAMINADORA

Membros Titulares:

- Prof^a Dr^a Giselle Calasans de Souza Costa. Doutora em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa (Instituto Gonçalo Moniz).
- Prof^a Dr^a Sandra Rocha Gadelha Mello. Doutora em Patologia (Universidade Federal da Bahia/ Instituto Gonçalo Moniz).
- Prof^a Dr^a Luciane Amorim Santos. Doutora em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa (Instituto Gonçalo Moniz).

Membro Suplente:

- Prof^a Dr^a Luana Leandro Gois. Doutora em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa (Instituto Gonçalo Moniz).

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Simone e Giovanni, e minha irmã, Rafa, agradeço por terem acreditado (muito mais do que eu acreditei) e me incentivado desde sempre e durante toda a caminhada. Sem vocês eu não teria entrado nesse desafio que é a pesquisa.

À minha família lá no Sul, vocês fazem parte de quem sou e são incentivadores mais que especiais, sempre perguntando sobre o trabalho, mesmo sem entender quase nada.

Aos meus amigos da “aldeia” e do Oficina, obrigada por sempre me colocarem para cima, às vezes até demais. Saber que vocês estão por perto, prontos para me acolher, faz toda a diferença.

Aos amigos que Deus colocou na minha vida no ano que passou, obrigada por toda oração e pelos ouvidos que tanto me ouviram nesse período.

Agradeço especialmente à minha orientadora, Luciane (a.k.a Tika), por ter sido essa professora excepcional, sempre disponível e compreensiva, que me ensinou tanto da vida e da pesquisa, desde a graduação.

Ao meu coorientador, Ricardo Khouri e aos meus colegas do LEITV agradeço o suporte nesses dois anos, sem vocês teria sido bem mais difícil. Em especial, agradeço à Thaline, Beatriz e Laise, sem vocês eu não sei como teria terminado essa etapa, literalmente.

E, por último e mais importante, agradeço à Deus por ter me sustentado, me fortalecido e me permitido conhecer e aprender tantas coisas nessa caminhada. O maior fruto desse mestrado, com certeza, foi ter te encontrado em mim. Desde então esse trabalho é para a Tua glória. Obrigada por me resgatar e abrir os meus olhos.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE TABELAS	8
ÍNDICE DE SIGLAS OU ABREVIATURAS.....	9
RESUMO	10
II. OBJETIVOS	11
III. INTRODUÇÃO.....	12
IV. REVISÃO DA LITERATURA.....	14
IV.1. Vírus Linfotrópico da Célula T Adulta do tipo 1 (HTLV-1).....	14
IV.1.1. Origem do HTLV-1	14
IV.1.2. Distribuição mundial do HTLV-1	14
IV.1.2.1. Epidemiologia molecular	16
IV.1.3. Estrutura morfológica e genômica do HTLV-1	17
IV.1.4. Ciclo viral e mecanismos de disseminação do HTLV-1	21
IV.1.5. Formas de transmissão e prevenção do HTLV-1	24
IV.1.6. Doenças associadas ao HTLV-1	24
IV.1.6.1. Mielopatia Associada ao HTLV-1/Paraparesia Tropical Espástica.....	24
IV.1.6.2. Leucemia/Linfoma de Células Adultas.....	26
IV.1.6.3. Outras manifestações clínicas	27
IV.1.6.4. Tratamento	27
IV.2. Sequenciamento aplicado a estudos de genoma viral.....	28
V. METODOLOGIA.....	30
V.1. Desenho Experimental.....	30
V.1.1. População de Estudo.....	30
V.1.2. Coleta e Processamento	30
V.1.3. Reação em Cadeia da Polimerase e Sequenciamento.....	30
V.1.4. Seleção de sequências de Banco de Dados.....	31
V.1.5. Genotipagem do HTLV-1.....	31

V.1.6. Análise genética de <i>hbz</i> e LTR	32
V.1.7. Análise estatística	32
V.2. Revisão Sistemática	32
VI. RESULTADOS	33
VI.1. Seção 1:.....	34
VI.1.1. Subseção 1: <i>Molecular characterization of HTLV-1 genomic region hbz from patients with different clinical conditions</i>	34
VI.1.2. Subseção 2: Genotipagem e identificação de mutações em LTR de amostras do Centro de Atendimento ao Indivíduo com HTLV-1 (CHTLV).....	40
VI.2. Seção 2: <i>Mapping variants in HTLV-1 genome to analyze their impacts on the HAM/TSP development: a systematic review</i>	43
VI.3. Seção 3: <i>An overview of sequencing technology platforms applied to HTLV-1 studies: a systematic review</i>	60
VII. DISCUSSÃO	72
VIII. PERSPECTIVA DE ESTUDO.....	75
IX. CONCLUSÃO	76
X. SUMMARY.....	77
REFERÊNCIAS	78
ANEXO 1	90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I Distribuição geográfica mundial do HTLV-1.....	15
Figura II: Mapa de prevalência do HTLV-1/2 no Brasil.....	16
Figura III: Distribuição do subtipos e subgrupos do HTLV-1	17
Figura IV: Estrutura genômica do HTLV-1.	18
Figura V: Estrutura morfológica do HTLV-1.....	18
Figura VI: Representação do processo de infecção das células pelo HTLV-1	22
Figura VII: Vias de disseminação do HTV-1	23
Figura 1: Árvore de Máxima Verossimilhança enraizada do HTLV-1.	41

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I: Complexo neurológico associada ao HTLV-1.

Tabela 1: Frequência das modificações dos sítios de ligação dos fatores de transcrição, causadas pelas mutações em seis sequências de LTR do CHTLV.

ÍNDICE DE SIGLAS OU ABREVIATURAS

AC	Assintomático
AD	<i>Activation domain</i> – Domínio de ativação
ATLL	<i>Adult T-cell leukemia/lymphoma</i> – Leucemia/Linfoma de Células T Adulta
CBP/p300	<i>CREB binding protein/protein p300</i> – Complexo de ligação CREB/p300
CD	<i>Central domain</i> – Domínio central
CHTLV	Centro de atendimento ao portador de HTLV
CREB	<i>cAMP-response element binding protein</i> – Proteína de ligação do elemento de resposta cAMP
DeCs	Descritivos em Ciências da Saúde
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> – Ácido Desoxirribonucleico
dNTPs	Dideoxynucleotídeos
EBMSP	Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
Foxp3	<i>Forkhead box P3</i> – Fator de transcrição nuclear p3
GLUT-1	<i>Glucose transporter type 1</i> – Transportador de glicose tipo 1
HAM/TSP	<i>HTLV-1 associated myelopathy/tropical paraparesis spastic</i> – Mielopatia associada ao HTLV-1/Paraparesia tropical espástica
hbz	<i>HTLV-1 bzip domain</i> – Domínio bzip do HTLV-1
HSPG	<i>Heparan sulfate proteoglycans</i> – Proteoglicano de heparán sulfato
HTLV-1	<i>Human T-cell Lymphotropic Virus 1</i> – Vírus Linfotrópico de Células T
ICAM	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i> – Molécula de adesão intercelular 1
IDH	<i>Infective dermatitis HTLV-1 associated</i> – Dermatite associada ao HTLV-1
IFN- γ	Interferon gama
IGM	Instituto Gonçalo Moniz
IL-1 β	Interleucina 1 beta
LCP	Leucemia de células pilosas
LTR	<i>Long terminal repeats</i> – Repetições terminais longas
MeSH	Medical Subject Headings – Títulos de assuntos médicos
MTOC	<i>Microtubule organizing centre</i> – Centro de organização de microtúbulos
NGS	<i>Next generation sequencing</i> – Sequenciamento de nova geração
NRP-1	<i>Neupilin 1</i> – Neurofilina-1
OMS	Organização mundial de saúde
ORF	<i>Open Reading frame</i> – Quadro de leitura aberto
pb	Pares de base
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> – Células mononucleares de sangue periférico
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> – Reação em cadeia da polimerase
PROSPERO	<i>International Prospective Register of Systematic Reviews</i> – Registro Prospectivo Internacional de Revisões Sistemáticas
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> – Ácido Ribonucleico
SMRT	<i>Single-molecule real time</i> - Sequenciamento em tempo real de molécula única
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TFBS	<i>Transcriptional factor binding site</i> – Sítio de ligação de fatores de transcrição
TNF- α	<i>Tumoral necrosis factor alfa</i> – Fator de necrose tumoral alfa

RESUMO

Introdução: O HTLV-1 é um patógeno distribuído globalmente, afetando cerca de 5 a 10 milhões de pessoas. Estima-se que no Brasil existem 800 mil pessoas vivendo com o vírus, o que o caracteriza como um dos países com maior número absoluto de casos. No Brasil, as regiões Norte e Nordeste são as mais afetadas pelo vírus. A infecção pelo HTLV-1 pode levar ao desenvolvimento de doenças como ATLL, HAM/TSP e IDH. O genoma do HTLV-1 possui genes estruturais e uma região responsável pela codificação de proteínas acessórias e regulatórias, importantes para o estabelecimento, disseminação e ação do vírus. O sequenciamento pode elucidar fatores desse vírus que influenciam a propagação e o desenvolvimento de manifestações clínicas associadas ao HTLV-1. **Objetivo:** O objetivo principal deste trabalho é avaliar o papel das mutações no genoma do HTLV-1 e sua possível associação com o desenvolvimento das doenças associadas ao vírus. **Material e Métodos:** Estudo de corte transversal, com amostras de indivíduos infectados pelo HTLV-1, que foram sequenciadas para identificação de mutações nas regiões LTR e *hbz* do genoma do vírus. Além disso, duas revisões sistemáticas foram realizadas seguindo as instruções do PRISMA para aprofundamento e revisão das áreas de estudo. **Resultados:** Foram observadas duas mutações, V15M e R119Q, na região de *hbz*, sendo a V15M observada exclusivamente em pacientes HAM/TSP, enquanto R119Q aparenta ser um fator de proteção para o desenvolvimento de doença. Em LTR foram encontradas mutações que levaram ao surgimento ou deleção de sítios de ligação de fatores de transcrição. Além disso, foram encontrados pela revisão sistemática quatro trabalhos que relacionaram mutações em *env* e ORF-1 com o desenvolvimento de alguma forma clínica. Em relação ao estudo de sequenciamento, a metodologia Sanger é mais utilizada para o estudo do HTLV-1. **Conclusões:** Foi possível observar a presença de mutações relacionadas ao desenvolvimento de HAM/TSP, como C39Y, P45L, S69G, P86S e R88K (ORF-I), S72G e N93D (gp46) e V15M e R119Q (HBZ). Também foram observadas alterações nos sítios de ligação de fatores de transcrição, que podem estar relacionadas a um desequilíbrio de produção e expressão de genes virais. Além disso, foi possível observar que apesar dos avanços nas tecnologias de sequenciamento, os estudos de HTLV-1 ainda trabalham com a primeira geração de sequenciamento, o Sanger.

Palavras-chave: HTLV-1; sequenciamento; mutações, caracterização molecular

II. OBJETIVOS

PRINCIPAL

- Avaliar o papel das mutações no genoma do HTLV-1 no desenvolvimento das doenças associadas ao vírus.

SECUNDÁRIOS

1. Avaliar as variações genéticas do gene *hbz* do HTLV-1, e sua associação com diferentes doenças associadas ao HTLV-1.
2. Caracterizar os aspectos moleculares da região LTR do HTLV-1.
3. Revisar sistematicamente a literatura sobre as mutações do genoma do HTLV-1 associadas ao desenvolvimento de HAM/TSP;
4. Identificar as técnicas de sequenciamento utilizadas para gerar sequências de HTLV-1 e como estas influenciam nos estudos do genoma viral através de uma revisão sistemática da literatura.

III. INTRODUÇÃO

O Vírus Linfotrófico da Célula T Humana do tipo 1 (*Human T-cell lymphotropic virus type 1* - HTLV-1) é um patógeno distribuído globalmente que afeta cerca de 5 a 10 milhões de pessoas. Estima-se que no Brasil existem 800 mil pessoas vivendo com o vírus, o que o caracteriza como um dos países com maior número absoluto de casos (GESSAIN; CASSAR, 2012). No Brasil, as regiões Norte e Nordeste são as mais afetadas pelo HTLV-1 (GESSAIN; CASSAR, 2012), com ênfase nas cidades de Salvador, com prevalência de 1,7% (DOURADO et al., 2003). Além de Salvador, as cidades de Barreiras e Ilhéus também chamam atenção quanto a presença de HTLV-1/2 (PEREIRA et al., 2019). Os indivíduos infectados podem permanecer assintomáticos ou podem desenvolver diferentes sintomatologias, sendo as principais a Dermatite Infecciosa associada ao HTLV-1 (*Infective Dermatitis associated with HTLV-1* - IDH), Mielopatia associada ao HTLV-1/Paraparesia Espástica Tropical (*HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis* – HAM/TSP), presente em 0,25-3,8% dos pacientes, e a Leucemia/Linfoma de Células T Adultas (*Adult T-cell Leukemia/Lymphoma*), presente em 2-5% dos pacientes (YAMANO; SATO, 2012).

O genoma do HTLV-1 é composto por genes estruturais, como *gag*, *pol*, *env* e por uma região não estrutural, conhecida por pX, tudo isso flanqueado por duas regiões chamadas de regiões de repetição terminal longa (*Long Terminal Repeats* - LTR). Na região pX, próxima à LTR 3', estão localizados genes responsáveis por codificar proteínas acessórias e regulatórias, como p12, p8, p30, Tax, Rex e HBZ (GIAM; SEMMES, 2016).

Um dos pontos mais importantes relacionado às regiões LTR, região onde se localizam os sítios de ligação de fatores de transcrição, sendo assim, indiretamente ligado à replicação e à transcrição, é sua relação com o aumento da carga proviral e possível desenvolvimento de HAM/TSP, devido a presença de mutações que podem levar a criação ou deleção de sítios de transcrição (NETO et al., 2011; REGO et al., 2016).

A carga proviral corresponde a quantidade de células mononucleares de sangue periférico (*peripheral blood mononuclear cells* - PBMC) que estão infectadas pelo HTLV-1 (PINEDA et al., 2019). Alguns estudos sugerem que a carga proviral pode ser um marcador para a progressão das doenças nos pacientes, sendo os valores elevados de carga proviral associados ao desenvolvimento de HAM/TSP e ATLL, entretanto, existem dados controversos quanto à essa associação (DEMONTIS; HILBURN; TAYLOR, 2013; MANNIS et al., 1999; OKAYAMA et al., 2004).

Dentre as proteínas codificadas pela região pX, está o HTLV-1 *bzip factor* (HBZ), descrito em 2002 e codificado pelo gene *hbz*, que é transcrito na direção antisenso, estimulado

por um promotor presente na região LTR 3'(GAUDRAY et al., 2002). Pelo que se sabe a proteína HBZ tem função regulatória, podendo induzir proliferação de células infectadas e inibindo a apoptose (MITOBE et al., 2015), cooperando na imortalização celular (ROCHA; BARRETO, 2018). Esta proteína é expressa constantemente em células infectadas por HTLV-1 e, portanto, pode ser usada como novo alvo para abordagem terapêutica. Em indivíduos com HAM/TSP, a localização de HBZ parece ser exclusivamente no citoplasma, enquanto em indivíduos com ATLL a proteína aparece tanto no citoplasma quanto no núcleo (BARATELLA et al., 2017; HIVIN et al., 2005). É possível que variações na sequência de HBZ interfiram na sua localização.

Para conhecer melhor o genoma, identificar, localizar e avaliar alterações que possivelmente estejam ligadas à alteração de função e localização de proteínas, é necessário a geração de sequências do vírus. De acordo com os números de sequências de HTLV-1 disponíveis é possível observar uma defasagem de deposição de novos genomas nos bancos de sequências, em específico genomas completos, com informações completas que possibilitem novas análises (BORBA, 2020). Ainda que existam sequências publicadas, é difícil estudar a relação de mutações no genoma viral com as manifestações clínicas, visto que muitas dessas sequências são submetidas sem informações importantes, como dados clínicos e dados sociodemográficos.

O seguinte estudo visa descrever e avaliar mutações no genoma do HTLV-1 e a sua possível associação com as diferentes manifestações clínicas resultantes da infecção, além de discutir a importância das técnicas de sequenciamento e destacar as nuances de cada uma no contexto do estudo do HTLV-1.

IV. REVISÃO DA LITERATURA

IV.1. Vírus Linfotrópico da Célula T Adulta do tipo 1 (HTLV-1)

IV.1.1. Origem do HTLV-1

O Vírus Linfotrópico da Célula T Humana do tipo 1 foi detectado e isolado nos Estados Unidos da América em 1980, a partir de um paciente com linfoma cutâneo, sendo o primeiro retrovírus humano descrito na literatura (POIESZ et al., 1980). O primeiro caso de infecção pelo HTLV-1 aconteceu em 1977, no Japão (UCHIYAMA et al., 1977), em um paciente com quadro similar ao que foi posteriormente classificado como Leucemia/Linfoma de Células T Adulta (ATLL).

O HTLV-1 foi designado como do tipo 1 por volta de 1982, quando um vírus muito similar foi descrito em um paciente com leucemia de células pilosas (LCP), conhecida como cabeludas – *hairy cell leukemia* – sendo este descrito como HTLV-2 (KALYANARAMAN et al., 1982). Em 2005, a partir da amostra de um indivíduo de Camarões, foi descoberto o HTLV-3 e no mesmo ano foi descoberto o HTLV-4 (CALATTINI et al., 2005; WOLFE et al., 2005).

Os quatro tipos do HTLV fazem parte da família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae* e gênero *Deltaretrovirus*, sendo o HTLV-1 e 2 os mais encontrados no mundo, e apenas o HTLV-1 está associado a sintomatologias específicas.

IV.1.2. Distribuição mundial do HTLV-1

Poucos estudos do cenário epidemiológico mundial do HTLV-1 foram desenvolvidos ao longo dos anos, sendo os principais o artigo de 1993 de G. de Thé and R. Bomford, que estimava cerca de 10 a 20 milhões de indivíduos afetados pelo vírus, e o artigo de 2012 de Antoine Gessain e Olivier Cassar, que estimam cerca de 5 a 10 milhões de indivíduos infectados (DE THÉ; BOMFORD, 1993; GESSAIN; CASSAR, 2012).

Apesar de ser o mais utilizado, o estudo de Gessain e Cassar, 2012 foi baseado em uma população de aproximadamente 1,5 bilhões de indivíduos de localidades endêmicas para HTLV-1 que possuíam dados epidemiológicos confiáveis, o que nos leva a acreditar que este número possa ser muito maior quando incluído dados de regiões nunca estudadas. Esse cenário demonstra o quão a infecção pelo HTLV-1 é negligenciada, não fazendo parte da lista de doenças negligenciadas da Organização Mundial de Saúde (OMS), dificultando investimentos para melhor estudar e desvendar os mistérios envolvidos no desenvolvimento de diferentes formas clínicas (MARTIN; TAGAYA; GALLO, 2018).

As regiões altamente endêmicas se restringem ao sudoeste do Japão, Caribe, América do Sul, incluindo partes da Colômbia e Guiana Francesa, África Central e Ocidental, algumas regiões da Europa, do Oriente Médio e da Melanésia e o sudoeste dos Estados Unidos (Figura 1) (GESSAIN; CASSAR, 2012).

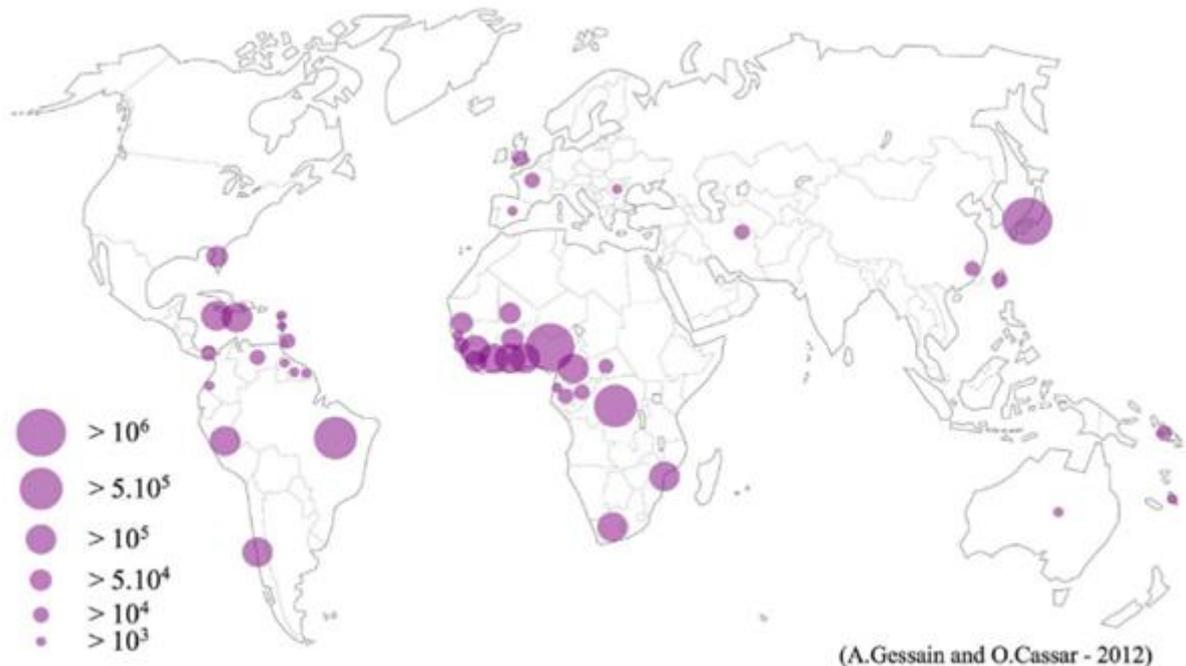


Figura I Distribuição geográfica mundial do HTLV-1. Distribuição da infecção pelo HTLV-1 de acordo com número absoluto de casos, dos principais focos da infecção pelo HTLV-1. Fonte: Adaptado de Gessain e Cassar (2012).

No Brasil cerca de 800.000 pessoas estão infectadas pelo HTLV, sendo um dos países com maior número absoluto de casos, baseado em estudos que variam de 2001 a 2012 (GESSAIN; CASSAR, 2012). Um estudo de 2005 reuniu dados de prevalência de HTLV-1/2, tendo base os bancos de sangue, dos 26 estados do Brasil e do Distrito Federal, e apesar de considerar a infecção por HTLV-2, é possível ter uma noção de como está distribuído no Brasil os casos de HTLV-1. Segundo este estudo, a prevalência varia de 0,04 a 1%, sendo Maranhão, Bahia e Pará os estados com maior prevalência, respectivamente (Figura 2) (CATALAN-SOARES; CARNEIRO-PROIETTI; PROIETTI, 2005). Segundo dados de Galvão-Castro et al., 1997 e Dourado et al., 2003, Salvador (Bahia) é uma cidade brasileira com alta prevalência, 1,3% (população de doadores de sangue) e 1,7% (população geral), respectivamente (DOURADO et al., 2003; GALVAO-CASTRO et al., 1997). De acordo com Pereira e colaboradores, Salvador, Barreiras e Ilhéus-Itabuna são as microrregiões da Bahia com maior

número de casos positivos de HTLV (entre HTLV-1 e HTLV-2) por 100.000 habitantes (PEREIRA et al., 2019).

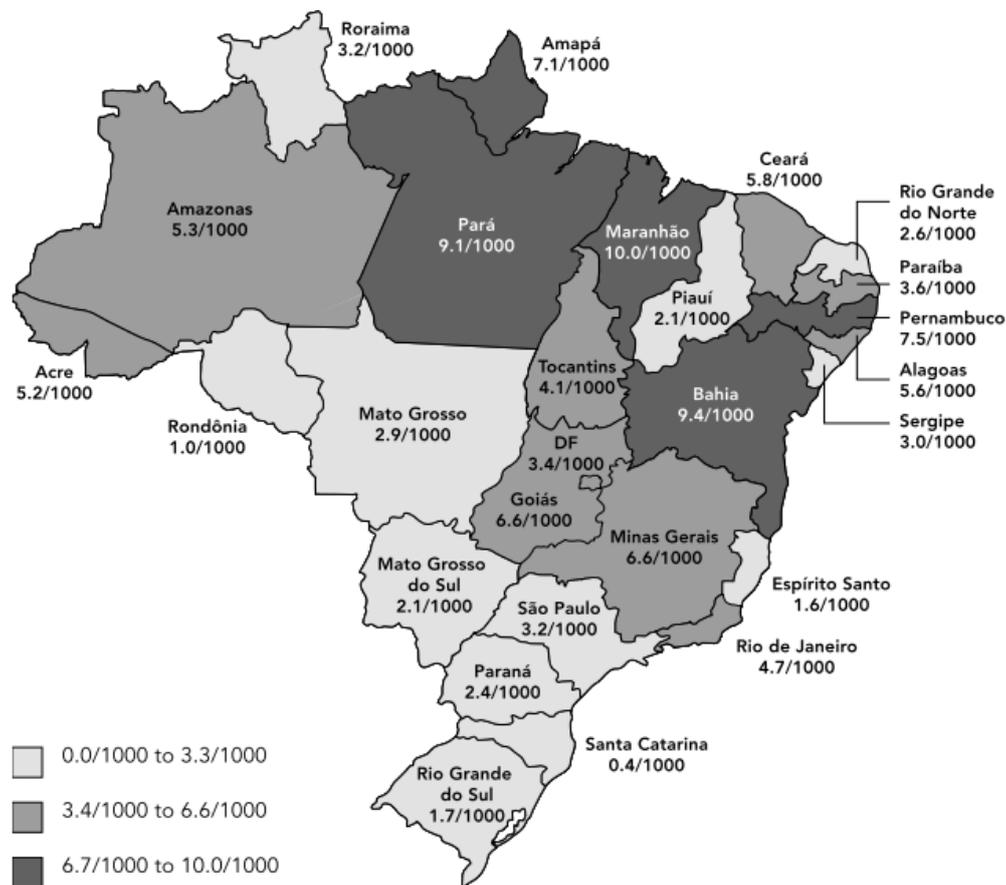


Figura II: Mapa de prevalência do HTLV-1/2 no Brasil. Prevalências das infecções por HTLV-1/2 dos 26 estados brasileiros e Distrito Federal. Adaptado de Catalan-Soares, Carneiro-Proietti e Proietti (2005).

IV.1.2.1. Epidemiologia molecular

O HTLV-1, apesar de ser muito estável geneticamente, ainda é classificado em sete subtipos, considerando a diversidade genética das regiões LTR e *env* do DNA proviral. São esses sete subtipos: “a” ou Cosmopolita, encontrado nas áreas endêmicas ao redor do mundo (MIURA et al., 1994); “b” ou África Central (HAHN et al., 1984; VANDAMME et al., 1994); “c” ou Melanésia (GESSAIN et al., 1991); “d” ou (Camarões/Gabão); identificado em isolados de pigmeus nessas regiões (CHEN et al., 1995; MAHIEUX et al., 1997); “e” ou Congo, encontrado em pigmeus desta região (SALEMI et al., 1998); “f” ou Gabão, identificado em um indivíduo do Gabão; e “g” ou Camarões (WOLFE et al., 2005).

O subtipo “a” (Cosmopolita) ainda é dividido em seis subgrupos, dependendo da região de origem dos primeiros isolados identificados: A ou Transcontinental, B ou Japonês, C ou

Oeste da Ásia, D ou Norte da África, E ou Negros Peruanos e F ou Etiópia (CHEN et al., 1995; GASMI et al., 1994; GESSAIN et al., 1991; HAHN et al., 1984; MIURA et al., 1994, 1997; SALEMI et al., 1998; TREVIÑO et al., 2014; VAN DOOREN et al., 1998; VANDAMME et al., 1994; VIDAL et al., 1994; WOLFE et al., 2005). Na figura 3 é possível ver a distribuição da infecção pelo HTLV-1 de acordo com subtipos e subgrupos, não estando representado no mapa os subgrupos E e F do subtipo Cosmopolita.

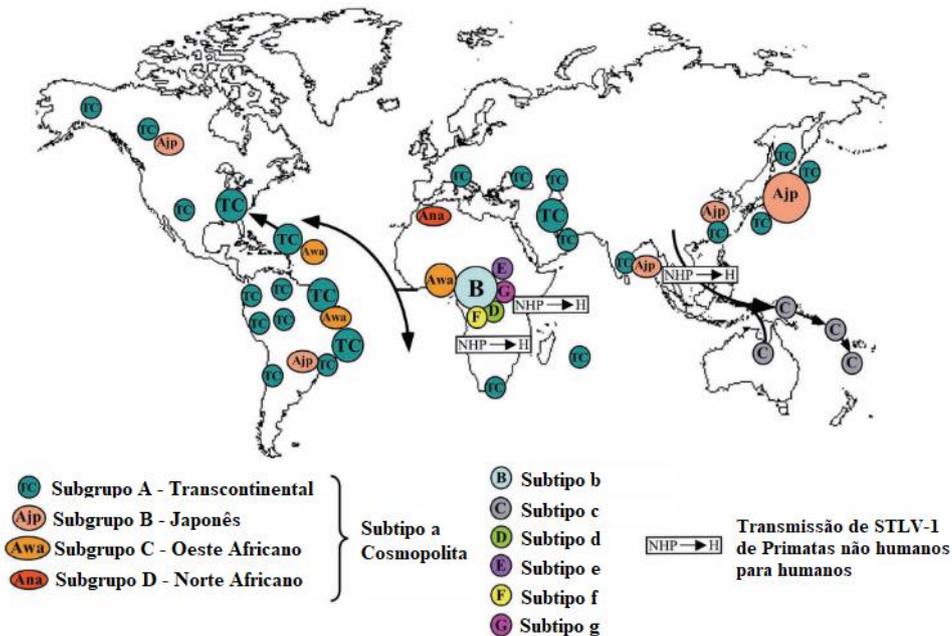


Figura III: Distribuição dos subtipos e subgrupos do HTLV-1. Distribuição mundial da infecção pelo HTLV-1 de acordo com os subtipos (a-g) e subgrupos (A-D) do HTLV-1. Adaptado de Gessain e Cassar (2012).

IV.1.3. Estrutura morfológica e genômica do HTLV-1

O HTLV-1 é um vírus de morfologia esférica, composto por envelope, capsídeo e nucleocapsídeo, sendo o material genético composto por duas fitas de ácido ribonucleico (*ribonucleic acid* – RNA) senso positivo (Figura 4) (VAN DOOREN, 2005). O envelope é uma camada bilipídica e possui duas glicoproteínas – gp21 e gp46 – codificadas pela região *env* do genoma do vírus. As proteínas de nucleocapsídeo, matriz e capsídeo – p15, p19 e p24, respectivamente – são codificadas pela região *gag* do genoma, e três enzimas importantes para o estabelecimento do vírus – integrase, transcriptase reversa e protease – são codificadas pela região *pol*.

O genoma do HTLV-1 (Figura 5) possui 9032 nucleotídeos e é formado regiões promotoras flanqueadoras, chamadas de regiões de repetição terminais longas (LTR), pelos genes estruturais *gag*, *pol* e *env*, e pela região pX, próxima a LTR 3', que é responsável por

codificar as proteínas regulatórias e proteínas acessórias (GIAM; SEMMES, 2016; SEIKI et al., 1983).

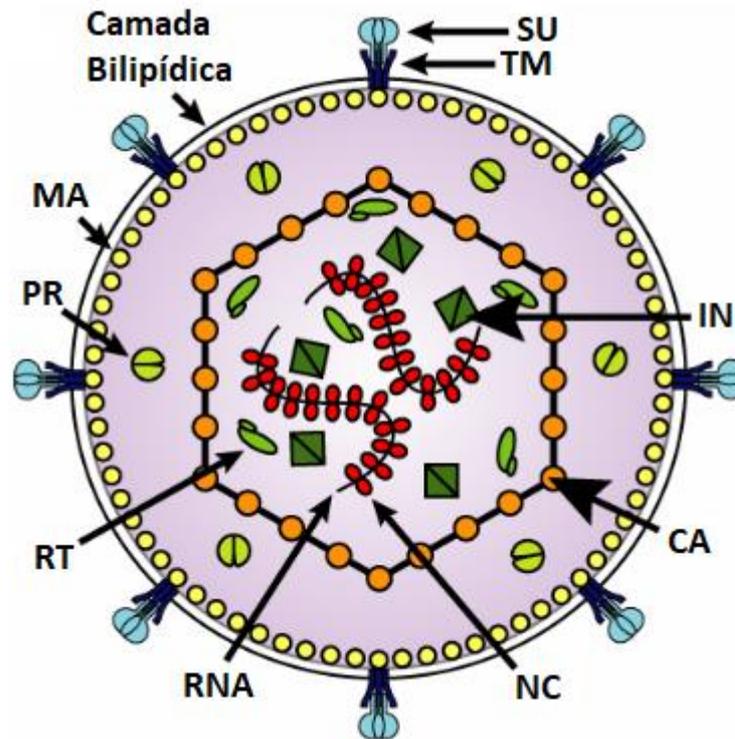


Figura V: Estrutura morfológica do HTLV-1. Desenho esquemático da estrutura morfológica do HTLV-1. SU: proteína de superfície (gp46); TM: proteína transmembrana (gp21); IN: enzima integrase; CA: proteína de capsídeo (p24); NC: proteína de nucleocapsídeo (p15); MA: proteína de matriz (p19); PR: protease; RT: enzima transcriptase reversa; RNA: fita de RNA. Adaptado de Van Dooren (2005).

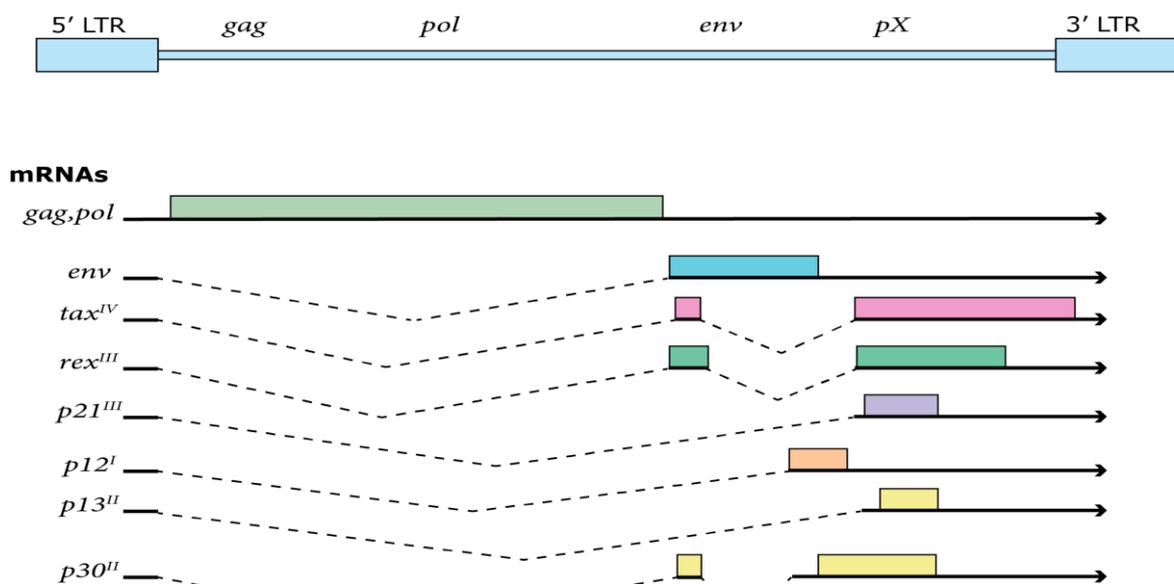


Figura IV: Estrutura genômica do HTLV-1. Esquema da composição do genoma do HTLV-1. Adaptado de Matsuoka & Jeang (2007).

As regiões LTR 5' e 3' são divididas em 3 subregiões: U3, R e U5, cujas sequências contêm informações importantes para transcrição do material genético, replicação e integração no genoma do hospedeiro (GRANT et al., 2002). Essa integração parece poder acontecer em qualquer sítio do genoma do hospedeiro e possivelmente causando interrupção e inativação de diversos genes nesse genoma. As sequências de LTR podem também participar da coordenação da expressão de genes virais depois que o genoma do vírus foi integrado ao genoma do hospedeiro (VARMUS, 1982).

A região pX possui quatro quadros de leitura positivos (*open reading frame* – ORF), ORF-I, ORF-II, ORF-III e ORF-IV, responsáveis pela codificação da maioria das proteínas, e um quadro de leitura negativo responsável por codificar a proteína HTLV-1 *bzip factor* (HBZ) a partir do gene também chamado de *hbz* (GAUDRAY et al., 2002). A ORF-I codifica a proteína p12 e pode, conseqüentemente, produzir p8, derivada de uma clivagem na p12; a ORF-II codifica p13 e p30; ORF-III codifica p21 e Rex (p27); e a ORF-IV codifica Tax. (CIMINALE et al., 1992; JOHNSON; HARROD; FRANCHINI, 2001; KIYOKAWA; SEIKI; IWASHITA, 1985).

A proteína p12, codificada pela ORF-I, fica localizada no retículo endoplasmático e tem a capacidade de aumentar as concentrações de cálcio intracelular (DING et al., 2002). Esse aumento de cálcio pode influenciar, dentre alguns mecanismos celulares, a estimulação da disseminação viral através do contato célula-célula e a regulação da transcrição viral. Além disso, p12 pode impactar a interação entre as células e conseqüentemente dificulta o reconhecimento da célula infectada pelo sistema imune do hospedeiro por alterar a expressão das moléculas de adesão intercelular 1 e 2 (*intercellular adhesion molecule* - ICAM-1 e ICAM-2) (BANERJEE; FEUER; BARKER, 2007).

A p12 ainda pode ser clivada em p8, visto que está susceptível a duas clivagens proteicas. A primeira quebra acontece entre os aminoácidos 9 e 10, que vai resultar na perda do sinal de retenção do retículo endoplasmático, e a segunda ocorre entre os aminoácidos 29 e 30, dando origem a p8. A p8 ao invés de se localizar no retículo, assim como a p12, vai residir na superfície da célula infectada, influenciando a disseminação viral através dos condúites (KORALNIK et al., 1992; VAN PROOYEN et al., 2010).

As proteínas acessórias p13 e p30, codificadas a partir da ORF-II, localizadas na mitocôndria e no núcleo (CIMINALE et al., 1999; GHORBEL et al., 2006), respectivamente, possuem funções importantes na transcrição viral e na latência da infecção (BINDHU; NAIR; LAIRMORE, 2004). Andresen et al. 2011 sugere que p13 liga-se diretamente com a proteína Tax, conseqüentemente interferindo na associação com o complexo CBP/p300, sendo esta interação necessária para Tax atuar na ativação da transcrição a partir de promotores na região

LTR (ANDRESEN et al., 2011). Assim como p13, p30 também influencia a atividade transcricional envolvendo Tax e o complexo CBP/p300, podendo impedir a interação entre eles (ZHANG et al., 2000). As suas proteínas, sendo assim, contribuem para a latência e persistência do vírus no organismo, reduzindo atividade de transcrição e reduzindo a expressão de Tax (ANDRESEN et al., 2011; NICOT et al., 2004).

Kiyokawa identificou as duas proteínas codificadas pela ORF-III, Rex (p27) e p21, sendo que a sequência que origina p21 é compreendida na sequência maior que codifica Rex. A proteína p21 ainda não tem suas funções completamente conhecidas, mas supõe-se que esteja relacionada com a regulação de expressão gênica do HTLV-1, além de possivelmente estar associada à latência prolongada a infecção (KIYOKAWA; SEIKI; IWASHITA, 1985; KUBOTA; HATANAKA; POMERANTZ, 1996). Rex se mostrou indispensável para multiplicação, infecção e disseminação de forma eficiente, sendo considerada um fator decisivo na mudança da infecção inicial e latente para a infecção produtiva, além de ser essencial para regulação gênica através de eventos pós-traducionais (YOUNIS; GREEN, 2005). Ye et al. 2003 mostrou que em experimentos *in vitro* a expressão de Rex era dispensável para a persistência e disseminação da infecção, contrário ao que aconteceu *in vivo*, uma vez que Rex se mostrou necessário para a persistência da infecção nos coelhos estudados (YE et al., 2003).

Tax possui diversas funções, muito ligadas principalmente a indução de proliferação viral, sendo um fator de transativação, e aumento da expressão de citocinas e receptores que acarretam proliferação viral (GALLO, 2011; SMITH; GREENE, 1992; TSCHACHLER et al., 1993). Pode também reprimir genes que inibem crescimento celular, além de inibir reparo do ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid* – DNA) e eventos de apoptose, o que leva ao aumento de instabilidade genética (FRANCHINI, 1995). Tax também tem um papel importante na formação das sinapses virológicas, junto com a molécula de adesão ICAM-1 (NEJMEDDINE et al., 2009).

Em relação à patogênese das doenças associadas ao HTLV-1, Tax atua como um dos principais agentes no desenvolvimento dessas doenças. Segundo Maruyama et al. 1987, em experimento *in vivo*, a indução de proliferação de células T induzida por Tax contribuiu para o estabelecimento e promoção da ATLL (MARUYAMA et al., 1987). Na HAM/TSP, Tax está ligada à desregulação das células do sistema imune (ENOSE-AKAHATA; VELLUCCI; JACOBSON, 2017).

A leitura no sentido negativo, direção LTR 3' – LTR 5', codifica a proteína HBZ a partir do gene *hbz* (GAUDRAY et al., 2002). Esta proteína é dividida em 3 grandes regiões, chamados de domínios, associado às funções de HBZ: domínio de ativação (*activation domain* – AD), domínio central (*central domain* – CD) e domínio *bzip* (RAVAL et al., 2015). O domínio

AD apresenta grande potencial de transativação, se ligando ao domínio KIX do complexo CBP/p300, coativador de transcrição envolvido em diversas funções celulares (CLERC et al., 2008). Além disso, HBZ pode inibir a apoptose das células, uma vez que pode se ligar à molécula FoxO3a, fator de transcrição do conhecido gene pró-apoptótico Bim, sendo assim, HBZ reprime a expressão e, conseqüentemente, a função do gene Bim (TANAKA-NAKANISHI et al., 2014).

HBZ possui algumas funções similares a Tax, como indução de proliferação e manutenção da infecção, mas também antagoniza algumas funções de Tax, como a transativação de LTR (YOSHIDA et al., 2008). Apesar de Tax e HBZ não interagirem diretamente, HBZ pode interferir na transcrição viral dependente de Tax, inibindo a ligação da proteína com sítios de transcrição, como CREB e TxRE III (GAUDRAY et al., 2002).

Outra característica importante de HBZ, principalmente no que diz respeito à patogênese de HAM/TSP, é a sua capacidade de induzir inflamação. HBZ induz células T regulatórias (Treg), responsáveis pela regulação de células T, a expressarem mais Foxp3 – fator de transcrição. Entretanto, apesar de apresentarem mais Foxp3, HBZ impede a ação desse fator, além de estimular a secreção de *interferon* γ (IFN- γ), citocina pró-inflamatória (YAMAMOTO-TAGUCHI et al., 2013; ZHAO et al., 2009).

Ademais, sabe-se também que existe uma isoforma da proteína HBZ, a proteína HBZ-SI, gerada por *splicing* alternativo. As duas formas da proteína possuem mais de 95% de similaridade na sequência de aminoácidos, o que pode implicar em funções similares, sendo a diferença deles na extremidade N-terminal. Observou-se em células de ATLL expressão das duas formas de HBZ (MURATA et al., 2006).

IV.1.4. Ciclo viral e mecanismos de disseminação do HTLV-1

O principal alvo de infecção do HTLV-1 são as células T CD4+, podendo também infectar células dendríticas, monócitos, linfócitos B, células T CD8+ e outras (HANON et al., 2000; KNIGHT et al., 1993; KOYANAGI et al., 1993; NATH et al., 2003; RICHARDSON et al., 1990; SETOYAMA et al., 1998). O ciclo de replicação clássico dos retrovírus segue os seguintes passos: identificação do vírus pela célula, fusão do envelope do vírus com a membrana celular, liberação do RNA viral no citoplasma, transcrição reversa do genoma viral, inserção do DNA viral no DNA do hospedeiro, síntese de RNA viral, tradução das proteínas a partir desse RNA e formação de novas partículas virais para liberação no sistema (Figura 6).

No caso do HTLV-1, a identificação e fusão do vírus com a membrana da célula são realizados pelas proteínas gp46 e gp21 do vírus juntamente com moléculas do hospedeiro, como proteoglicanos heparán sulfato (*heparan sulfate proteoglycans* – HSPG), neuropilina-1

(neuropilin 1 – NRP-1) e o transportador de glicose de classe 1 (*glucose transporter 1* – GLUT-1). A interação da gp46 com o HSPG causa maior adesão de NRP-1, o que leva à uma exposição dos sítios de ligação de GLUT-1, onde gp46 vai se ligar, possibilitando a fusão através da exposição da proteína gp21 do HTLV-1 (GHEZ et al., 2006; JONES et al., 2011; MANEL et al., 2004; MANEL; BATTINI; SITBON, 2005; PIÑON et al., 2003).

Uma vez dentro da célula hospedeira, o RNA será transformado em DNA viral, que irá para o núcleo e será integrado no DNA hospedeiro, formando o que se chama de DNA proviral ou provírus, através da ação da enzima integrase viral (SEIKI et al., 1984). A síntese do RNA viral a partir do provírus vai levar à formação das proteínas virais necessárias para dar continuidade à replicação, formando novas partículas virais, que serão disseminadas pelo sistema após brotamento para o exterior da célula infectada.

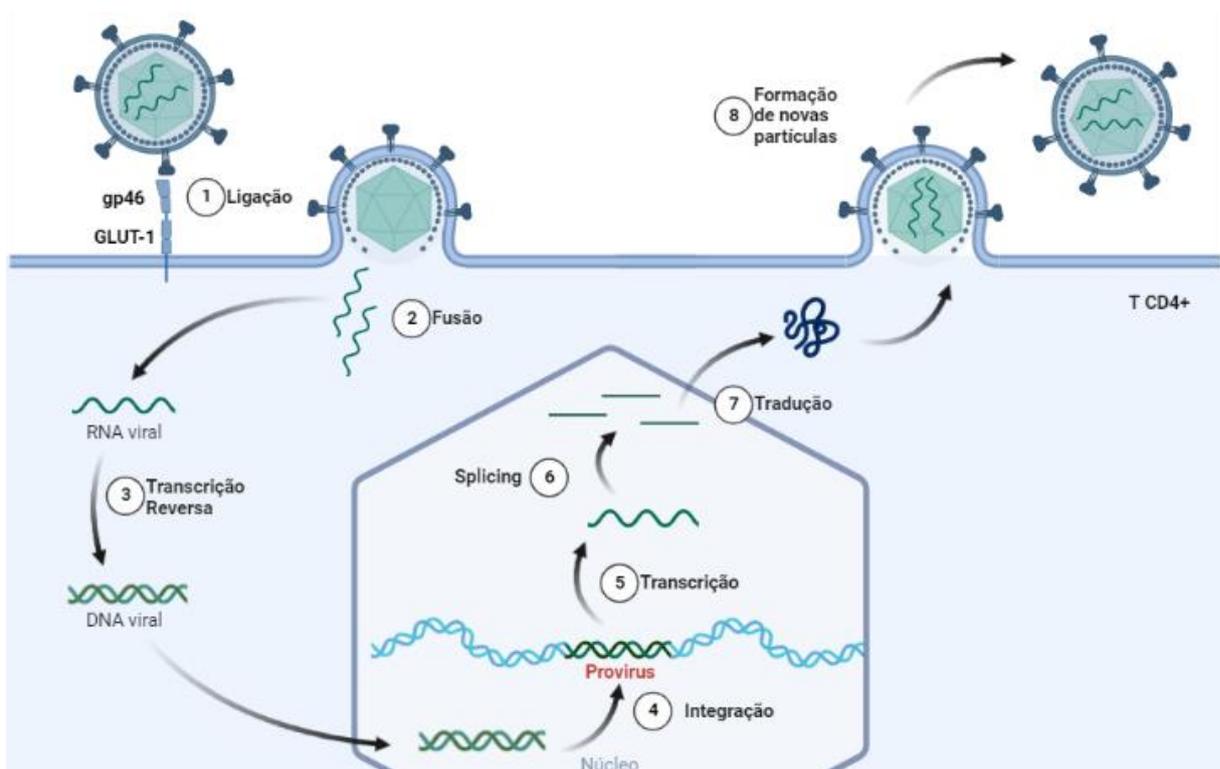


Figura VI: Representação do processo de infecção das células pelo HTLV-1. Ciclo: 1 – Ligação: reconhecimento do vírus pela célula; 2 – Fusão: fusão do vírus com a célula, liberando o material genético viral (RNA) no citoplasma da célula hospedeira; 3 – Transcrição Reversa: o RNA viral vai ser transcrito em DNA viral pela enzima transcriptase reversa, e este será transportado para o núcleo; 4 – Integração: o DNA viral será integrado no genoma do hospedeiro através da enzima integrase, formando o provírus; 5 – Transcrição: o provírus será transcrito, passará pelo processo de splicing (6), gerando diferentes mRNA e finalmente será traduzido (7), formando as proteínas virais; 8 – Formação de novas partículas virais: as proteínas estruturais serão utilizadas para formar novos vírus, que serão colocados para fora da célula por brotamento, para que possam infectar novas células. Fonte: Elaborado pelo autor usando o Biorender.

A principal via de disseminação do HTLV-1 é a expansão clonal, por mitose. O fato deste ser o principal meio de disseminação explica o porquê do HTLV-1 ser um retrovírus estável e mais geneticamente conservado, quando comparado a outros retrovírus que precisam usar a transcriptase reversa com maior frequência, visto que essa enzima possui alta taxa de erro (CIMARELLI et al., 1996; GESSAIN; GALLO; FRANCHINI, 1992; WATTEL et al., 1995).

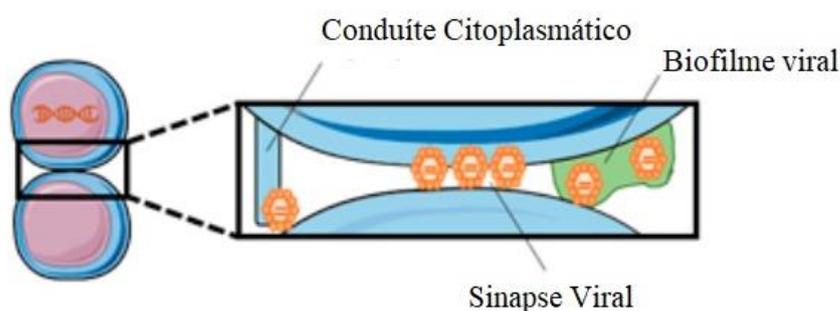


Figura VII: Vias de disseminação do HTLV-1. Representação das vias alternativas de disseminação do HTLV-1 no sistema do indivíduo infectado. Adaptado de Futsch, Mahieux e Dutartre (2017).

Além da via clássica de disseminação do HTLV-1, existem outras formas, como sinapse virológica, formação de biofilmes e conduítes (Figura 7). A sinapse virológica é caracterizada por uma polarização celular de uma célula infectada e uma célula não infectada, formando uma junção célula-célula, composta basicamente por um centro de organização microtubular (*microtubule organizing centre* – MTOC) e uma molécula de adesão (BANGHAM, 2003; IGAKURA et al., 2003; NEJMEDDINE; BANGHAM, 2010). A formação dessa junção célula-célula permite a passagem de proteínas e do material genético do vírus, levando à integração na célula alvo (MATSUOKA; JEANG, 2007).

Pais-Correia et al. 2010 demonstrou que as células infectadas pelo HTLV-1 podem formar estruturas semelhantes a biofilmes, ricas em carboidratos e com acúmulo de proteínas virais, além de partículas virais maduras. Além disso, foi observado a presença de um proteoglicano que também participa da sinapse viral. Esse cenário facilita a disseminação célula-célula do HTLV-1 (PAIS-CORREIA et al., 2010). No mesmo ano, foi relatado a possibilidade de disseminação por conduítes virais após a observação da passagem de proteínas virais codificadas por *env* e *gag*, além de p8, de uma célula infectada para uma célula não infectada (FUTSCH; MAHIEUX; DUTARTRE, 2017; VAN PROOYEN et al., 2010).

IV.1.5. Formas de transmissão e prevenção do HTLV-1

O HTLV-1 pode ser transmitido entre indivíduos de forma horizontal e de forma vertical. No caso da transmissão horizontal, o contato através de relações sexuais desprotegidas é a via mais comum, mas também pode ocorrer através do compartilhamento de agulhas contaminadas e transfusão sanguínea e de hemoderivados. Em relação à transmissão vertical, de mãe para filho, a via mais comum é através do aleitamento materno, mas também pode acontecer pela via placentária. Sendo assim, a prevenção é feita de duas maneiras, sendo a principal o uso de preservativos nas relações sexuais e a troca do leite materno por leite industrializado e/ou fórmula (MARTEL; GOTUZZO, 2022; ROSADAS; TAYLOR, 2019; URETA-VIDAL et al., 1999).

IV.1.6. Doenças associadas ao HTLV-1

IV.1.6.1. Mielopatia Associada ao HTLV-1/Paraparesia Tropical Espástica

A mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP) (GESSAIN et al., 1985; OSAME et al., 1986), doença neurodegenerativa inflamatória, foi associada à infecção pelo HTLV-1 entre os anos de 1985 e 1986, em regiões em zonas tropical e temperada, e por isso existem duas denominações para a doença. A HAM/TSP afeta cerca de 0,25 a 3,8% dos indivíduos infectados (YAMANO; SATO, 2012), e apesar de ser o principal acometimento neurológico, ela faz parte de um complexo de sintomas neurológicos associados ao HTLV-1, considerando o observado nos indivíduos afetados (Tabela 1) (CARNEIRO-PROIETTI et al., 2002).

O processo inflamatório da HAM/TSP é resultado de um infiltrado predominantemente linfocitário no líquido cefalorraquidiano, e ao passar do tempo os elementos dessa inflamação vão dando lugar à uma degeneração da substância branca, sendo o local mais atingido a medula torácica baixa (CARNEIRO-PROIETTI et al., 2002). No infiltrado celular perivascular já foi observado a presença de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ), e interleucina-1 β (IL-1 β) (UMEHARA et al., 1994). Por conta do lugar em que essa degeneração acontece primordialmente, os indivíduos começam a apresentar perda de movimentos de membros inferiores, dificultando deambulação até o ponto de fazer com que o paciente necessite de cadeira de rodas para se locomover ou até que fique acamado.

Ainda que existam esforços e muitos estudos tentando desvendar a patogênese da HAM/TSP, não existe um consenso ou uma certeza de como ou por que essa doença se desenvolve nos indivíduos infectados pelo HTLV-1. Entretanto, foram descritas três hipóteses: 1 – citotoxicidade direta; 2 – autoimunidade; e 3 – dano colateral, sendo essa a mais aceita.

A primeira, identificada como citotoxicidade direta, sugere que uma vez que o astrócitos e células dendríticas são infectados pelo HTLV-1, estas apresentariam antígenos virais nas suas superfícies, induzindo a ação de linfócitos citotóxicos, que atravessariam a barreira hematoencefálica e destruiriam as células infectadas através da citotoxicidade direta (IJICHI; OSAME, 1995; LEVIN; JACOBSON, 1997; NAKAMURA et al., 1993).

A segunda, relacionada a autoimunidade, relata um mimetismo do antígeno Tax em uma proteína neuronal, acarretando um processo inflamatório e consequente lesão neuronal decorrente de um processo autoimune onde as células T CD4+ gerariam uma resposta imunológica na tentativa de matar uma célula infectada, que na verdade é uma célula saudável (LEE et al., 2005; LEVIN et al., 2002).

A terceira está relacionada a um dano colateral, que seria a desmielinização devido á infiltração de linfócitos infectados no sistema nervoso central, desencadeando resposta inflamatória crônica e dano tecidual, levando à perda de função. A migração das células T CD4+ infectadas com o HTLV-1, juntamente com os linfócitos T CD8+ anti-Tax, pela barreira hematoencefálica, provoca essa destruição tecidual através da liberação de citocinas pró-inflamatórias (HÖLLSBERG; HAFLER, 1995; OSAME, 2002; SAKAI et al., 2001). Apesar do dano colateral ser a hipótese mais provável e de maior importância, talvez as três hipóteses contribuam com a patogênese.

O perfil de resposta imune em pacientes com HAM/TSP é predominantemente T *helper* tipo 1 (Th1), e observa-se uma redução de citocinas T *helper* tipo 2 (Th2). Apesar dos altos níveis de IFN- γ , uma citocina pró-inflamatória, não se tem associação concreta entre os níveis da citocina e a gravidade da doença (MONTANHEIRO et al., 2009; MUNIZ et al., 2006). O único biomarcador para progressão da doença é a carga proviral, observada em altos níveis em pacientes com HAM/TSP quando comparado aos assintomáticos. Essa alta carga proviral é resultado da expansão clonal das células T CD4+ infectadas pelo HTLV-1 (GONCALVES et al., 2008; JACOBSON, 2002).

Tabela I: Complexo neurológico associada ao HTLV-1.

Síndrome	Quadro Clínico
HAM/TSP (Mielopatia associada ao HTLV-1/Paraparesia Espástica Tropical)*	Fraqueza crônica e progressiva dos membros inferiores, distúrbios esfinterianos, sinais sensitivos objetivos pobres ou ausentes, síndrome tetrapiramidal**
Miopatia	Fraqueza muscular proximal, mialgias, reflexos profundos e sensibilidades normais
Doença do neurônio motor	Fraqueza muscular, amiotrofias, síndrome piramidal, miofasciculações, sensibilidade normal
Neuropatia periférica	Fraqueza muscular distal, hipoestesia em luvas e/ou em meias, hipo ou arreflexia profunda
Disautonomia	Hipotensão ortostática, disfunção esfinteriana
Ataxia cerebral	Tremor de ação, dismetria, assinergia de tronco, nistagmo
Disfunção cognitiva	Alentecimento psicomotor, distúrbios de memória, hipoatensão, distúrbio visuo-motor

*Quadros clínicos similares, embora com menor frequência, têm sido descritos em pacientes infectados pelo HTLV-II

**O diagnóstico de HAM/TSP baseia-se na presença de sinais clínicos compatíveis e dados laboratoriais que comprovem a infecção pelo HTLV-1 no sangue e, simultaneamente, no líquido cefalorraquidiano

Fonte: Adaptado de Carneiro-Proietti et al. 2002.

IV.1.6.2. Leucemia/Linfoma de Células Adultas

A leucemia/linfoma de células T adultas (ATLL) (HINUMA et al., 1981) atinge de 2-5% dos indivíduos (YAMANO; SATO, 2012), sendo um tipo de câncer altamente maligno, de rápido desenvolvimento, levando à óbito nos primeiros anos. Os quadros de ATLL são classificadas em 4 fases: aguda, linfoma, crônica e indolente (SHIMOYAMA, 1991). Além disso, ainda podem existir quadros de ATLL com relação dermatológica, classificadas em tumoral e eritematosa (BITTENCOURT et al., 2007).

A ATLL é caracterizada por infiltração de células T CD4+ infectadas em alguns órgãos como baço, trato gastrointestinal, pele e nos linfonodos, além de causar uma transformação morfológica no núcleo das células T, ficando com característica de flor (MATSUOKA, 2003). A proteína Tax possui um importante papel na patogênese da ATLL, visto que sua atividade reguladora está relacionada à capacidade oncogênica do HTLV-1. Tax induz o aumento da expressão de citocinas envolvidas na proliferação de células T, de fatores de transcrição e de proto-oncogenes. Além disso, pode inibir reparo do DNA e a morte celular programada (MATSUOKA, 2005; YASUNAGA; MATSUOKA, 2007).

Outra proteína importante no estabelecimento da ATLL é HBZ. Observa-se que com o passar do tempo, os níveis de Tax diminuem nas células de ATL, enquanto as taxas de HBZ se mantêm constantes. HBZ também induz proliferação e, adicionado a isto, o mRNA HBZ inibe a apoptose celular (KAWATSUKI et al., 2016). Satou et al. 2006 observou o desenvolvimento de linfoma em camundongos transgênicos para células T CD4+ específicas para expressão de HBZ (SATOU et al., 2006).

Visto que a expansão clonal é a via principal de disseminação da infecção, uma vez que uma população celular possui todas essas características oncogênicas, com um genoma instável devido às funções de Tax e HBZ, ela vai se proliferando por um longo tempo no hospedeiro, até desencadear a ATLL (KATAOKA et al., 2015; YASUNAGA; MATSUOKA, 2007). O prognóstico desta manifestação clínica não é bom, os indivíduos normalmente têm uma sobrevida de 1 a 4 anos (MATUTES, 2007).

IV.1.6.3. Outras manifestações clínicas

Além das duas manifestações clínicas mais comuns, o indivíduo infectado pelo HTLV-1 pode apresentar outros problemas de saúde associados à infecção, como a dermatite infecciosa associada ao HTLV-1 (IDH), caracterizada por lesões eritêmato-descamativas principalmente nas regiões retroauriculares, pescoço, couro cabeludo, ombro e genitais (LA GRENADE et al., 1998; LAGRENADE et al., 1990); uveíte, caracteriza por infiltração celular ocular de moderada a grave e vasculite retiniana (MOCHIZUKI et al., 1992); e algumas doenças reumáticas, como artrite reumatoide (MCCALLUM et al., 1997).

Cerca de 80% dos indivíduos, entretanto, são classificados como assintomáticos (AC), apesar de desenvolverem sintomas inespecíficos, como dificuldade de controle da bexiga, comprometimento neurológico sutil, entre outros, impossibilitando a classificação para uma das doenças associadas. Essa classificação “assintomático” vem sendo abertamente discutida, uma vez que o paciente desenvolve sintomas relacionados à infecção, além de toda carga emocional e psicológica que atinge essas pessoas, podendo levar inclusive a problemas nesse contexto.

IV.1.6.4. Tratamento

Devido ao HTLV ser uma infecção negligenciada e conseqüentemente não atrair muito investimento para desenvolvimento de estudos e terapias, os indivíduos afetados continuam sem tratamento. Aqueles que desenvolvem algumas das doenças associadas à infecção, se tiverem acesso, passam por tratamento paliativo multiprofissional, sendo acompanhados por neurologistas, oncologistas, fisioterapeutas, psicólogos, dentre outras especialidades.

A erradicação desse vírus fica comprometida neste cenário em que não há terapia eficaz e específica para cada doença, onde não existem campanhas de prevenção eficaz e de comum conhecimento, além de não existir uma maneira de controlar a infecção já existente, de forma a diminuir a transmissão viral e desenvolvimento das diferentes formas clínicas.

IV.2. Sequenciamento aplicado a estudos de genoma viral

As tecnologias de sequenciamento têm sido utilizadas desde a década de 70 para descrever e estudar sequências de interesse. A linha do tempo dessas tecnologias é bem distribuída em três gerações (KCHOUK; GIBRAT; ELLOUMI, 2017; THUDI et al., 2012). A primeira geração é composta pela metodologia estabelecida por Sanger em 1975 e a metodologia descrita por Maxam-Gilbert em 1977 (MAXAM; GILBERT, 1977; SANGER; COULSON, 1975). A segunda geração é composta por tecnologias como: Roche/454, Ion Torrent, Illumina/Solexa e ABI/SOLiD (HEO, 2015; ROTHBERG et al., 2011; SHENDURE; JI, 2008). Na terceira geração estão as tecnologias desenvolvidas pela *Oxford Nanopore* e pela *Pacific Biosciences* (PacBio). As tecnologias a partir da segunda geração são conhecidas como metodologias de sequenciamento de nova geração (*next generation sequencing* – NGS) (KCHOUK; GIBRAT; ELLOUMI, 2017).

O sequenciamento Sanger, apesar de ser da primeira geração, continua sendo padrão ouro do sequenciamento por sua baixa taxa de erro – acurácia de 99,999% - resultando em sequenciamento de alta qualidade (LIU et al., 2012). A metodologia é conhecida como método de terminação de cadeia, usando uma das fitas da dupla fita de DNA como molde. Para gerar a sequência complementar, são usados dideoxynucleotídeos (dNTPs) marcados para cada base – ddA, ddG, ddC e ddT – *primers* (normalmente os mesmo usados para amplificar a amostra previamente) e outros reagentes necessários, como a DNA polimerase (MASOUDI-NEJAD; NARIMANI; HOSSEINKHAN, 2013).

O Roche/454, de forma similar ao Ion Torrent, usa a metodologia de pirosequenciamento, baseada na detecção do pirofosfato que é liberada após a incorporação, levando a emissão de luz por ação da luciferase, de uma base à sequência que está sendo gerada. Diferentemente do Roche/454, o Ion Torrent não usa nucleotídeos marcados com fluorescência, essa metodologia vai detectar íons de hidrogênio liberados no momento da incorporação dos nucleotídeos (HEO, 2015; ROTHBERG et al., 2011).

A metodologia da Solexa/Illumina, umas das mais utilizadas, é chamada de sequenciamento por síntese. As amostras de DNA são fragmentadas de forma aleatórias, ligadas à adaptadores nas duas extremidades desse fragmento. Esses adaptadores vão se ligar a um adaptador complementar que está fixado em uma superfície chamada de *flowcell*. Após isso, as sequências fixadas vão ser amplificadas através do que é chamado de “ponte de amplificação por PCR”, gerando várias cópias de uma mesma sequência – esse conjunto de sequências provenientes de uma mesma sequência original é chamado de *cluster*. Esses *clusters* são excitados por luz, emitindo fluorescência específica para cada tipo de nucleotídeo, e programas

traduzem esse sinal na sequência gerada (BENTLEY et al., 2008; HEO, 2015; SHENDURE; JI, 2008).

De forma similar, o sequenciamento da PacBio funciona por fluorescência, mas ao invés de fazer várias ciclagens, o sistema vai reconhecendo o sinal em tempo real, assim que o nucleotídeo é incorporado, o que diminui o tempo necessário para gerar as sequências – chamado de *Single-Molecule Real Time* (SMRT) (BENTLEY et al., 2008). Além do tempo mais rápido de sequenciamento, o preparo pré-equipamento também é mais rápido que as metodologias de primeira e segunda geração, entretanto, possui altas taxas de erro (RHOADS; AU, 2015).

O sequenciamento utilizando a metodologia de nanoporos, sendo o equipamento mais conhecido o MinION, da Oxford Nanopore, funciona primordialmente por corrente de íons. Cada nucleotídeo possui um sinal único, e ao passar pelo poro proteico, o sistema vai construindo um modelo gráfico que posteriormente é traduzido na sequência gerada (MIKHEYEV; TIN, 2014; REUTER; SPACEK; SNYDER, 2015). Apesar de apresentar taxa de erro maior em relação à outras metodologias, é uma tecnologia de custo mais baixo, e que possibilita sua execução em locais remotos e sem uma grande infraestrutura. O MinION é pequeno e o mais importante é o fato de ser portátil (IP et al., 2015; LU; GIORDANO; NING, 2016).

As tecnologias de sequenciamento possuem diversas aplicações, como descoberta de genes patogênicos, estudos de evolução comparativos, clonagem, descrição do genoma de patógenos e outros (LIU et al., 2012). A plataforma Illumina tem sido uma das mais utilizadas, pelo bom balanço entre o tamanho das sequências geradas, custos e taxa de erro (LOMAN et al., 2012).

No contexto das doenças infecciosas, a utilização das plataformas de sequenciamento contribui para o melhor entendimento da patogênese de determinadas manifestações clínicas, ajuda na determinação/identificação de características únicas de determinadas cepas/variantes, o que sustenta trabalho de vigilância molecular/epidemiológica. Além disto, as sequências geradas são importantes para desenvolvimento de diagnóstico, vacinas e terapias específicas contra o patógeno. Conseqüentemente, as sequências geradas nesse trabalho contribuem para os avanços no entendimento do HTLV-1 e o surgimento de doenças, assim como ajuda a responder problemáticas antigas, como é o caso do HTLV-1 (BARRETO et al., 2016; BRANCACCIO et al., 2021; COHEN-GIHON et al., 2020; DE JESUS et al., 2019; REGO et al., 2016).

V. METODOLOGIA

V.1. Desenho Experimental

V.1.1. População de Estudo

Neste estudo de corte transversal, as amostras foram coletadas de pacientes vivendo com HTLV-1, assintomáticos (AC) ou com HAM/TSP, acompanhados no Centro de Atendimento ao Portador de HTLV (CHTLV) da Escola de Medicina e Saúde Pública (EBMSP). O quadro clínico dos pacientes foi definido por neurologistas do CHTLV, ressaltando que os indivíduos assintomáticos apresentam sintomas leves que não permitem que eles sejam classificados em alguma das manifestações clínicas. Os pacientes selecionados foram convidados a participar e, aqueles que aceitaram, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Dados clínicos e epidemiológicos foram coletados dos formulários médicos armazenados no CHTLV. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da EBMSP (CAAE 11594513.3.0000.5544).

V.1.2. Coleta e Processamento

Amostras de sangue foram coletadas no CHTLV e transferidas no mesmo dia para a Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz (FIOCRUZ – IGM) para que a separação de células mononucleares periféricas (PBMC - *peripheral blood mononuclear cells*) fosse realizada. O DNA foi extraído do PBMC utilizando o kit *DNeasy Blood and Tissue Kit* (Qiagen, Hilden, Germany).

V.1.3. Reação em Cadeia da Polimerase e Sequenciamento

As regiões *hbz* e LTR do HTLV-1 foram amplificadas através da reação em cadeia da polimerase (PCR), usando o termociclador *Veriti Thermal Cycler* (Applied Biosystems, United States), de acordo com protocolo já publicado (BORBA et al., 2019), usando os seguintes primers: 24+ (5'-CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAGTATGCTGCCAGAACAG-3') e 27- (5'-CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGGGTTCCATGTATCCATTTTCGGA-3') para o gene *hbz*; 30+ (5'-CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCCAGCCATCTTTAGTACTACAGT-3') e 32- (5'-CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGAGCCAACGGAGTCGC-3') para LTR 3'.

A amplificação foi confirmada através de gel de agarose e os produtos da PCR foram purificados usando o kit *QIAquick PCR Purification* (Qiagen, Hilden, Germany) para serem então sequenciados, usando o kit *BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, Foster City, California, United States), juntamente com os *primers* usados na amplificação, através do sequenciador *3500xL Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, California, United States). As sequências brutas do sequenciamento Sanger foram usadas para gerar sequências consenso de cada amostra, gerando o grupo de sequência do CHTLV. A

visualização das sequências, edição e construção das consensus foi realizada utilizando o programa *Geneious Prime* 2020.1.1 (<https://www.geneious.com>).

V.1.4. Seleção de sequências de Banco de Dados

Para caracterizar as mutações das regiões *hbz* e LTR do HTLV-1 e comparar a frequências dessas mutações, entre diferentes manifestações clínicas, em sequências do CHTLV e de sequência já publicadas, foi montado um conjunto de sequências previamente publicadas no Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) e no Banco de Dados de Epidemiologia Molecular do HTLV-1 (<https://htlv1db.bahia.fiocruz.br>). A visualização das sequências, edição e construção do set foi realizada utilizando o programa *Geneious Prime* 2020.1.1 (<https://www.geneious.com>).

A busca de sequências no Genbank foi realizada usando as seguintes palavras-chaves: “*HTLV-1 AND hbz/p8/p12/p30*”, “*HTLV-1 AND LTR*” e “*HTLV-1 AND complete genome*”. Para o Banco de Dados de Epidemiologia Molecular do HTLV-1 foram selecionadas as regiões de interesse, LTR e *hbz*, nos filtros do site. Sequências de outras espécies que não humano, de diferentes tipos do HTLV, sequências duplicadas e sequências sem informação clínica foram excluídas do conjunto de dados. As sequências remanescentes foram alinhadas com a sequência referências de HTLV-1 – ATK1 (J02029.1). As sequências que alinharam nas regiões de interesse compuseram o set usado para as análises seguintes.

V.1.5. Genotipagem do HTLV-1

Para identificar os subtipos e os subgrupos das amostras selecionadas foram realizadas análises filogenéticas com as sequências do CHTLV e sequências de LTR previamente publicadas no GenBank. Estas sequências foram alinhadas, usando o MAFFT v.1.4.0 (KATO; STANDLEY, 2013) implementado no *Geneious Prime* 2020.1.1 (<https://www.geneious.com>), com sequências referências de todos os subtipos e subgrupos (AF054627, AY342303-AY342304, AY818425, DQ005552-DQ005555, DQ005564-DQ005567, EF672333-EF672336, FJ853491, GU225731-GU225732, J02029, L02534, L76309, L76312, M37299, U12804-U12806, Y16476-Y16477, Y16479-Y16482, Y16484, Y16487 e Y17014).

Após o alinhamento, uma árvore de máxima verossimilhança (*maximum likelihood* – ML) foi reconstruída usando o IQ-TREE v.1.6.12 (MINH et al., 2020) com o modelo de substituição de nucleotídeos TN+F+G4, inferido pelo ModelFinder implementado no programa IQ-TREE (KALYAANAMOORTHY et al., 2017). O cálculo do *bootstrap* com 1000 réplicas (THI HOANG et al., 2017) foi usada para calcular o suporte estatístico dos ramos da árvore. Todas as árvores foram visualizadas e editadas usando o programa FigTree v1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

V.1.6. Análise genética de *hbz* e LTR

Para encontrar as variações nucleotídicas nas sequências de *hbz* e LTR do CHTLV e do GenBank, a ferramenta de anotação do *Geneious Prime* foi utilizada e o *plugin* TFScan foi usado para mapear os sítios de ligação de fatores de transcrição das sequências de LTR. As informações dos dois conjuntos de dados foram posteriormente comparadas.

A análise do perfil físico-químico e a busca de modificações pós-traducionais foi realizado através da plataforma PRABI (<https://npsa-prabi.ibcp.fr/>), usando o banco de dados do PROSITE, para analisar se as mutações na proteína HBZ alteram alguma das características dessa proteína quando comparadas à sequência “selvagem” (baseado em ATK1). O perfil físico-químico foi plotado usando o *GraphPad Prism* 8.4.2 (*GraphPad Software*, San Diego, California, USA).

V.1.7. Análise estatística

Em relação as análises estatísticas, para avaliar se havia diferenças nas frequências das mutações em relação aos diferentes grupos clínicos, foi usado o teste exato de *fisher* no *GraphPad Prism* 5.02 (*GraphPad Software*, San Diego, California, USA). As sequências foram divididas nos seguintes grupos: AC, HAM/TSP, ATLL e IDH e as diferenças estatísticas entre as frequências das mutações nos diferentes grupos foram avaliadas comparando AC com cada uma das manifestações individualmente. O valor de *p* considerado como estatisticamente significativo foi de $p < 0,05$.

V.2. Revisão Sistemática

As revisões sistemáticas foram desenvolvidas seguindo as instruções do documento “Principais Itens para relatar em Revisões Sistemáticas e Meta-Análises” (PRISMA – *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*), e submetidas ao registro internacional de revisões sistemáticas (PROSPERO – *International Prospective Register of Systematic Reviews*).

A construção dos algoritmos de busca foi feita baseado nos descritivos presentes nos bancos de dados “Descritivos em Ciências da Saúde – DeCs” e “*Medical Subject Headings - MeSH*”, além de palavras-chave adicionais. Os artigos foram inicialmente filtrados após leitura de título e resumo, para depois os selecionados dessa filtragem serem lidos na íntegra. Os critérios de inclusão e exclusão estão especificados em cada artigo (itens VI.2 e VI.3), assim como os dados que foram extraídos de cada busca.

VI. RESULTADOS

Os resultados desta dissertação de mestrado foram organizados em 3 seções.

Na seção 1 estão os resultados do sequenciamento e identificação de mutações presentes em duas regiões do genoma do HTLV-1, *hbz* e LTR, dividido em duas subseções, uma para cada região. Os dados associados à *hbz* estão demonstrados no artigo científico já publicado na revista *Journal of Medical Virology* (qualis B1) e intitulado “***Molecular characterization of HTLV-1 genomic region hbz from patients with different clinical conditions***”. (doi: **10.1002/jmv.27005**). Já os dados relacionados a LTR estão descritos neste documento como resultados complementares não publicados.

Na seção 2 encontram-se os resultados de uma revisão sistemática da literatura sobre as mutações no genoma do HTLV-1 relacionadas a manifestação clínica de HAM/TSP, apresentado no formato de artigo científico, submetido na revista *Frontiers in Immunology* (qualis A1), intitulado “***Mapping variants in HTLV-1 genome to analyze their impacts on the HAM/TSP development: a systematic review***”.

Na seção 3 estão os resultados relativos à revisão sistemática da literatura sobre as tecnologias de sequenciamento usadas para o estudo do HTLV-1, demonstrado através do artigo científico já publicado na revista científica *Archives of Virology* (qualis B1) intitulado “***An overview of sequencing technology platforms applied to HTLV-1 studies: a systematic review***”. (doi: **10.1007/s00705-021-05204-w**).

VI.1. Seção 1:

VI.1.1. Subseção 1: *Molecular characterization of HTLV-1 genomic region hbz from patients with different clinical conditions*

Nesta subseção estão descritos os resultados relativos ao primeiro objetivo secundário, sobre as mutações em *hbz* do HTLV-1 e a possível associação às manifestações clínicas.



Received: 14 December 2020 | Revised: 19 March 2021 | Accepted: 31 March 2021
DOI: 10.1002/jmv.27005

SHORT COMMUNICATION

JOURNAL OF
MEDICAL VIROLOGY WILEY

Molecular characterization of HTLV-1 genomic region *hbz* from patients with different clinical conditions

Marina Silveira Cucco¹ | Laise Eduarda Paixão de Moraes^{2,3} |
Felipe de Oliveira Andrade⁴ | Ricardo Khouri^{2,3} | Bernardo Galvão-Castro¹ |
Thessika Hialla Almeida Araujo¹ | Filipe Ferreira de Almeida Rego⁵ |
Luana Leandro Gois^{1,2,5} | Fernanda Khouri Barreto⁴ |
Luciane Amorim Santos^{1,2,3,5}

¹Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, Bahia, Brasil

²Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia, Brasil

³Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina da Bahia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil

⁴Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, Bahia, Brasil

⁵Universidade Católica do Salvador, Salvador, Bahia, Brasil

Correspondence

Luciane Amorim Santos, Institution: Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Av. Dom João VI, 275–Brotas, Salvador, BA 40290-000, Brasil.
Email: lucianesamorim@bahiana.edu.br

Funding information

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia, Grant/Award Numbers: 3441/2019, 4208/2018; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Grant/Award Numbers: 421342/2018-8, 426196/2018-0

Abstract

The human T-cell lymphotropic virus type-1 (HTLV-1) is associated with severe pathologies, such as HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP), adult T-cell leukemia-lymphoma (ATLL), and infective dermatitis associated with the HTLV-1 (IDH). Interestingly, HTLV-1 infection does not necessarily imply the development of pathological processes and it is unknown why some patients remain asymptomatic carriers (AC). Despite some mutations in the HTLV-1 genome appear to influence the outcome of HTLV-1, there are few studies that characterize molecularly the *hbz* region. This study aimed to perform the molecular characterization of *hbz* gene isolated from patients with different clinical outcomes. A total of 15 sequences were generated and analyzed with 571 sequences previously published. The analyses showed that the R119Q mutation seems to be related to HTLV-1 clinical conditions since the frequency of this HBZ mutation is significantly different in comparison between AC with HAM/TSP and ATLL. The R119Q mutation is possibly a protective factor as the frequency is higher in AC sequences.

KEYWORDS

HTLV-1, molecular characterization, HBZ, sequence

1 | INTRODUCTION

The human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) affects 5–10 million people worldwide.¹ Brazil represents the largest number of HTLV-1 carriers on the American continent, with around 800,000 infected individuals.¹

HTLV-1-infected individuals can develop associated diseases, such as HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP),² adult T-cell leukemia-lymphoma (ATLL),³ and infective dermatitis HTLV-1-associated (IDH).⁴ However, most of the infected

individuals are classified as asymptomatic carriers (AC), although they can present unspecified clinical symptoms and/or psychological impairment, as depression.⁵

The reasons that lead to the development of different clinical outcomes are not fully understood, but genomic alterations may be involved in the pathogenesis. These alterations can be present in both host genome as the genes *GBP2* and *CD40LG*, markers for HAM/TSP and ATLL, respectively,⁶ and at the virus genome as ORF-1 mutations, associated with HAM/TSP development or maintenance of asymptomatic profile.⁷ In this sense, modifications at the genome nucleotide sequence can imply

amino acid changes, which can result in changes in protein function and characteristics. These modifications can interfere in protein activity and binding connections. One example is the Y477H gp21 mutation, associated with the switch of the helix to coil structure, which modifies the secondary structure of the protein.⁸ Depending on where it is located, the alteration can modify posttranslational modification sites, chemical modifications that can alter the protein conformation, localization, and function.⁹

The molecular characterization of the viral genome can provide important information for understanding the different clinical outcomes associated with HTLV-1 infection. Despite that, some regions of the HTLV-1 genome are not yet fully characterized, as the *hbz* region. HBZ is a regulatory protein, important for the persistence of HTLV-1. It is encoded by HTLV-1 bzip domain gene (*hbz*), constantly transcribed in the antisense direction by a promoter present in the 3' LTR¹⁰ and can induce proliferation of infected cells and inhibit apoptosis,¹¹ contributing to cell immortalization and maintenance.

Therefore, this study aimed to evaluate the genetic variation of HTLV-1 *hbz* genomic region from sequences originated from patients with different HTLV-1-associated diseases and the possible influence of this variation for the different clinical conditions.

2 | MATERIAL AND METHODS

This study was performed with sequences already published and 15 new sequences generated by this group. The new sequences were originated from recruited HTLV-1-infected individuals, asymptomatic or with HAM/TSP, registered at *Centro de Atendimento ao Portador de HTLV of Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP)*. The inclusion criteria were individuals older than 18 years and with a confirmed diagnosis of HTLV-1 infection by enzyme-linked immunosorbent assay and western blot. The classification of HAM/TSP was performed by a neurologist according to WHO criteria.¹² This study was approved by the EBMSP Research Ethics Committee (approval number 464.286) and the selected patients signed the informed consent form.

Blood samples were collected and peripheral blood mononuclear cell separation was performed on the same day. The DNA was extracted using the DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions, and the *hbz* region was amplified through polymerase chain reaction (PCR) cycling, according to the protocol previously published.¹³ Amplification was confirmed by agarose gel electrophoresis; PCR products were purified following manufactory instructions (QIAquick PCR Purification Kit; Qiagen) and sequenced by 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) employing the same primers used in amplification.

Raw sequences were used to assemble a consensus sequence for each sample. Then, to increase analytical capacity, the search of *hbz* sequences available at GenBank was performed and the following inclusion criteria were applied: (i) *hbz* sequences isolated from humans and (ii) sequences with clinical information available. Data set analyzed was composed of the new sequences generated in this study and GenBank selected sequences. All sequences were aligned with HTLV-1 reference sequence ATK1 (J02029.1) and all visualization, editing, and assembly were performed using Geneious Prime 2020.1.1.¹⁴

Variant calling analysis was performed with the Geneious Prime annotation tool to find nucleotide and protein variations. Statistical analyses were performed to detect differences in the mutation frequency using GraphPad Prism 8.4.2 (GraphPad Software). A χ^2 test was performed to compare frequency between all groups and identify possible signatures associated with a clinical profile. Then, to identify possible significant variations capable to differentiate AC from patients with HAM/TSP, ATLL, or IDH, a Fisher's exact test was performed. The AC individuals were considered as control compared with the HAM/TSP, ATLL, or IDH group. A p -value ≤ 0.05 was considered statistically significant. To reduce the probability of a Type I error, the χ^2 and Fisher's exact tests were corrected using the Bonferroni method. Thus, the p -value was multiplied by 4, which corresponds to all possible pairwise contrasts.¹⁵

To evaluate if the mutations alter the protein characteristics, the physicochemical profile was performed through NPS@ tool, using the

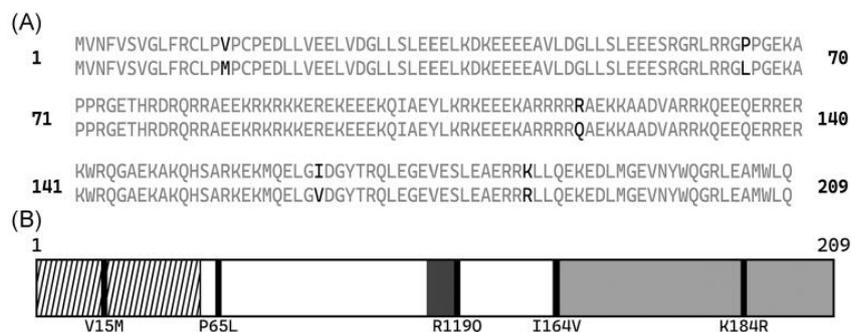


FIGURE 1 HBZ amino acid sequence, mutations, and protein domains. (A) HBZ amino acid sequences. Reference HBZ sequence (ATK1—J02029) on top and mutated HBZ sequence below. The amino acid mutations are highlighted in bold. (B) Location of the amino acid mutations (black line) in regard to the HBZ molecular domain structure. The striped region corresponds to the activation domain, the white corresponds to the central domain, where the basic region 1 is contained (dark gray) and the light gray is the bzip domain

reference ATK1 (J02029.1) as the wild-type. Within the characteristics analyzed for the physicochemical profile, the antigenicity analysis is performed through two different algorithms (A and B). The search for posttranslational modification sites (PMTS) was carried out in the PROSITE database. Both tools used are available on the PRABI platform (<https://prabi.fr>).

To gather the molecular characterization information of the *hbz* gene, an advanced search was performed at PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/advanced/>) and then all information collected was organized in an HTLV-1 Genome Dashboard, performed at the Genially platform (<https://www.genial.ly/>).

3 | RESULTS

A total of 15 sequences were generated from CHTLV patients and 571 sequences previously published were selected. The variant calling analysis, performed at the 627 pb length sequence alignment, identified a total of 349 variations, being 347 classified as single nucleotide variation (SNV) and 2 Indel. From the 347 SNVs, 223 were nonsynonymous and five (V15M, P65L, R119Q, I164V, and K184R) were present with a frequency above 5.0% (Figure 1A).

The individual frequency of variations was observed in the sequences according to the clinical status: 211 from AC, 297 from HAM/TSP, 67 from ATLL, and 11 from IDH. Although the ATLL patients can be classified into four subtypes (acute, lymphoma, chronic, and smoldering), this information was not available at GenBank and therefore were not considered in our analysis. When the mutations frequency was compared between all groups a statistically difference was observed for R119Q, I164V and K184R mutations. The I164V and K184R mutations were higher in ATLL compared with AC and HAM/TSP groups and absent in the IDH group. Interestingly, these mutations were not statistically relevant in the pairwise analysis. In the comparison between AC sequences and clinical groups, the frequency of R119Q mutation was lower in ATLL and HAM/TSP groups compared with the AC group individually ($p = 0.04$ and $p = 0.008$, respectively) (Table 1).

The HBZ amino acid sequence physicochemical analyses showed different alterations caused by the five amino acid changes (Table 2) and none of these mutations altered the PMTS. In addition, the HTLV-1 dashboard was created functioning as an interactive image, presenting *hbz* information of nucleotide and amino acids sequences, evidencing the posttranslational modification sites, protein domains, and motifs described in the literature (available at <https://view.genial.ly/5f2c4536fa6ef00d76820011/interactive-content-htlv-1-genome-dashboard>).

4 | DISCUSSION

HTLV-1 infection does not necessarily imply the development of pathological processes and modifications at the virus genome may be associated with the infection outcome. Here, 586 sequences of the

TABLE 1 Variant frequency of *hbz* mutations and comparison of frequencies between AC and HAM/TSP, ATLL, and IDH

Nucleotide position ^a	Nucleotide change		AA change		Variant frequency		All groups		AC versus HAM/TSP		AC versus ATLL		p Value AC versus IDH	
	AC (n = 211)	AC (n = 211)	HAM/TSP (n = 297)	HAM/TSP (n = 297)	ATLL (n = 67)	ATLL (n = 67)	IDH (n = 11)	IDH (n = 11)	AC versus HAM/TSP	AC versus HAM/TSP	AC versus ATLL	AC versus ATLL	AC versus IDH	AC versus IDH
585	C → T	V15M	8/115 (7%)	0/28 (0%)	8/62 (13%)	0/20 (0%)	8/62 (13%)	0/20 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0.24	0.2
434	G → A	P65L	34/586 (6%)	15/211 (7%)	16/297 (5%)	3/67 (4%)	16/297 (5%)	3/67 (4%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	2.6	1.8
272	C → T	R119Q	121/586 (21%)	62/211 (29%)	48/297 (16%)	9/67 (13%)	48/297 (16%)	9/67 (13%)	2/11 (18%)	2/11 (18%)	2/11 (18%)	2/11 (18%)	0.002^b	0.008^c
138	T → C	I164V	9/137 (7%)	3/41 (7%)	1/71 (1%)	5/20 (25%)	1/71 (1%)	5/20 (25%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0.008^b	0.56
77	T → C	K184R	7/105 (7%)	1/22 (9%)	1/58 (2%)	5/20 (25%)	1/58 (2%)	5/20 (25%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0.01 ^b	1.9

Note: In bold are the values with statistical support

Abbreviations: AA, amino acid; AC, asymptomatic; ATLL, adult T-cell leukemia/lymphoma; HAM/TSP: HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis; IDH, infective dermatitis associated with HTLV-1.

^aBased on ATK1 (J02029.1).

^bStatistical difference (p -value < 0.05) between all groups calculated by χ^2 test and statistical correction by Bonferroni method.

^cStatistical difference (p -value < 0.05) between AC and disease (HAM/TSP and ATLL) calculated by Fisher's exact test and statistical correction by Bonferroni method.

^dCould not calculate; n: corresponds to the total number of analyzed sequences in each study group. The relative frequency of each mutation represents the proportion of mutated sequences in a total number of sequences in the nucleotide position.

TABLE 2 Physicochemical alterations according to HBZ amino acid change

Amino acid change	Increase	Decrease
V15M	–	Hydropathy and antigenicity
P65L	Hydropathy, membrane buried-helix, and antigenicity B	Hydrophilicity, flexibility, and antigenicity A
R119Q	Hydropathy and membrane buried-helix	Hydrophilicity, accessibility, and antigenicity
I164V	Hydrophilicity and antigenicity	Hydropathy and membrane buried-helix
K184R	–	Hydropathy, flexibility, accessibility, and antigenicity

hbz region from HAM/TSP, ATLL, IDH, and AC were analyzed and the R119Q mutation seems to be important to the virus activity and establishment of HTLV-1-associated diseases.

The R119Q variation may be crucial for understanding the clinical differentiation along with host factors and other virus mutations.^{6,7} The R119Q is present in all clinical groups, although is more frequent in AC sequences. This could indicate that this variation may be a protective factor, maybe delaying the clinical progression.

Regarding the I164V and K184R mutations, it is important to consider the statistical difference with caution. The differences observed between all groups can be caused by the absence of these mutations in the IDH group. It is not possible to confirm that these mutations are not found in the IDH individuals due to the small number of sequences available. However, these mutations were more frequent in ATLL and rare in HAM/TSP.

The P65L, R119Q, I164V, and K184R mutations were observed in sequences generated from different studies, clinical status, and geographic regions, minimizing the sample, sequencing strategy, and location biases. Although the V15M mutation was only detected in HAM/TSP sequences that were originated from the same study,¹⁶ AC sequences was also included in the analyses. To confirm this possible bias, the V15M mutation needs to be more extensively studied since only 19% of the analyzed sequences present this site information.

To better understand how the mutations may be able to alter the proteins, the physicochemical alterations of the five non-synonymous mutations were analyzed and it was observed that these alterations can impact the exposure of some protein regions and their function. Also, to assess whether the mutations could alter important HBZ function, a search for motifs in the literature was performed and five were observed: two LXXLL-like motifs (VDGLL → HBZ: 27-31 AA and LDGLL → HBZ: 47-51 AA),¹⁷ KRKRKK (HBZ: 87-92 AA), RRRRR (HBZ: 115-119 AA),¹⁸ and EQERRE (HBZ: 134-139 AA).¹⁹ Also, the HBZ protein is divided into three major regions called domains: activation domain (AD: 1-60 AA), central domain (CD: 61-163 AA), and bzip domain (HBZ: 164-209 AA)²⁰ (Figure 1B).

Considering that the motifs found have an important role in the HBZ protein functions, a comparison between motif and mutation positions was made. The R119Q alteration is located in the last amino acid of the RRRRR motif, which along with the KRKRKK motif and the DNA-binding domain (DBD) are nuclear localization signals (NLS) located at the central domain, explaining the role of the motifs in the nuclear translocation of the

HBZ protein.¹⁸ It is necessary at least two NLSs to promote nuclear translocation since DBD seems to be inefficient to retain HBZ in the nucleus, where this protein interacts with cAMP response element-binding 2 (CREB-2) and members of the JUN protein family, as JUN-B.^{10,21} This mutation may impact the nuclear translocation of the protein and, consequently, interfere with the interactions that occur at the nucleus once this alteration modifies some physicochemical properties, which may be essential for the translocation process.

An important scenario that can also be interfered with R119Q mutation is the HBZ-Tax correlation. These two proteins do not interact directly, but HBZ can interfere with Tax-dependent viral transcription through inhibition of the binding between Tax and transcription sites, as CREB and TxRE III. This inhibition occurs by the binding of HBZ itself to the transcriptional sites, which occur at the nucleus¹⁰ and could result in a reduction of viral transcriptional activity.

The V15M alteration is located at the AD, important to the transcriptional activity and also responsible for interacting with other cellular proteins, as interferon regulatory factor 1 (IRF-1), which inhibits apoptosis, and downmodulating the classical NF-κB pathway inhibiting DNA binding by p65 (modulating the transcription of genes activated by NF-κB pathway).^{18,22,23}

Among the five mutations described here, the I164V and K184R are located at the bzip domain. HBZ interacts with CREB2 through this domain, which results in the downregulation of CREB2-dependent transcription.¹⁰ Also, it interacts with protein p65, repressing the p65-induced transcription and inhibiting the binding of p65 to target sites in the DNA, resulting in the inhibition of the classical pathway of Tax-mediated NF-κB.²² Although the P65L mutation was not associated with clinical profiles, it is located at the CD which is known to be important to some functions as the HBZ interaction with FoxO3a, being responsible for apoptosis inhibition. In addition, it is possible that I164V, K184R, and P65L affect HBZ functions, once they alter some physicochemical properties, as hydrophilicity, antigenicity, hydropathy, membrane buried-helix, flexibility, and accessibility.

The results presented here suggest that one significant non-synonymous mutation identified in the HTLV-1 *hbz* genomic region, R119Q, located in a motif region, can possibly modify HBZ protein functions. This mutation can also possibly be a disease development protective factor. However, to investigate better the contribution of

these mutations to the HTLV-1 outcome, it is necessary to conduct functional studies, analyzing the performance of HBZ in its already described function.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank all the patients and the team from Centro de Atendimento ao Portador de HTLV (CHTLV) of Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública. This research study was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), process numbers 426196/2018-0 and 421342/2018-8. MSC was supported by a scholarship from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia, Iniciação Científica FAPESB, process numbers 4208/2018 and 3441/2019.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare that there are no conflict of interests.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Luciane Amorim Santos and Fernanda Khouri Barreto conceived the study design and supervised the project; Thessika Hialla Araujo and Bernardo Galvão-Castro performed the patient clinical evaluation, and sample and clinical data collection; Marina Silveira Cucco, Ricardo Khouri, and Laise Eduarda Paixão de Moraes performed DNA extraction, PCR, and sequencing; Marina Silveira Cucco performed database search, sequencing alignment, and variant identification; Marina Silveira Cucco, Luciane Amorim Santos, Filipe Ferreira de Almeida Rego, and Felipe de Oliveira Andrade performed molecular characterization (physicochemical profile, PTMS analysis, motif search); Luana Leandro Gois performed the statistical analysis; Laise Eduarda Paixão de Moraes and Marina Silveira Cucco created the HTLV-1 interactive dashboard; Marina Silveira Cucco, Luciane Amorim Santos, and Fernanda Khouri Barreto wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The sequences from the data set used and analyzed in this study are available in GenBank at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. The GenBank accession numbers of the new HTLV-1 hbz sequences analyzed are as follows: MW288041-MW288055. The GenBank accession numbers for the sequences included in the analysis are as follows: AB127436-AB127579, AB154777-AB154817, AB158146-AB158191, AB158266-AB158276, AB513134, AF042071, AY780366-AY780391, DQ065781-DQ065794, KF053876-KF053885, KF797897, KF797907, KF797910, KF797912, KM436104-KM437632, KU214243, KY007244-KY007274, L36905, LC192500-LC192536, M37301, MF158987-MF159019, MH392265, MH395864, MH399767-MH399769, MN781149, MN781150, MN781152-MN781156 and U19949.

ORCID

Marina Silveira Cucco  <https://orcid.org/0000-0002-3062-0273>
Laise Eduarda Paixão de Moraes  <https://orcid.org/0000-0001-9095-5860>

Felipe de Oliveira Andrade  <https://orcid.org/0000-0003-0970-7005>

Ricardo Khouri  <https://orcid.org/0000-0001-5664-4436>

Bernardo Galvão-Castro  <https://orcid.org/0000-0002-0644-6471>

Thessika Hialla Almeida Araujo  <https://orcid.org/0000-0002-0420-8082>

Filipe Ferreira de Almeida Rego  <http://orcid.org/0000-0002-6102-6672>

Luana Leandro Gois  <https://orcid.org/0000-0002-7538-3558>

Fernanda Khouri Barreto  <https://orcid.org/0000-0002-0088-9036>

Luciane Amorim Santos  <http://orcid.org/0000-0003-0261-3495>

REFERENCES

- Gessain A, Cassar O. Epidemiological aspects and world distribution of HTLV-1 infection. *Front Microbiol.* 2012;3(NOV):1-23. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00388>
- Osame M, Usuku K, Izumo S, et al. Htlv-I associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet.* 1986;327(8488):1031-1032. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(86\)91298-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(86)91298-5)
- Uchiyama T, Yodoi J, Sagawa K, Takatsuki K, Uchino H. Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood.* 1977; 50(3):481-492. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/301762>
- Blattner W, LaGrenade L, Hanchard B, Fletcher V, Cranston B. Infective dermatitis of Jamaican children: a marker for HTLV-I infection. *Lancet.* 1990;336(8727):1345-1347. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(90\)92896-P](https://doi.org/10.1016/0140-6736(90)92896-P)
- Galvão-Castro AV, Boa-Sorte N, Kruschewsky RA, Grassi MFR, Galvão-Castro B. Impact of depression on quality of life in people living with human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) in Salvador, Brazil. *Qual Life Res.* 2012;21(9):1545-1550. <https://doi.org/10.1007/s11136-011-0066-6>
- Fukutani ER, Ramos PIP, Kasprzykowski JI, et al. Meta-analysis of HTLV-1-infected patients identifies CD40LG and GBP2 as markers of ATLL and HAM/TSP clinical status: two genes beat as one. *Front Genet.* 2019; 10(November):1-9. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.01056>
- Barreto FK, Khouri R, Rego FFA, et al. Analyses of HTLV-1 sequences suggest interaction between ORF-I mutations and HAM/TSP outcome. *Infect Genet Evol.* 2016;45(3):420-425. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.08.020>
- Mota-Miranda ACA, Barreto FK, Baptista E, et al. Molecular study of HBZ and gp21 human t cell leukemia virus type 1 proteins isolated from different clinical profile infected individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2013;29(10):1370-1372. <https://doi.org/10.1089/aid.2013.0015>
- Dissinger N, Shkriabai N, Hess S, Al-Saleem J, Kvaratskhelia M, Green PL. Identification and characterization of HTLV-1 HBZ post-translational modifications. *PLOS One.* 2014;9(11):1-10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112762>
- Gaudray G, Gachon F, Basbous J, Biard-Piechaczyk M, Devaux C, Mesnard J-M. The complementary strand of the human T-cell leukemia virus type 1 RNA genome encodes a bZIP transcription factor that down-regulates viral transcription. *J Virol.* 2002;76(24):12813-12822. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.24.12813-12822.2002>
- Mitobe Y, Yasunaga JI, Furuta R, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP Factor RNA and protein impart distinct functions on t-cell proliferation and survival. *Cancer Res.* 2015;75(19):4143-4152. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0942>
- World Health Organization. VIRUS DISEASES: Human T lymphotropic virus type I, HTLV-I = MALADIES À VIRUS: Virus T-lymphotrope humain type I, HTLV-I. *Weekly Epidemiological Record = Relevé épidémiologique hebdomadaire.* 1989;64(49): 382-383. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/227401>

13. Borba MMN, Farre L, Bittencourt AL, et al. Assessment of genetic diversity of HTLV-1 ORF-I sequences collected from patients with different clinical profiles. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2019;35(9):881-884. <https://doi.org/10.1089/aid.2019.0127>
14. Kearse M, Moir R, Wilson A, et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*. 2012;28(12):1647-1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>
15. MacDonald PL, Gardner RC. Type I error rate comparisons of post hoc procedures for I × J chi-square tables. *Educ Psychol Meas*. 2000;60(5):735-754. <https://doi.org/10.1177/00131640021970871>
16. Nozuma S, Matsuura E, Kodama D, et al. Effects of host restriction factors and the HTLV-1 subtype on susceptibility to HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Retrovirology*. 2017;14(1):1-11. <https://doi.org/10.1186/s12977-017-0350-9>
17. Clerc I, Polakowski N, André-Arpin C, et al. An interaction between the human T cell leukemia virus type 1 basic leucine zipper factor (HBZ) and the KIX domain of p300/CBP contributes to the down-regulation of tax-dependent viral transcription by HBZ. *J Biol Chem*. 2008;283(35):23903-23913. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803116200>
18. Hivin P, Frédéric M, Arpin-André C, et al. Nuclear localization of HTLV-1 bZIP factor (HBZ) is mediated by three distinct motifs. *J Cell Sci*. 2005;118(7):1355-1362. <https://doi.org/10.1242/jcs.01727>
19. Hivin P, Arpin-André C, Clerc I, Barbeau B, Mesnard JM. A modified version of a Fos-associated cluster in HBZ affects Jun transcriptional potency. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(9):2761-2772. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl375>
20. Raval GU, Bidoia C, Forlani G, Tosi G, Gessain A, Accolla RS. Localization, quantification and interaction with host factors of endogenous HTLV-1 HBZ protein in infected cells and ATL. *Retrovirology*. 2015;12(1):1-15. <https://doi.org/10.1186/s12977-015-0186-0>
21. Basbous J, Arpin C, Gaudray G, Piechaczyk M, Devaux C, Mesnard JM. The HBZ factor of human T-cell leukemia virus type I dimerizes with transcription factors JunB and c-Jun and modulates their transcriptional activity. *J Biol Chem*. 2003;278(44):43620-43627. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307275200>
22. Zhao T, Yasunaga J, Satou Y, et al. Human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor selectively suppresses the classical pathway of NF-κB. *Blood*. 2009;113(12):2755-2764. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-06-161729>
23. Mukai R, Ohshima T. Dual effects of HTLV-1 bZIP factor in suppression of interferon regulatory factor 1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;409(2):328-332. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.05.014>

How to cite this article: Cucco MS, de Moraes LEP, de Oliveira Andrade F, et al. Molecular characterization of HTLV-1 genomic region *hbz* from patients with different clinical conditions. *J Med Virol*. 2021;93:6418-6423. <https://doi.org/10.1002/jmv.27005>

VI.1.2. Subseção 2: Genotipagem e identificação de mutações em LTR de amostras do Centro de Atendimento ao Indivíduo com HTLV-1 (CHTLV)

Nesta subseção estão os resultados relativos ao segundo objetivo secundário, sobre as mutações em LTR do HTLV-1 e o possível impacto nos sítios de ligação dos fatores de transcrição.

Após a seleção dos pacientes do CHTLV, 28 amostras (entre AC e HAM/TSP) foram submetidas a PCR para amplificação da região LTR do HTLV-1. Das 28, apenas 15 tiveram amplificação confirmada por visualização em gel de agarose, sendo 13 provenientes de pacientes com HAM/TSP e dois AC. A não amplificação das amostras pode ocorrer por alguns motivos, como carga proviral muito baixa ou degradação da amostra.

As 15 amostras seguiram para purificação e sequenciamento. Foram obtidas 14 sequências de LTR, com coberturas diferentes: oito sequências caracterizadas como de baixa cobertura (145pb-248pb) e seis caracterizadas como média e alta cobertura (481pb-651pb). Além das sequências do CHTLV, foram selecionadas sequências do banco de dados.

A partir dos resultados da análise filogenética, todas as sequências do CHTLV foram classificadas com Cosmopolita Transcontinental (HTLV-1aA) como mostrado na figura 8, enquanto as sequências do banco de dados se dividiam em outros subtipos além do HTLV-1aA (dados não mostrados). Sendo assim, apenas as sequências com a mesma classificação das geradas por este trabalho (HTLV-1aA) foram incluídas nas análises seguintes, totalizando 165 sequências (14 do CHTLV e 151 do banco de dados).

Depois de alinhar e fazer a chamada de variante, no conjunto de sequências do CHTLV foram encontradas nove variações de nucleotídeo únicos (*single nucleotide variants* – SNVs), uma deleção e uma inserção. No conjunto de sequências do banco de dados (GenBank) foram encontradas 202 mutações. Comparando as mutações entre os dois grupos de sequências, percebe-se que 9 das 11 mutações do CHTLV também estão presentes nas sequências do banco de dados.

Para avaliar se alguma das mutações é responsável por mudar os sítios de ligação de fatores de transcrição (*transcription factor binding site* - TFBS), criando ou deletando estes sítios, todas as sequências foram revisadas para identificação de TFBS. As oito sequências de baixa cobertura (devido ao tamanho da sequência) do CHTLV foram excluídas dessa análise. Foram mapeados 32 sítios no total, sendo quatro novos sítios, e foi notado a ausência de cinco sítios, devido às mutações (tabela 2). Uma das mutações (G418A) encontra-se presente na região de um sítio de ligação Sp1, o que causou a deleção deste sítio, criando no lugar um novo sítio ER. O mesmo mapeamento, para as sequências do banco de dados, encontrou 184 TFBS.

Desse total, 35 eram novos sítios e 25 estavam ausentes devido às mutações. Nenhuma mudança similar foi encontrada entre os diferentes conjuntos de dados.

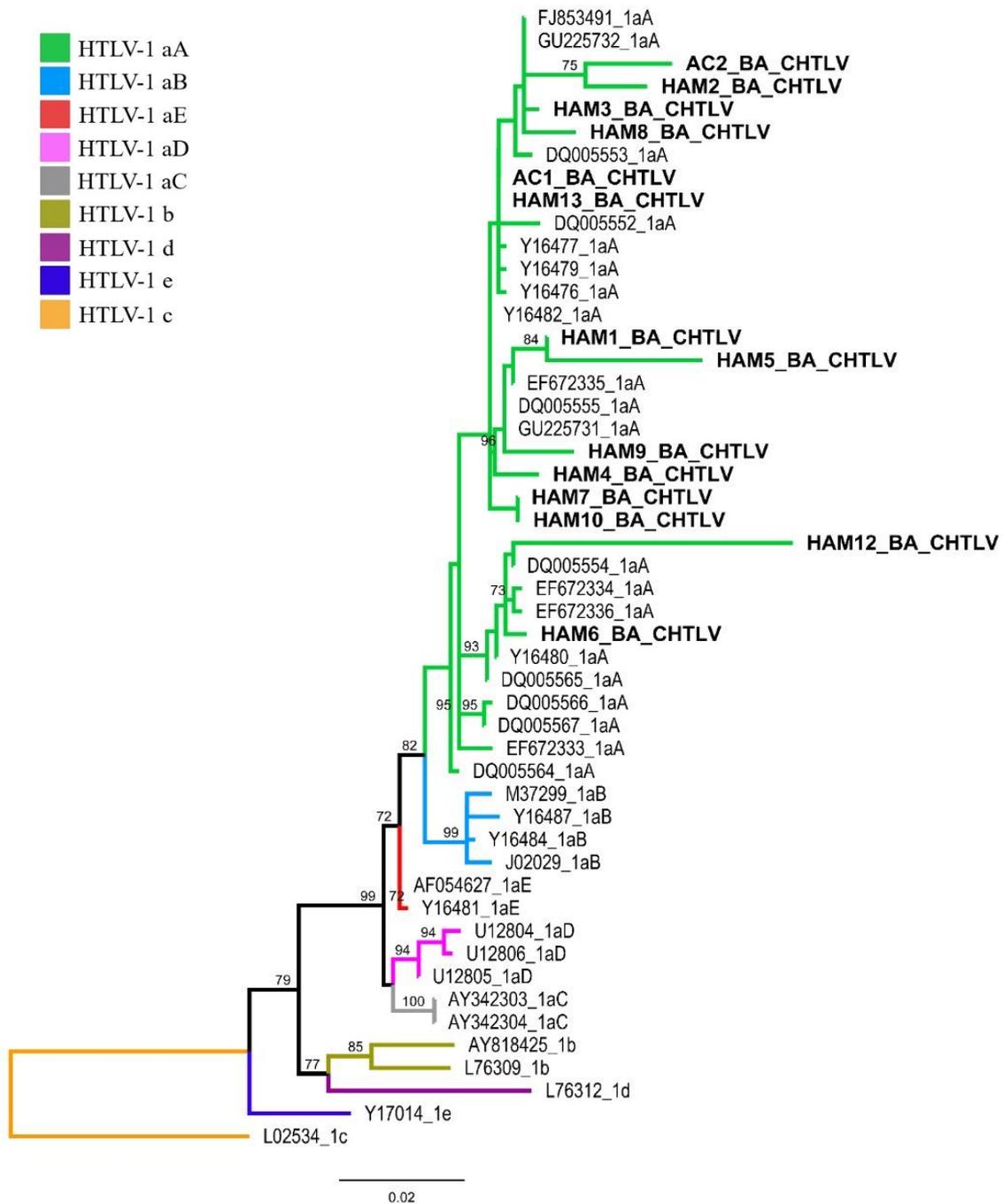


Figura 1: Árvore de Máxima Verossimilhança enraizada do HTLV-1. Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança do HTLV-1 baseada na região LTR com 760pb contendo 14 novas sequências (nomes em negrito) e 36 sequências referências. Sequência L02534 (Isolado Mel 5) foi usada como grupo externo para enraizar a árvore.

Tabela 1: Frequência das modificações dos sítios de ligação dos fatores de transcrição, causadas pelas mutações em seis sequências de LTR do CHTLV.

<i>Posição da Mutação</i>	<i>Mudança</i>	<i>TFBS (TFSCAN)</i>	<i>Mudança do TFBS</i>	<i>CHTLV (n=6)</i>
178	G → A	TFIID (173-178)	Adição	1/5
275	T → C	ATF (270-275)	Deleção	1/6
331	C → T	gammaCAC2 (227-331)	Deleção	1/6
331	C → T	CACCC-binding factor (327-331)	Deleção	1/6
331	C → T	CACCC-binding factor (331-335)	Deleção	1/6
418	G → A	Sp1 (418-424)	Deleção	1/6
418	G → A	ER (418-424)	Adição	1/6
475	C → T	CACCC-binding factor (472-476)	Adição	1/6
477	C → T	C-Est-2 (477-482)	Adição	1/6

TFBS: *transcription factors binding sites* (sítios de ligação de fatores de transcrição).

VI.2. Seção 2: *Mapping variants in HTLV-1 genome to analyze their impacts on the HAM/TSP development: a systematic review*

Nesta subseção estão descritos os resultados relativos ao terceiro objetivo secundário, revisão sistemática sobre as mutações no genoma do HTLV-1 que podem estar associadas a HAM/TSP e que já foram descritas na literatura previamente.



Mapping variants in HTLV-1 genome to analyze their impacts on the HAM/TSP development: a systematic review

- 1 **Raissa Frazão Campos^{1,†}, Dhara Isabella Barreto de Souza Silva^{2,†}, Felipe de Oliveira Andrade¹,**
 2 **Jéssica Oliveira de Souza Nascimento¹, Carolina Souza Santana¹, Laura Nascimento Barreto²,**
 3 **Marina Silveira Cucco^{3,4}, Melina Mosquero Navarro Borba⁵, Davi Tanajura Costa¹, Ricardo**
 4 **Khouri^{3,4,6,*}, Fernanda Khouri Barreto¹ and Luciane Amorim Santos^{2,3,4}**

5 ¹ Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, Brazil

6 ² Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, Brazil

7 ³ Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Brazil

8 ⁴ Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina da Bahia, Universidade
 9 Federal da Bahia, Salvador, Brazil

10 ⁵ Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

11 ⁶ Rega Institute for Medical Research, KU Leuven, Leuven, Belgium

12 † Equal Contribution & First authorship

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29 *** Correspondence:**

30 Ricardo Khouri, ricardo.khouri@fiocruz.br;

HTLV-1 mutations and HAM/TSP development31 **Abstract**

32 The reasons that lead some individuals affected by the Human T Lymphotropic Virus Type 1
33 (HTLV-1) to develop HAM/TSP are still unclear. To better understand the viral genetic factors that
34 may be associated with the development of HAM/TSP, this study aims to evaluate the impact of
35 HTLV-1 genome mutations on the development of this disease through a systematic review. This
36 review followed the PRISMA guidelines and was registered in the PROSPERO database. The search
37 for articles was performed in PMC, PubMed, Lilacs, SciELO and Embase databases using the
38 following search algorithm: (("Human T lymphotropic virus 1" OR "HTLV-1") AND ("Paraparesis,
39 Tropical Spastic" OR "HAM/TSP" OR "HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic
40 paraparesis") AND ("Mutation" OR "Genetic Variation" OR "Sequenc*")). From the 544 articles
41 found in the search, 11 were selected according to the pre-defined inclusion and exclusion criteria.
42 The mutations possible related to the disease progression were detected in HBZ (S9P, T95I, R112C,
43 V15M, I167V and K184R), ORF-I (P45L, S69G, R88K, C39Y and P86S) and *env* (S72G and
44 N93D). The data collected and analyzed here indicate that mutations in the HTLV-1 genome could
45 play an important role in chronic inflammatory state and may be related to the development of
46 HAM/TSP.

47 **Keywords:** HTLV-1, mutation, genome, HBZ, ORF-1, *env*.

HTLV-1 mutations and HAM/TSP development

48 **1 Introduction**

49 The Human T Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1) was the first human retrovirus described. It is
50 estimated that 5 to 10 million people worldwide are infected by this virus, being the highest
51 prevalence in Japan, Africa and Brazil (1–3). This virus transmission occurs in three different ways:
52 vertical transmission, mainly through breastfeeding; unprotected sexual contact; and contact with
53 infected blood products 5).

54 Several life-threatening and severe diseases have been associated with the HTLV-1 infection,
55 including the HTLV-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) (6), adult T-cell
56 leukemia/lymphoma (ATLL) (7), infectious dermatitis (IDH) (8), HTLV-1 associated arthropathy (9)
57 and HTLV-1 associated uveitis (10). Among these HTLV-1-associated diseases, HAM/TSP has a
58 great impact on the patient's quality of life as it is a chronic degenerative neurological disease that
59 affects the central nervous system (CNS) (6, 11). Clinically manifested by slow progressive spastic
60 paraparesis, neurogenic bladder, less visible sensory signals, in addition to muscle weakness with
61 consequent gait impairment, sexual function disorders, low back pain, and intestinal dysfunctions
62 (12–14). This pathology affects at least 2% of HTLV-1 infected individuals and is more frequent in
63 women with a late diagnosis between the 4th and 5th decade of life (15).

64 It is still unknown which specific factors determine the onset and progression of HAM/TSP. Some
65 studies have suggested that environmental and host genetic factors, such as polymorphisms in Human
66 Leukocyte Antigen (HLA), seem to be associated with the development of the disease (16). Other
67 studies suggested that virus genetic variations also can be important for understanding the associated
68 pathogenesis, as specific viral nucleotides could be related to different proviral load and clinical
69 manifestations (17, 18).

70 The HTLV-1 has a genomic structure common to other retroviruses, composed of the structural
71 genes *gag*, *pol*, and *env* and two flanking regions at the 5' and 3' ends called as long terminal repeats
72 (LTR) (19). Additionally, to these regions, there is a sequence near the 3' end, known as the pX
73 region, that contains four open reading frames (ORF) responsible for encoding accessory proteins: (i)
74 ORF-I, which encodes p12 and p8; (ii) ORF-II, that results in the production of p13 and p30; (iii)
75 ORF-III that encode Rex; and (iv) ORF-IV that result in Tax protein. In addition, the HTLV-1
76 encodes an antisense mRNA transcribed from the LTR 3' that generates the HTLV-1 leucine basic
77 zipper protein (HBZ). These accessory proteins have important functions in the pathogenesis process
78 of HTLV-1 infection and mutations in the genome could impact the disease outcome (17).

79 Notwithstanding, there is no grading consensus regarding which and how the HTLV-1 mutations
80 indeed influence the HAM/TSP outcome. To better understand the possible HTLV-1 genetic factors
81 that may be associated with the development of HTLV-1-associated diseases, this study aims to
82 evaluate the possible impact of mutations in the HTLV-1 genome on HAM/TSP development,
83 through a systematic review.

84 **2 Materials and Methods**

85 This systematic literature review was conducted following the guidelines of the Preferred Reporting
86 Items for Systematic Reviews and Meta-analyses (PRISMA®). A systematic search for studies

HTLV-1 mutations and HAM/TSP development

87 addressing HTLV-1 mutations that could be important for the HAM/TSP development was carried
88 out on the following databases: PMC, PubMed, Lilacs, Embase, and SciELO.

89 The search was performed in October 2021, using an algorithm composed by Descritores em
90 Ciências da Saúde and subjects from the Medical Subject Headings database (DeCS/MeSH):
91 ("Human T lymphotropic virus 1" OR "HTLV-1") AND ("Paraparesis, Tropical Spastic" OR
92 "HAM/TSP" OR "HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis") AND ("Mutation"
93 OR "Genetic Variation" OR "Sequenc*"). All titles found in the databases were crossed to identify
94 possible duplicate studies.

95 At first, the title and abstract of all articles found in the databases were read for the selection process,
96 following the inclusion criteria: (a) original articles in Portuguese and/or English; (b) articles that
97 address mutations in the HTLV-1 genome possibly associated with the development of HAM/TSP
98 and (c) articles published since 2011 until October 2021. Subsequently, the complete reading of the
99 articles included was performed and the following exclusion criterion was applied: (a) articles that
100 only address gene expression.

101 Data extraction was performed by collecting the following information from each included study: (a)
102 basic information (title, principal author, year, objectives), (b) geographic region of the study, (c)
103 study population, (d) sample type (e) sequencing methodology, (f) HTLV-1 genes analyzed, (g)
104 HAM/TSP possible associated mutation, (h) consequence of mutation (protective or developmental
105 mutation), (i) main conclusion of the article. All data collected from the articles were tabulated using
106 Microsoft Excel®.

107 The search, selection, and evaluation of the article were performed independently by two authors
108 (R.F.C and D.I.B.S.S), and differences were resolved by consulting all authors. The Joanna Briggs
109 Institute Critical Appraisal Checklist for Analytical Cross-Sectional Studies and Cohort Studies were
110 used to measure the study quality. The studies were classified as: low risk of bias if 70% or more
111 answers in the checklist were "yes"; medium risk of bias, if 50-69%; and high risk of bias if 50% or
112 less. This study was registered with the International Prospective Register of Systematic Reviews
113 (PROSPERO) under number CRD42021270326.

114 **3 Results**

115 The systematic literature search found 544 articles: 54 were available in PubMed, 146 in Embase, 12
116 in SciELO, four studies in Lilacs, and 328 articles in PMC. Of these, 132 were duplicates and 394
117 articles were excluded after reading the titles and abstracts. Subsequently, two articles were excluded
118 after reading the complete manuscript. Thus, 11 articles were included in this systematic review and
119 all presented a low risk of bias based on The Joanna Briggs Institute Critical Appraisal Checklist
120 quality evaluation (Figure 1).

121 The studies selected by this systematic review have been published in the last nine years. Three
122 studies were published before 2014, six studies were published between 2015 to 2019, and two of
123 them were published in 2021. Brazil was the country with the most published articles, with a total of
124 eight articles. Nine articles included were cross-sectional studies and two were cohort studies. The
125 articles used blood samples from: Brazil (17, 20, 21, 22, 23, 24, 25) Japan (18), Argentina (26), USA
126 (27), France (17), Caribbean (17), Africa (17) and North America (17).

127 All studies used proviral DNA from peripheral blood mononuclear cell samples. The DNA
128 sequencing methods were used in most (n=10) studies to analyze the genetic information and identify

HTLV-1 mutations and HAM/TSP development

129 mutations. The Sanger sequencing method was used in eight studies, followed by Illumina and Ion
 130 Torrent in one study each. One article used Digital PCR to identify the mutations. The HTLV-1
 131 genome regions analyzed by a greater number of studies were *env* (n=5) (18, 20, 21, 22, 24), *tax*
 132 (n=4) (18, 24, 27, 28) and ORF-I (n=3) (17, 18, 23) *hbx* (n=3) and LTR (n=3) (24, 26, 28). Only two
 133 articles presented results from the HTLV-1 complete genome evaluation (18, 24) (Table 1).

134 All articles analyzed samples from HTLV-1-infected individuals classified as asymptomatic carriers
 135 (AC) compared with HAM/TSP patients. The study population varied between each article. The
 136 largest population was composed of 211 patients (18) and the lowest analyzed 10 patients (20, 21).
 137 Four studies included patients belonging to other clinical profiles: one included 4 ATLL patients
 138 (26); one included 7 ATLL patients and 5 individuals with IDH (24); one study included 6 ATLL and
 139 6 IDH patients (23); and the last one included 67 ATLL and 11 IDH GenBank sequences in the
 140 analyses (25). Of note, some studies included sequences available at GenBank as a strategy to
 141 amplify the population size to obtain a higher statistical power of the analyses (17, 20, 23, 24, 25).

142 Here we analyzed the mutations found in HAM/TSP patients compared with asymptomatic carriers
 143 (AC). Among all the studies, 46 non-synonymous mutations were identified in HAM/TSP sequences.
 144 These mutations are distributed in the following genes: *gag* (n=1), *pro* (n=1), *pol* (n=2), *env* (n=11),
 145 *tax* (n=3), ORF-I (n=16), p30 (n=4) and *hbx* (n=9). Besides that, nine point mutations in *tax* (n=8)
 146 and *gag* (n=1) were described, but no nucleotide position of the variations was given by the author.
 147 In addition, five mutations were described in the LTR region (Table 1). Although all articles describe
 148 some mutations, only four of them associate these alterations with disease development (17, 22, 23,
 149 25) through statistical analysis, such as Chi-square test (22, 25) and Fisher's exact test (17, 23).

150 All mutations identified by the articles located in the genes *gag* (T106I), *pro* (G201D), *pol* (Q323H,
 151 Q446R), *tax* (A221V, S304N, D264G), and p30 (L72R, D140G, A149T, and R37C) did not show a
 152 possible association with HAM/TSP. The authors of the studies described that these genetic
 153 variations could not be statistically associated with the development of HAM/TSP due to the reduced
 154 number of recruited patients and the low number of sequences generated, but some mutations may
 155 affect the protein function and have a role in disease development.

156 Only three regions (*env*, ORF-I and *hbx*) presented mutations with a statistical supported association
 157 with HAM/TSP development. The ORF-I region presented the highest number of variations (n=5)
 158 associated with HTLV-1 infection outcome. Barreto *et al.* 2016 reported three mutations (P45L,
 159 S69G, and R88K) that were found in higher frequency in HAM/TSP patients and could be associated
 160 with the disease development (17). At the same time, Borba *et al.* 2019 found two important ORF-I
 161 variations (C39Y and P86S) presented exclusively in HAM/TSP patients, suggesting an association
 162 with this disease (23). Two HBZ mutations (V15M and R119Q) were reported as related to
 163 HAM/TSP development or protection. Among these, the V15M attracts attention for having been
 164 observed exclusively in HAM/TSP sequences (18, 25). The R119Q variation was found more
 165 frequently in asymptomatic patients with statistical support, being a possibly protective marker for
 166 disease development. In the *env* region, Socorro de Almeida Viana *et al.* 2018 describe that the S72G
 167 and N93D alteration in the gp46 protein is related to motor symptoms and/or HAM/TSP development
 168 indicating a possible link to HAM/TSP (22). It is important to highlight that although the ORF-I
 169 mutations P34L, F61L, D26N, and R83C, and LTR variations T8522C, G8545A, and A8403G were
 170 not associated with HAM/TSP; it was associated, with statistical support, with low proviral load, a

HTLV-1 mutations and HAM/TSP development

171 protection marker (17, 26). All HTLV-1 mutations possibly associated with HAM/TSP development
172 are represented in figure 2.

173 4. Discussion

174 One of the main challenges in the HTLV-1 field is to elucidate crucial factors, such as the role of
175 viral genetic mutations/polymorphisms (29), involved in the pathogenesis of the life-threatening and
176 non-treatable HTLV-1 associated diseases, such as HAM/TSP. Although HTLV-1 was first identified
177 in 1980 and since then several advances in genome sequencing technologies and bioinformatic
178 analysis were developed, only 11 studies published in international journals, were available for this
179 systematic review. Of note, only two selected studies have sequenced complete viral genomes, and
180 most of the studies included here, mainly the ones that showed an association between mutations and
181 clinical profile, needed to include sequences already available at GenBank (17, 21, 23–25) showing a
182 worldwide limited effort to generate enough new HTLV-1 genomes. Thus, the low number of
183 available publications using only partial HTLV-1 genomes is a characteristic of the field. This makes
184 it extremely difficult to understand the possible role of mutation contribution to HTLV-1-associated
185 disease development, justifying the need for this systematic review to summarize the current
186 findings, identify potential genetic markers, and support the urgency of new HTLV-1 genomic data.
187 Here, it is possible to observe that important mutations in the *env* (gp46 and gp21), ORF-I (p8 and
188 p12), *hbx* and LTR genomic regions seem to contribute to HAM/TSP development and/or proviral
189 load.

190 The *env* gene codifies two proteins located on the surface (envelop) of the virus important for the
191 initiation of viral infection: gp46 and gp21. These proteins play a crucial role in binding the human
192 cell receptor that is required for viral entry (30). This is an especially important gene since mutations
193 in this region can favor or hinder the binding and post-binding event during virus penetration and
194 may represent a target for HTLV-1 vaccines. Specific B cells recognize these proteins and can
195 develop into plasma cells that produce antibodies against HTLV-1 (31, 32). Thus, the identification
196 of mutations in the *env* gene can be useful for the development of specific and effective vaccines
197 against HTLV-1, in addition to helping the understanding of gaps in the HTLV-1 transmission field.
198 Here, we observed that two articles found the same mutation in gp46 (S72G), in which the mutated
199 allele was associated with a change in HLA binding score. Mota-Miranda *et al.* 2013a identified this
200 variation exclusively in HAM/TSP patients but could not statistically associate this variation directly
201 to the disease development due to the reduced number of recruited patients. Interestingly, Socorro de
202 Almeida Viana *et al.* 2018 showed that this mutation was found in patients not yet classified as
203 HAM/TSP, but with important neurological symptoms (20, 22). When analyzing the results of these
204 two articles together, it is possible to propose that this mutation could be a potential biomarker for the
205 clinical progression of HAM/TSP. Furthermore, Socorro de Almeida Viana *et al.* 2018 also described
206 in gp46 the N93D mutation, in which the presence was observed in oligosymptomatic patients with
207 pain and sensitivity, but non-HAM/TSP classified. Although little is known about this mutation, the
208 N93D location involves a large segment of the region that codifies gp46 and it could impact the
209 receptor bind domain, the functional domain, and other characteristics of this region (22). Also,
210 Mota-Miranda *et al.* 2013b found one mutation in gp21 (Y477H) and suggests that it can be a
211 signature of individuals from Salvador, Bahia, Brazil because it is not found in other gp21 sequences
212 available in GenBank from Brazilian HTLV-1-infected individuals. It is suggested that more studies
213 are needed to investigate the possible impacts of this mutation and if this is present or not in other
214 HTLV-1 infected individuals from different geographical regions (21).

HTLV-1 mutations and HAM/TSP development

215 In addition to these mutations in the *env* gene, two studies identified mutations in the ORF-I region
 216 (p8 and p12) and suggested that some of these could affect the proviral load and the disease outcome,
 217 since both of them are important to the viral persistence and have important functions (17, 23). The
 218 p8 protein originates from the cleavage of p12 protein between amino acid position 29 and 30 and the
 219 equilibrated amount of both proteins is important to the persistent infection of HTLV-1(33,34). The
 220 p12 expression is known to increase levels of intracellular calcium and to impact function and surface
 221 expression of major histocompatibility complex class I (MHC I) molecules among other functions
 222 (35–37) and p8 induce formation of cellular conduits where this protein is transferred from one cell
 223 to another increasing cell to cell contact and consequently HTLV-1 transmission (38). Borba *et al.*
 224 2019 reported two mutations (C39Y and P86S) that were presented exclusively in HAM/TSP
 225 patients. The P86S mutation was also found only in the HAM/TSP sequences from GenBank,
 226 supporting a possible association with this disease (23). Barreto *et al.* 2016 also analyzed ORF-I
 227 mutations and indicates that P45L, S69G, and R88K were found in higher frequency in HAM/TSP
 228 patients with statistical support. This study also reports possible associations between mutations and
 229 proviral load and suggested potential conditional dependency of ORF-I mutations, proviral load, and
 230 infection outcome (17). Additionally, the authors highlighted the C39R and L40F mutations in a
 231 higher frequency in AC patients, supported by statistical analyses, suggesting an association with
 232 protection for disease development (17). All the ORF-1 mutations described here are located in
 233 positions that may affect p12 and p8 proteins.

234 Another important HTLV-1 protein is the HBZ, encoded by the HTLV-1 bzip domain gene (*hbz*).
 235 This protein is constantly transcribed in the antisense direction by a promoter present in the 3' LTR
 236 and has five described motifs and is divided into three major regions called domains (39). HBZ
 237 protein interferes in the NF-κB pathway (40) and also enhances the CCR4 expression (41) which is a
 238 chemokine receptor highly expressed in HAM/TSP (42). HBZ protein seems to affect Forkhead box
 239 P3 protein (FOXP3 function) in animal models. It induces FOXP3 expression at the same time it
 240 blocks the protein binding to the DNA. Consequently, it will have an effect by reducing the
 241 regulatory immune response and increasing IFN-γ, which can cause inflammatory injuries in the host
 242 (43). HBZ mRNA levels were positively correlated with proviral load and neopterin concentration in
 243 the CSF of HAM/TSP patients, an important marker for monitoring disease activity, which
 244 demonstrates the importance of this protein in the development of HAM/TSP (44). Therefore,
 245 mutations in *hbz* can alter important functions performed by this protein since these changes can
 246 expose certain regions of the protein and modify its functions (25). Here, two studies reported
 247 mutations in this region, indicating the importance of HBZ in the virus pathogenesis (21, 25). The
 248 mutations described by Mota-Miranda *et al.* 2013b did not show an association with statistical
 249 support to HAM/TSP, but it affects protein domains. Mutations S9P and T95I, located at the
 250 activation domain from HBZ, were found in all sequences from asymptomatic carriers and
 251 HAM/TSP individuals from the study while R112C, located at the central domain, was found more in
 252 asymptomatic carriers. All three mutations can possibly alter protein function since they change the
 253 biochemistry characteristics (21). Other two mutations, described by Cucco *et al.* 2021, were reported
 254 as being important to the outcome from HTLV-1 infection: I164V and K184R, located at the bzip
 255 domain from HBZ. Both were related with statistical support to disease development, being more
 256 frequent in ATLL patients but also present in HAM/TSP patients (25). Although these mutations are
 257 located within important HBZ motifs and these amino acid changes could affect this protein function.
 258 In this sense, the authors suggest that they may be important for the outcome of the infection and
 259 suggest that further studies should be conducted with a larger number of sequences to better
 260 investigate the mutations described (21, 25). On the other hand, Cucco *et al.* 2021 suggested that the

HTLV-1 mutations and HAM/TSP development

261 R119Q mutation was associated with a protective profile for disease progression once it was found
 262 more frequent in asymptomatic patients compared with other clinical forms analyzed (ATLL,
 263 HAM/TSP and IDH). The authors emphasize the importance of continuing to study this mutation and
 264 its role in the HTLV-1 pathogenesis (25). Although many studies have shown the importance of HBZ
 265 in HTLV-1 pathogenesis, no other articles have studied or described this or other mutations as
 266 protective factors for HAM/TSP, making it difficult to corroborate or refute this finding.

267 Another essential viral region associated with disease pathogenesis is the ORF-IV which codifies the
 268 TAX protein (18, 24, 27). TAX acts as a regulatory protein and a viral transactivator that, in addition
 269 to stimulating the expression of cytokines (24), also inhibits DNA repair genes and cell growth
 270 genes. Although none of the *tax* variations studied by the articles was statistically associated with the
 271 clinical profile, it is important to highlight that the D264G mutation was found exclusively in
 272 HAM/TSP sequences. This mutation is able to create a site of post-translational modifications (PTM)
 273 (24), affecting its function, even though it did not have statistical support to be related to HAM/TSP.

274 Finally, it is important to note that not only viral transcribed regions are relevant, but also the LTR
 275 regulatory region. This is the non-transcribed control center for viral gene expression, and mutation
 276 in this region should be carefully considered (36). In this sense, we highlighted the LTR site where
 277 the transcription factor specificity protein 1 (SP1) bindings, regulating the provirus's transcription.
 278 Some mutations found in this LTR site (A125G, G174A and G8452A) caused deletion of this site
 279 and may be related to changes in HTLV-1 transcription genes (28). In addition, within the articles
 280 here included, Gomes *et al.* 2021 showed an important association between low proviral load and
 281 LTR A125G polymorphism in the HAM/TSP group (28), while Neto *et al.* 2011 associated LTR
 282 mutations (G232A and A184G) with high proviral load (45). Another study that describes LTR
 283 mutations is Canépa *et al.* 2015 who identified a variation in the Tax Responsive Elements (TRE)-1
 284 region (A8403G) more prevalent in patients with HAM/TSP, but not conclusively related to the
 285 development of the myelopathy (26). Thus, these studies suggested other possible indirect effects
 286 such as interference in the proviral load and protein functions that may contribute to disease
 287 progression.

288 Identifying mutations associated with one specific clinical status could help patient management
 289 since the healthcare team would be prepared in case the patient had an HTLV-1 disease-related
 290 predisposition. The data presented in this systematic review synthesize information in the literature
 291 about the mutation in the HTLV-1 genome probably associated with the HAM/TSP development.
 292 The results found here suggest that there are mutations with clinical importance. Eight of these
 293 mutations are possibly related to the HAM/TSP development – P45L, S69G and R88K (17); S72G
 294 and N93D (22); C39Y and P86S (23); V15M (25) –, as well as one variation (R119Q) (25) appears to
 295 be protective for the HTLV-1 carrier (Figure 2). It is important to note that investing in viral
 296 complete genome sequencing is extremely important to understanding the progress of HTLV-1
 297 infection. Regarding HTLV-1 sequencing, the Sanger methodology is still the most used platform,
 298 mostly due to low investment, but reaching other platforms, such as nanopore, could help to achieve
 299 a bigger number of complete genomes in a short time (46). Another problem is regarding HAM/TSP
 300 diagnosis being based only on reduced clinical features, ignoring rare symptoms in the established
 301 criteria combined with the need for highly skilled health professionals for this diagnosis, increasing
 302 the bias of clinical classification. Probably, part of the asymptomatic individuals is classified this way
 303 because of this difficulty of classification, and they can remain for years before clearly developing
 304 any HTLV-1-associated diseases. This miss classification of the patient, especially asymptomatic,
 305 can affect a clear and correct association of mutations and clinical profile. Thus, further studies
 306 should be conducted to investigate the impact of the mutations highlighted in this review and we

HTLV-1 mutations and HAM/TSP development

307 suggested that the analysis of the HTLV-1 complete genomes could be interesting to help understand
308 the gaps in the HTLV-1 field.

309

310 **4 Funding**

311 This research was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
312 (CNPq), N. 421342/2018-8 and 426196/2018-0. L.A.S. is supported by CNPq PDS, N 101878/2022-
313 2. D.I.B.S.S is supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB). R.F.C
314 and F.O.A are supported by CNPq. C.S.S is supported by Programa Institucional de Bolsas de
315 Iniciação Científica – Universidade Federal da Bahia (PIBIC – UFBA).

316 **5 Conflicts of Interest**

317 The authors declare no conflict of interest. The funder had no role in the design of the study; in the
318 collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to
319 publish the results.

320 **6 Author Contributions**

321 RFC: methodology, formal analysis, research, writing. DIBSS: methodology, formal analysis,
322 research, writing. JOSN: methodology, research, writing. LNB: methodology, research, writing. CSS:
323 methodology, research, writing. FOA: methodology, research, writing. MMNB: revision and editing.
324 MSC: revision and editing. DTC: conceptualization and writing - revision and editing. FKB:
325 conceptualization and writing - revision and editing. LAS: conceptualization and writing - revision
326 and editing. All authors have read and approved the final manuscript.

327 **References**

- 328 1. Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. Detection and isolation of
329 type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-
330 cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1980) 77:7415–7419. doi: 10.1073/pnas.77.12.7415
- 331 2. Gessain A, Cassar O. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection.
332 *Front Microbiol* (2012) 3:388. doi: 10.3389/fmicb.2012.00388
- 333 3. Yamaguchi K. Human T-lymphotropic virus type I in Japan. *Lancet Lond Engl* (1994) 343:213–
334 216. doi: 10.1016/s0140-6736(94)90994-6
- 335 4. Rosadas C, Taylor GP. Mother-to-Child HTLV-1 Transmission: Unmet Research Needs. *Front*
336 *Microbiol* (2019) 10:999. doi: 10.3389/fmicb.2019.00999
- 337 5. Eusebio-Ponce E, Candel FJ, Anguita E. Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 and
338 associated diseases in Latin America. *Trop Med Int Health TM IH* (2019) 24:934–953. doi:
339 10.1111/tmi.13278

HTLV-1 mutations and HAM/TSP development

- 340 6. Gessain A, Vernant JC, Maurs L, Barin F, Gout O, Calender A, De Thé G. ANTIBODIES TO
341 HUMAN T-LYMPHOTROPIC VIRUS TYPE-I IN PATIENTS WITH TROPICAL SPASTIC
342 PARAPARESIS. *The Lancet* (1985) 326:407–410. doi: 10.1016/S0140-6736(85)92734-5
- 343 7. Yoshida M, Miyoshi I, Hinuma Y. Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of
344 human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *Proc Natl Acad Sci* (1982)
345 79:2031–2035. doi: 10.1073/pnas.79.6.2031
- 346 8. Grenade L La, Manns A, Fletcher V, Carberry C, Hanchard B, Maloney EM, Cranston B,
347 Williams NP, Wilks R, Kang EC, et al. Clinical, Pathologic, and Immunologic Features of
348 Human T-Lymphotropic Virus Type I–Associated Infective Dermatitis in Children. *Arch*
349 *Dermatol* (1998) 134:439–444. doi: 10.1001/ARCHDERM.134.4.439
- 350 9. Sato K, Maruyama I, Maruyama Y, Kitajima I, Nakajima Y, Higaki M, Yamamoto K, Miyasaka
351 N, Osame M, Nishioka K. Arthritis in patients infected with human T lymphotropic virus type I.
352 Clinical and immunopathologic features. *Arthritis Rheum* (1991) 34:714–721. doi:
353 10.1002/art.1780340612
- 354 10. Mochizuki M, Watanabe T, Yamaguchi K, Tajima K, Yoshimura K, Nakashima S, Shirao M,
355 Araki S, Miyata N, Mori S, et al. Uveitis Associated with Human T Lymphotropic Virus Type I:
356 Seroepidemiologic, Clinical, and Virologic Studies. *J Infect Dis* (1992) 166:943–944. doi:
357 10.1093/INFDIS/166.4.943
- 358 11. Osame M, Usuku K, Izumo S, Ijichi N, Amitani H, Igata A, Matsumoto M, Tara M. HTLV-I
359 ASSOCIATED MYELOPATHY, A NEW CLINICAL ENTITY. *The Lancet* (1986) 327:1031–
360 1032. doi: 10.1016/S0140-6736(86)91298-5
- 361 12. Araujo AQ, Silva MTT. The HTLV-1 neurological complex. *Lancet Neurol* (2006) 5:1068–
362 1076. doi: 10.1016/S1474-4422(06)70628-7
- 363 13. Rivera-Caldón CC, López-Valencia D, Zamora-Bastidas TO, Dueñas-Cuéllar RA, Mora-
364 Obando DL. Infecção pelo vírus linfotrópico humano de células T tipo 1 (HTLV-1) e
365 paraparesia espástica. Avanços e diagnóstico depois de 35 anos do seu descobrimento. *Iatreia*
366 (2017) 30:146–159. doi: 10.17533/udea.iatreia.v30n2a04
- 367 14. Futsch N, Mahieux R, Dutartre H. HTLV-1, the other pathogenic yet neglected human
368 retrovirus: From transmission to therapeutic treatment. *Viruses* (2018) 10:1–25. doi:
369 10.3390/v10010001
- 370 15. Kaplan JE, Osame M, Kubota H, Igata A, Nishitani H, Maeda Y, Khabbaz RF, Janssen RS. The
371 risk of development of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis among
372 persons infected with HTLV-I. *J Acquir Immune Defic Syndr* (1990) 3:1096–1101.
- 373 16. Haddad R, Cilião Alves DC, Rocha–Junior MC, Azevedo R, do Socorro Pombo–de–Oliveira M,
374 Takayanagui OM, Donadi EA, Covas DT, Kashima S. HLA-G 14-bp Insertion/Deletion
375 Polymorphism Is a Risk Factor for HTLV-1 Infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* (2011)
376 27:283–288. doi: 10.1089/aid.2010.0165
- 377 17. Barreto FK, Khouri R, Rego FF de A, Santos LA, Castro-Amarante MF de, Bialuk I, Pise-
378 Masison CA, Galvão-Castro B, Gessain A, Jacobson S, et al. Analyses of HTLV-1 sequences

HTLV-1 mutations and HAM/TSP development

- 379 suggest interaction between ORF-I mutations and HAM/TSP outcome. *Infect Genet Evol* (2016)
380 45:420–425. doi: 10.1016/j.meegid.2016.08.020
- 381 18. Nozuma S, Matsuura E, Kodama D, Tashiro Y, Matsuzaki T, Kubota R, Izumo S, Takashima H.
382 Effects of host restriction factors and the HTLV-1 subtype on susceptibility to HTLV-1-
383 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Retrovirology* (2017) 14:26. doi:
384 10.1186/s12977-017-0350-9
- 385 19. Seiki M, Hattori S, Hirayama Y, Yoshida M. Human adult T-cell leukemia virus: complete
386 nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. *Proc Natl Acad*
387 *Sci* (1983) 80:3618–3622. doi: 10.1073/pnas.80.12.3618
- 388 20. Mota-Miranda ACA, Barreto FK, Amarante MFC, Batista E, Monteiro-Cunha JP, Farre L,
389 Galvão-Castro B, Alcantara LCJ. Molecular characterization of HTLV-1 gp46 glycoprotein
390 from health carriers and HAM/TSP infected individuals. *Viol J* (2013) 10:75. doi:
391 10.1186/1743-422X-10-75
- 392 21. Mota-Miranda ACA, Barreto FK, Baptista E, Farre-Vale L, Monteiro-Cunha JP, Galvão-Castro
393 B, Alcantara LCJ. Molecular Study of HBZ and gp21 Human T Cell Leukemia Virus Type 1
394 Proteins Isolated from Different Clinical Profile Infected Individuals. *AIDS Res Hum*
395 *Retroviruses* (2013) 29:1370–1372. doi: 10.1089/aid.2013.0015
- 396 22. Socorro de Almeida Viana M de N do, Santos Nobre AF, Costa Jr E, Silva IC, Pinheiro BT,
397 Pereira CCC, de Souza Canto Ferreira L, de Almeida DS, de Araújo MWL, da Silva Borges M,
398 et al. Stability of the HTLV-1 glycoprotein 46 (gp46) gene in an endemic region of the Brazilian
399 Amazon and the presence of a significant mutation (N93D) in symptomatic patients. *Viol J*
400 (2018) 15:80. doi: 10.1186/s12985-018-0984-9
- 401 23. Borba MMN, Farre L, Bittencourt AL, Castro-Amarante MF de, Galvão-Castro B, Santos LA,
402 Araújo THA, Alcantara LCJ, Barreto FK. Assessment of Genetic Diversity of HTLV-1 ORF-I
403 Sequences Collected from Patients with Different Clinical Profiles. *AIDS Res Hum Retroviruses*
404 (2019) 35:881–884. doi: 10.1089/aid.2019.0127
- 405 24. Araújo THA, Barreto FK, Menezes ADL, Lima CPS de, Oliveira RS de, Lemos P da S, Galvão-
406 Castro B, Kashima S, Farre L, Bittencourt AL, et al. Complete genome sequence of human T-
407 cell lymphotropic type 1 from patients with different clinical profiles, including infective
408 dermatitis. *Infect Genet Evol* (2020) 79:104166. doi: 10.1016/j.meegid.2019.104166
- 409 25. Cucco MS, Moraes LEP, Oliveira Andrade F, Khouri R, Galvão-Castro B, Araújo THA,
410 Almeida Rego FF, Gois LL, Barreto FK, Santos LA. Molecular characterization of HTLV-1
411 genomic region *hbz* from patients with different clinical conditions. *J Med Virol* (2021)
412 93:6418–6423. doi: 10.1002/jmv.27005
- 413 26. Cánepa C, Salido J, Ruggieri M, Fraile S, Pataccini G, Berini C, Biglione M. Low Proviral Load
414 is Associated with Indeterminate Western Blot Patterns in Human T-Cell Lymphotropic Virus
415 Type 1 Infected Individuals: Could Punctual Mutations be Related? *Viruses* (2015) 7:5643–
416 5658. doi: 10.3390/v7112897

HTLV-1 mutations and HAM/TSP development

- 417 27. Brunetto GS, Massoud R, Leibovitch EC, Caruso B, Johnson K, Ohayon J, Fenton K, Cortese I,
418 Jacobson S. Digital droplet PCR (ddPCR) for the precise quantification of human T-
419 lymphotropic virus 1 proviral loads in peripheral blood and cerebrospinal fluid of HAM/TSP
420 patients and identification of viral mutations. *J Neurovirol* (2014) 20:341–351. doi:
421 10.1007/s13365-014-0249-3
- 422 28. Gomes YCP, Silva MTT, Leite ACCB, Lima MASD, Araújo AQC, Silva Filho IL, Vicente
423 ACP, Espíndola O de M. Polymorphisms in HTLV-1 Tax-responsive elements in HTLV-1-
424 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients are associated with reduced proviral
425 load but not with disease progression. *J Gen Virol* (2021) 102: doi: 10.1099/jgv.0.001649
- 426 29. Satou Y, Matsuoka M. HTLV-1 and the Host Immune System : How the Virus Disrupts
427 Immune Regulation, Leading to HTLV-1 Associated Diseases. *J Clin Exp Hematop* (2010)
428 50:1–8. doi: 10.3960/jslrt.50.1
- 429 30. Palker TJ, Tanner ME, Scearce RM, Streilein RD, Clark ME, Haynes BF. Mapping of
430 immunogenic regions of human T cell leukemia virus type I (HTLV-I) gp46 and gp21 envelope
431 glycoproteins with env-encoded synthetic peptides and a monoclonal antibody to gp46. *J*
432 *Immunol Baltim Md 1950* (1989) 142:971–978.
- 433 31. Amirasr M, Fallah tafti T, Sankian M, Rezaei A, Tafaghodi M. Immunization against HTLV-I
434 with chitosan and tri-methylchitosan nanoparticles loaded with recombinant env23 and env13
435 antigens of envelope protein gp46. *Microb Pathog* (2016) 97:38–44. doi:
436 10.1016/j.micpath.2016.05.012
- 437 32. Kabiri M, Sankian M, Sadri K, Tafaghodi M. Robust mucosal and systemic responses against
438 HTLV-1 by delivery of multi-epitope vaccine in PLGA nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm*
439 (2018) 133:321–330. doi: 10.1016/j.ejpb.2018.11.003
- 440 33. Pise-Masison CA, de Castro-Amarante MF, Enose-Akahata Y, Buchmann RC, Fenizia C,
441 Washington Parks R, Edwards D, Fiocchi M, Alcantara LC, Bialuk I, et al. Co-dependence of
442 HTLV-1 p12 and p8 functions in virus persistence. *PLoS Pathog* (2014) 10:e1004454. doi:
443 10.1371/journal.ppat.1004454
- 444 34. Barreto FK. Caracterização molecular da ORF-I proveniente de pacientes com diferentes perfis
445 clínicos. (2017)76–76.
- 446 35. Ding W, Albrecht B, Kelley RE, Muthusamy N, Kim S-J, Altschuld RA, Lairmore MD. Human
447 T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 p12¹ Expression Increases Cytoplasmic Calcium To
448 Enhance the Activation of Nuclear Factor of Activated T Cells. *J Virol* (2002) 76:10374–10382.
449 doi: 10.1128/JVI.76.20.10374-10382.2002
- 450 36. Fukumoto R, Andresen V, Bialuk I, Cecchinato V, Walser J-C, Valeri VW, Nauroth JM,
451 Gessain A, Nicot C, Franchini G. In vivo genetic mutations define predominant functions of the
452 human T-cell leukemia/lymphoma virus p12I protein. *Blood* (2009) 113:3726–3734. doi:
453 10.1182/blood-2008-04-146928
- 454 37. Banerjee P, Feuer G, Barker E. Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 (HTLV-1) p12¹ Down-
455 Modulates ICAM-1 and -2 and Reduces Adherence of Natural Killer Cells, Thereby Protecting
456 HTLV-1-Infected Primary CD4⁺ T Cells from Autologous Natural Killer Cell-Mediated

HTLV-1 mutations and HAM/TSP development

- 457 Cytotoxicity despite the Reduction of Major Histocompatibility Complex Class I Molecules on
458 Infected Cells. *J Virol* (2007) 81:9707–9717. doi: 10.1128/JVI.00887-07
- 459 38. Van Prooyen N, Gold H, Andresen V, Schwartz O, Jones K, Ruscetti F, Lockett S, Gudla P,
460 Venzon D, Franchini G. Human T-cell leukemia virus type 1 p8 protein increases cellular
461 conduits and virus transmission. *Proc Natl Acad Sci* (2010) 107:20738–20743. doi:
462 10.1073/pnas.1009635107
- 463 39. Gaudray G, Gachon F, Basbous J, Biard-Piechaczyk M, Devaux C, Mesnard J-M. The
464 complementary strand of the human T-cell leukemia virus type 1 RNA genome encodes a bZIP
465 transcription factor that down-regulates viral transcription. *J Virol* (2002) 76:12813–12822. doi:
466 10.1128/jvi.76.24.12813-12822.2002
- 467 40. Basbous J, Arpin C, Gaudray G, Piechaczyk M, Devaux C, Mesnard J-M. The HBZ factor of
468 human T-cell leukemia virus type I dimerizes with transcription factors JunB and c-Jun and
469 modulates their transcriptional activity. *J Biol Chem* (2003) 278:43620–43627. doi:
470 10.1074/jbc.M307275200
- 471 41. Ma G, Yasunaga J-I, Shimura K, Takemoto K, Watanabe M, Amano M, Nakata H, Liu B, Zuo
472 X, Matsuoka M. Human retroviral antisense mRNAs are retained in the nuclei of infected cells
473 for viral persistence. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2021) 118:e2014783118. doi:
474 10.1073/pnas.2014783118
- 475 42. Yamano Y, Araya N, Sato T, Utsunomiya A, Azakami K, Hasegawa D, Izumi T, Fujita H,
476 Aratani S, Yagishita N, et al. Abnormally high levels of virus-infected IFN-gamma+ CCR4+
477 CD4+ CD25+ T cells in a retrovirus-associated neuroinflammatory disorder. *PLoS One* (2009)
478 4:e6517. doi: 10.1371/journal.pone.0006517
- 479 43. Satou Y, Yasunaga J-I, Zhao T, Yoshida M, Miyazato P, Takai K, Shimizu K, Ohshima K,
480 Green PL, Ohkura N, et al. HTLV-1 bZIP factor induces T-cell lymphoma and systemic
481 inflammation in vivo. *PLoS Pathog* (2011) 7:e1001274. doi: 10.1371/journal.ppat.1001274
- 482 44. Saito M, Matsuzaki T, Satou Y, Yasunaga J-I, Saito K, Arimura K, Matsuoka M, Ohara Y. In
483 vivo expression of the HBZ gene of HTLV-1 correlates with proviral load, inflammatory
484 markers and disease severity in HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis
485 (HAM/TSP). *Retrovirology* (2009) 6:19. doi: 10.1186/1742-4690-6-19
- 486 45. Neto WK, Da-Costa AC, de Oliveira ACS, Martinez VP, Nukui Y, Sabino EC, Sanabani SS.
487 Correlation between LTR point mutations and proviral load levels among human T cell
488 lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) asymptomatic carriers. *Virol J* (2011) 8:535. doi:
489 10.1186/1743-422X-8-535
- 490 46. de Oliveira Andrade F, Cucco MS, Borba MMN, Neto RC, Gois LL, de Almeida Rego FF,
491 Santos LA, Barreto FK. An overview of sequencing technology platforms applied to HTLV-1
492 studies: a systematic review. *Arch Virol* (2021) 166:3037–3048. doi: 10.1007/s00705-021-
493 05204-w
- 494

HTLV-1 mutations and HAM/TSP development

495 Table 1. Summary of the information collected on the eleven included studies. In bold, the HTLV-1
 496 mutations possibly associated with HAM/TSP development are highlighted.
 497

Authors, Year	Geographic region	Study Population (HAM/TSP/* AC)	Sequencing method	Genomic region studied	Mutations found in HAM/TSP patients
Mota-Miranda <i>et al.</i> 2013a	Brazil	5/5	Sanger	gp46	F14S; N42H; S72G; V247I
Mota-Miranda <i>et al.</i> 2013b	Brazil	4/6	Sanger	gp21 and <i>hbz</i>	gp21 : Y477H HBZ : S9P; T95I; R112C
Brunetto <i>et al.</i> 2014	USA	25/4	Digital droplet PCR	<i>tax</i> and <i>gag</i>	**8 point mutations in <i>tax</i> and 1 in <i>gag</i>
Canépa <i>et al.</i> 2015	Argentina	21/27	Sanger	LTR	LTR : T8522C, G8545A, A8403G
Barreto <i>et al.</i> 2016	Caribbean, France, North America, Africa and Brazil	70/86	Sanger	ORF-1	F3L; S23P; D26N; G29S; P34L; C39R; L40F; P45L ; F61L; S63P; L66P; S69G ; R83C; R88K ; P91S;
Nozuma <i>et al.</i> 2017	Japan	122/89	Illumina	Complete genome	<i>pol</i> : Q323H <i>env</i> : F19L; H137Q <i>p12</i> : P23S <i>p30</i> : L27R; D140G; A149T <i>tax</i> : A221V; S304N HBZ : S13P
Socorro de Almeida Viana <i>et al.</i> 2018	Brazil	7/12	Sanger	gp46	S72G ; L70I; S103P; N93D
Borba <i>et al.</i> 2019	Brazil	6/14	Sanger	ORF-1	C39Y ; P86S ; P34L; G29S, F61L; S63P; S91P
Araújo <i>et al.</i> 2019	Brazil	10/9	Ion Torrent	Complete genome	<i>pro</i> : G201D <i>tax</i> : D264G <i>pol</i> : Q446R <i>gag</i> : T106I gp46 : P92S; V247I p30 : R37C

HTLV-1 mutations and HAM/TSP development

Gomes <i>et al.</i> 2021	Brazil	45/29	Sanger	<i>tax</i> and LTR	<u>LTR</u> : A125G; G174A <u><i>tax</i></u> : A221V; S304N
Cucco <i>et al.</i> 2021	Brazil	13/2	Sanger	HBZ	P65L, I164V V15M ; K184R; R119Q

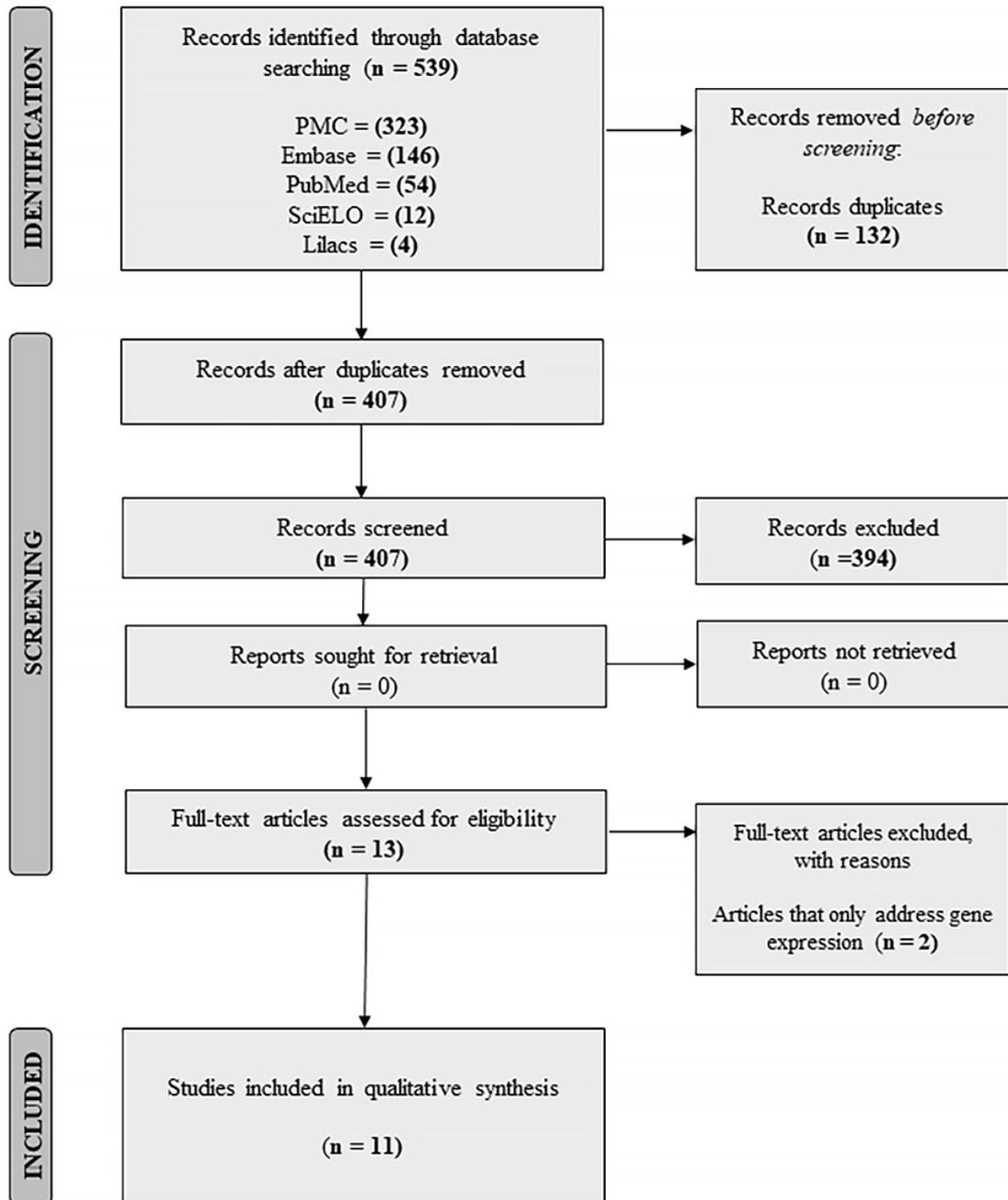


Figure 1. Flow diagram of the systematic selection.

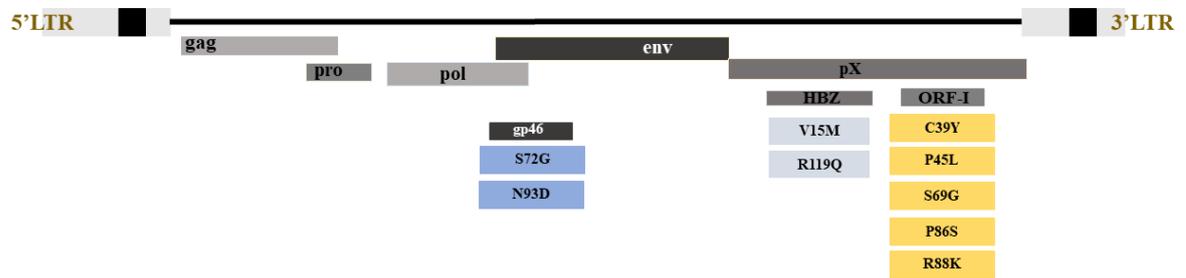


Figure 2. HTLV-1 non-synonymous mutations possibly associated with HAM/TSP development.

VI.3. Seção 3: An overview of sequencing technology platforms applied to HTLV-1 studies: a systematic review

Nesta subseção estão descritos os resultados relativos ao quarto e último objetivo secundário, revisão sistemática sobre as diversas tecnologias de sequenciamento e como elas ajudam e impactam o estudo do genoma do HTLV-1.

Archives of Virology (2021) 166:3037–3048
<https://doi.org/10.1007/s00705-021-05204-w>

ORIGINAL ARTICLE



An overview of sequencing technology platforms applied to HTLV-1 studies: a systematic review

Felipe de Oliveira Andrade¹ · Marina Silveira Cucco^{2,3} · Melina Mosquera Navarro Borba² · Reinaldo Conceição Neto⁴ · Luana Leandro Gois^{2,5,6} · Filipe Ferreira de Almeida Rego⁶ · Luciane Amorim Santos^{2,3,5,6} · Fernanda Khouri Barreto¹

Received: 14 March 2021 / Accepted: 20 June 2021 / Published online: 20 August 2021
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Austria, part of Springer Nature 2021

Abstract

Human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) was the first human retrovirus described. The viral factors involved in the different clinical manifestations of infected individuals are still unknown, and in this sense, sequencing technologies can support viral genome studies, contributing to a better understanding of infection outcome. Currently, several sequencing technologies are available with different approaches. To understand the methodological advances in the HTLV-1 field, it is necessary to organize a synthesis by a rigorous review. This systematic literature review describes different technologies used to generate HTLV-1 sequences. The review follows the PRISMA guidelines, and the search for articles was performed in PubMed, Lilacs, Embase, and SciELO databases. From the 574 articles found in search, 62 were selected. The articles showed that, even with the emergence of new sequencing technologies, the traditional Sanger method continues to be the most commonly used methodology for generating HTLV-1 genome sequences. There are many questions that remain unanswered in the field of HTLV-1 research, and this reflects on the small number of studies using next-generation sequencing technologies, which could help address these gaps. The data compiled and analyzed here can help research on HTLV-1, assisting in the choice of sequencing technologies.

Introduction

It is estimated that 5–10 million people worldwide are infected with human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) [1–4]. Infected individuals can develop HTLV-1-associated

pathologies such as adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL in 2–5% of patients), HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP in 0.25–3.8% of patients), HTLV-1-associated infectious dermatitis (IDH), and other inflammatory diseases such as uveitis and pneumonitis, or they can be classified as asymptomatic carriers [5–7]. The factors involved in the development of a particular clinical manifestation have not yet been elucidated, and HTLV-1-infected individuals remain without specific treatment [8–10].

The HTLV-1 genome structure is composed of two flanking regions, known as long terminal repeats (5' and 3' LTR), and the structural genes gag, pol, and env. There is also a non-structural region, pX, adjacent to the 3' LTR that encodes the regulatory and accessory proteins Tax, Rex, and HBZ [11]. Molecular characterization of the viral genome, based on sequencing combined with bioinformatics analysis, provides information on genomic regions such as viral integration sites and allows identification of mutations and epigenetic changes [12]. This information is important for the development of HTLV-1 specific vaccines and therapies.

Although HTLV-1 was the first human retrovirus described, the number of HTLV-1 sequences that have been

Handling Editor: Zhongjie Shi.

✉ Fernanda Khouri Barreto
 fernanda.khouri@hotmail.com

¹ Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, Campus Anísio Teixeira, Rua Hormindo Barros, 58, Bairro Candeias, Vitória da Conquista 45.029-094, Brazil

² Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Brazil

³ Faculdade de Medicina da Bahia, Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil

⁴ Faculdade Cruzeiro do Sul, Vitória da Conquista, Brazil

⁵ Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, Brazil

⁶ Universidade Católica do Salvador, Salvador, Brazil

determined is considerably smaller than for other important retroviruses, such as human immunodeficiency virus 1 (HIV-1). In March of 2021, there were 1,048,465 published HIV-1 sequences, while for HTLV-1 there were only 9,980 sequences available in the GenBank database. To perform some specific studies of virus modifications that could be associated to different manifestations in human hosts, it would be necessary to have clinical and epidemiological information about the patients. However, most studies do not give all the information necessary to connect viral mutations with the clinical status of the patient. Even with some sequences already published, an investment in the generation of more HTLV-1 sequences would allow the identification of new mutations that affect infection, which might be helpful for developing new diagnostic strategies.

In 1975, Sanger presented the first DNA sequencing technique, which was widely adopted and is still being used today. This technique is based on the use of modified chain terminators, which are dideoxynucleotides (ddNTPs) [13]. Sequencing techniques later evolved further, resulting in the emergence of next-generation sequencing (NGS), starting with second-generation technology. This technology brought new methodologies for determining nucleotide sequences with greater efficiency and speed, using systems such as 454 from Roche Applied Science, Solexa from Illumina, and Ion Torrent, which expanded the ways of sequencing genetic material [14, 15]. The main examples of second-generation technology are pyrosequencing and sequencing by synthesis (SBS). In this generation, the DNA polymerase acts in conjunction with a chemiluminescent enzyme, which, when complementing a template of a DNA strand, emits chemiluminescent signals, allowing the determination of the sequence [16].

Recently, a third generation has emerged, represented by nanopore sequencing (Oxford Nanopore Technologies) and Pacific Biosciences (PacBio) methodologies [15]. Unlike other sequencing technologies, these methods can be used to sequence unique DNA molecules and to produce longer read lengths in a shorter time than was possible in the previous generations [17]. The nanopore method stands out not only for generating long nucleotide chains through larger devices such as GridION and PromethION but also through small portable devices such as MinION and Flongle. This technique is based on the passage of genetic material through a nanopore membrane, which detects the electrical signals emitted during the passage of each nucleotide [18].

It should be noted that, in recent years, there has been significant technological diversification in genome sequencing, with more efficient, cheaper, and faster devices. Investigating which sequencing technology is most used to determine HTLV-1 genome sequences allows us to understand the limitations and possibilities of research carried out on the viral genome. This may help to fill the gaps in our knowledge

about this virus, such as the factors involved in the development of HTLV-1-associated diseases. Considering the importance of the technological choice for sequencing, in this article, we review the different technologies used to generate HTLV-1 sequences and the contributions of these techniques to new investigations of this retrovirus.

Materials and methods

This study consists of a systematic literature review carried out in accordance with the guidelines of Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA). A systematic search was conducted for studies in which performed partial or total sequencing of the HTLV-1 genome was performed. The articles were searched in the PubMed, Lilacs, SciELO, and EMBASE databases in May 2021. The search algorithm used was composed of subjects from the DeCS/MeSH database and additional keywords: ("*Human T lymphotropic virus 1*" OR "*HTLV-1*") AND "*sequence**" AND ("*molecular sequence data*" OR "*sequencing*"). Through the search algorithm, all titles were cross-checked to identify possible duplicate studies.

For the selection of articles, the following inclusion criteria were applied to select studies: (i) the articles were in Portuguese, English or Spanish; (ii) they were original studies, and (iii) the articles presented complete or partial genome sequences of HTLV-1. Articles published since 2000 were included. The exclusion criteria were as follows: (i) studies not specifying the sequencing method, (ii) studies that did not generate HTLV-1 sequences or did not specify the number of sequences generated, (iii) animal studies, and (iv) studies in which genome sequencing was performed using a cell line. The HTLV-1 subtypes were not considered as a criterion for selection of articles.

The articles found on the platforms were initially filtered and selected by reading the title and abstract. Subsequently, a new selection was made by reading the full text. After reading and analyzing the selected articles, the data were collected and included in this review. The search for published studies was performed independently by two authors (F.O.A. and M.S.C.), and disagreements about all outcomes were resolved by consensus among all authors.

After reading the selected articles, the following content was extracted from each one: (1) basic information (title, authors, year, objectives), (2) study design, (3) sequencing technology and method, (4) subjects (sample origin and region of the HTLV-1 genome sequenced), and (5) number of sequences generated. The data collected from the articles were tabulated using Microsoft Excel. The figures generated in this work were produced using the programs Adobe Photoshop and Microsoft PowerPoint (2019 versions).

This study was registered with the International Prospective Register of Systematic Reviews (PROSPERO) under the number CRD42020218387.

Results

The search for studies identified a total of 574 articles, of which 350 were available in PubMed, 213 in EMBASE, one in SciELO, and 10 in Lilacs. Of these, 65 were excluded due to duplication, 404 were excluded after selection by title and abstract, and 43 after reading the full text. Ultimately, 62 articles were included in the systematic review (Fig. 1).

The articles indicated the use of three sequencing methodologies: Sanger, Illumina, and Ion Torrent. Sanger sequencing, which is the first generation of sequencing, was the most frequently used technique. Even after the emergence of NGS methodologies in 2004, it was observed that most published HTLV-1 studies continued to use the Sanger method preferentially. Among the 62 articles used in this review, 59 used the Sanger method, and, of these, 40 were carried out after 2004 (Table 1).

In most of the studies, a partial HTLV-1 genome sequence was determined. Of the 59 articles that used the Sanger method [19–77], 56 reported partial genome sequences, and three reported complete sequencing of the HTLV-1 genome. Of the four articles that used NGS [12, 75, 78, 79], two reported partial genome sequences and two reported complete genome sequences.

Another important aspect of these articles was the difference in the number of sequences generated for each region of the HTLV-1 genome: 1258 sequences of LTR, 89 sequences of gag, 124 of pol, 777 of env, and 1420 of the pX region (Fig. 2). It is important to highlight that there are four different overlapping open reading frames (ORFs) in the pX region that encode regulatory proteins and the HTLV-1 bzip domain gene (hbz), which is transcribed in the antisense direction from a promoter present in the 3'LTR. The number of sequences generated for each ORF and hbz are as follows: ORF I, 311; ORF-II, 54; ORF-III, 54; ORF-IV, 1153; hbz, 10. In addition, 14 partial genome sequences with the precise regions not described were found, and 228 complete HTLV-1 genome sequences were reported.

Brazil is the country with the largest number of sequences generated, distributed through 26 sequencing studies, followed by Japan, with seven. Colombia and France had four studies each, and Argentina and Chile each had three. Two studies each were performed in Gabon and Spain, and in Cuba, India, Israel, Italy, Mozambique, the UK, Portugal, and Russia, only one study was performed. Finally, there were also six articles that did not provide information about the origins of the sequences (Fig. 3).

It is important to note that, despite being a state-of-the-art technique employed for genome sequencing of other retroviruses such as HIV [80], no published study using third-generation sequencing for HTLV-1 was found. In addition, most of the studies refer to information generated more than 10 years ago, in which more than 3,000 sequences were generated, while the most recent studies generated only approximately 800 sequences (Fig. 4). Another interesting topic to be highlighted is the lack of clinical information about the patients included in the studies. Of the 62 articles included, 60% did not report the clinical status of the studied population.

Discussion

In the 41 years since the discovery of HTLV-1, no effective therapeutic treatments or vaccines have been developed, and it is still not clear what determines different infection outcomes. During this period, diverse sequencing technologies have become available. The central aim of this systematic review was to summarize the different technologies used in the HTLV-1 field in order to guide the decision-making processes on the generation of new HTLV-1 genome sequences.

The Sanger method was the most commonly used for generating HTLV-1 sequences, followed by Illumina and Ion Torrent. All of these techniques have advantages and disadvantages. The characteristics of HTLV-1, as well as the specific aspects of each method must be taken into consideration.

One important aspect in HTLV-1 infection is that, after infection, the virus integrates into the host cell DNA as a provirus. Unlike HIV, in HTLV-1 infection, the circulating viral RNA is not easily detected in the plasma or serum, and additional techniques are usually needed prior to sequencing, such as PBMC separation and nested PCR [81, 82]. In this sense, the HTLV-1 sample extraction and preparation steps are an important point to consider during the choice of the sequencing platform to use.

Among the sequencing technology platforms, considering its low error rate, Sanger sequencing is considered the gold standard, despite being first-generation and having a high cost. Furthermore, it is possible to assess the sequencing quality based on other parameters, such as sequence length, sequencing depth, and GC content. One study reported that sequencing quality is more stable and GC depth distribution is better with Ion Torrent than with HiSeq 2000 [83]. Importantly, even when the goal is to sequence larger regions and/or the complete proviral genome, technologies such as Illumina and Ion Torrent produce small sequence reads. This read size, as well as the polymerase chain reaction (PCR) step, can impair the understanding of an essential aspect of HTLV-1 infection: clonality. While in patients with ATLL

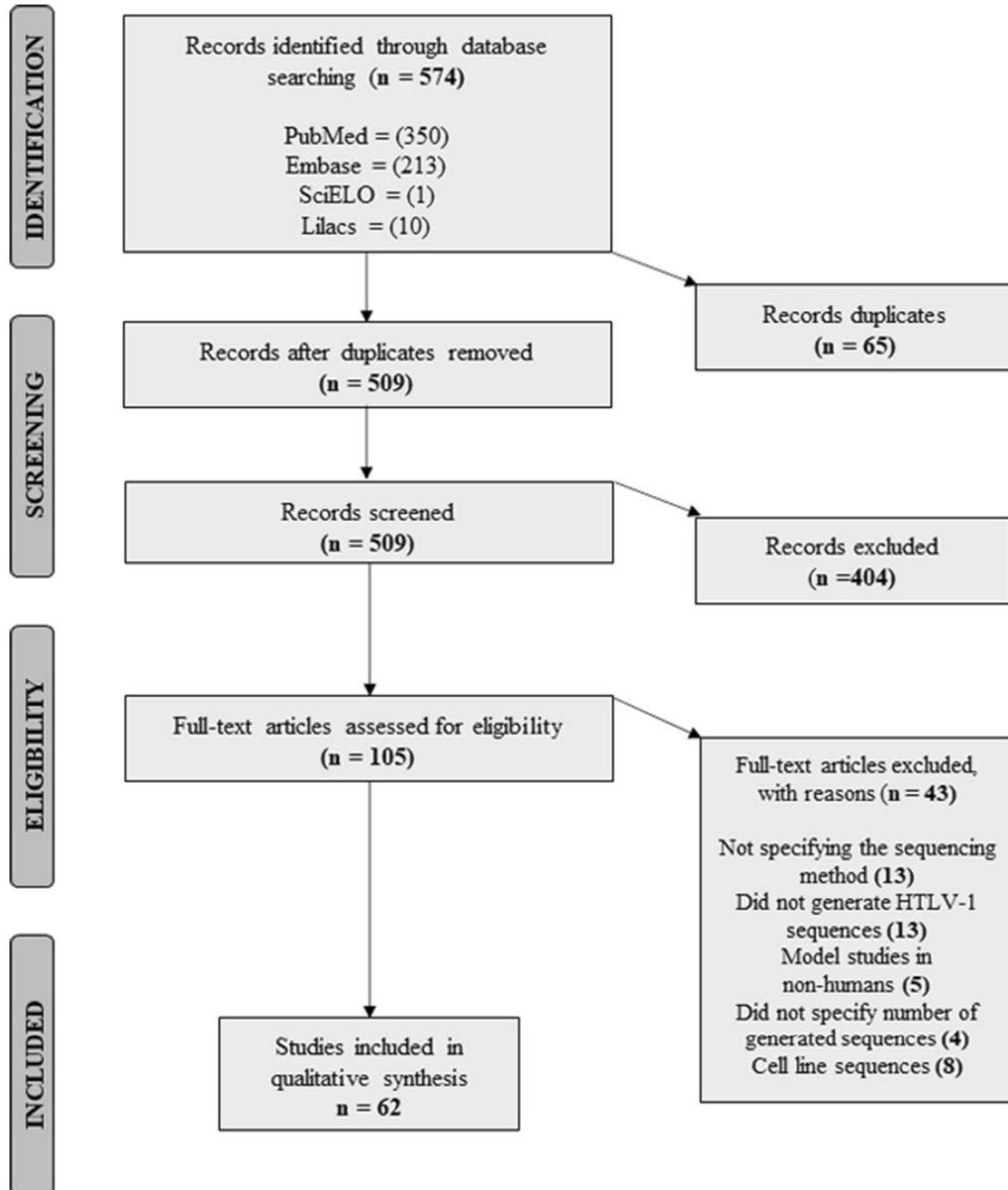


Fig. 1 Flow diagram for the systematic selection of studies to review

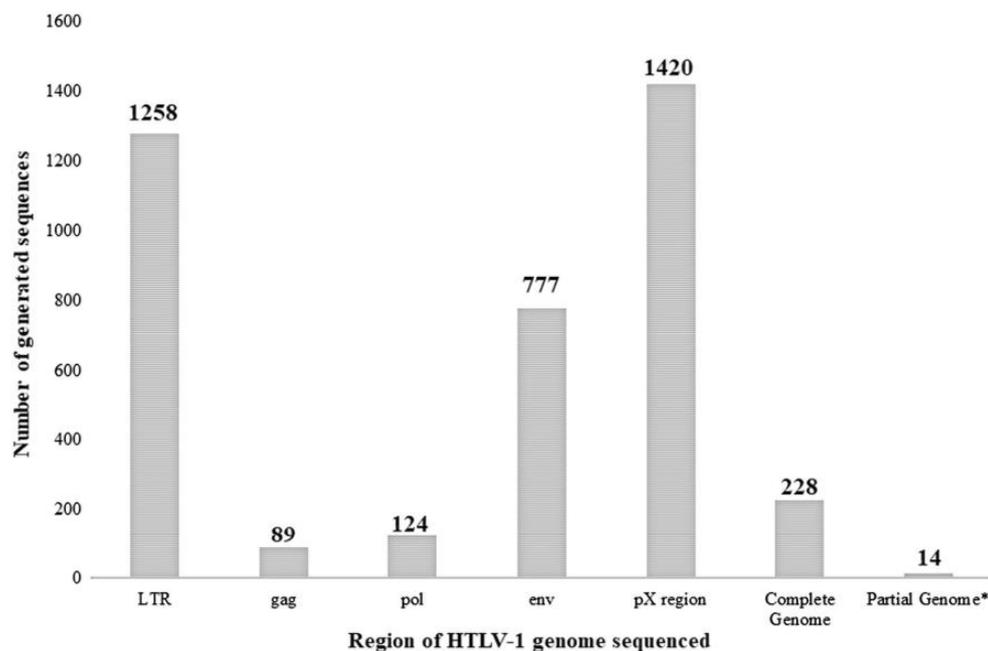
Table 1 Summary of information collected from the 62 selected studies, including sample origin, sequencing methodology, equipment, and number of sequences generated

Reference	Sample origin	Sequencing methodology	Equipment	No. of sequences generated
[19]	NA ^b	Sanger	ABI [®] 377A DNA sequencer	218
[20]	NA	Sanger	Hitachi Fluorescent DNA sequencer SQ-5500	39
[21]	NA	Sanger	Hitachi Fluorescent DNA sequencer SQ-5500	64
[22]	France and UK	Sanger	ABI 373 automatic DNA sequencer	17
[23]	Chile	Sanger	Automated DNA sequencer	37
[24]	Brazil	Sanger	Fmol DNA sequencing system (Promega)	2
[25]	France	Sanger	ABI 377A DNA sequencer	208
[26]	Japan	Sanger	ABI 373 automatic DNA sequencer	178
[27]	NA	Sanger	SQ5500 automated sequencer	138
[28]	Colombia	Sanger	NA	12
[29]	Italy	Sanger	ABI PRISM automatic sequencer	6
[30]	Chile	Sanger	NA	50
[31]	Chile	Sanger	NA	128
[32]	Spain	Sanger	ABI 310 genetic analyzer	4
[33]	Colombia	Sanger	NA	12
[34]	France	Sanger	Applied Biosystems 377 DNA sequencer	1
[35]	Japan	Sanger	ABI 377 DNA sequencer	231
[36]	Colombia	Sanger	ABI Prism serie 3700	11
[37]	Brazil	Sanger	ABI 373 DNA Sequencer	3
[38]	Russia	Sanger	ABI 377 automatic DNA sequencer	8
[39]	India	Sanger	ABI automated DNA sequencer	7
[40]	Brazil	Sanger	ABI 377 Automated DNA Sequencer	26
[41]	France, Gabon and Iran	Sanger	ABI Prism 377 and Ceq2000 sequencer	65
[42]	Argentina	Sanger	ABI model 377 automated DNA sequencer	12
[43]	Brazil	Sanger	ABI 377 Sequencer	134
[44]	Israel	Sanger	ABI automated sequencer	1
[45]	Brazil	Sanger	ABI Prism 377 DNA Sequencer	2
[46]	Brazil	Sanger	ABI 373 DNA Sequencer	5
[47]	NA	Sanger	ABI 310 sequencer	334
[48]	NA	Sanger	ABI 310 autosequencer	316
[49]	Japan	Sanger	ABI 377 DNA Sequence	445
[50]	Brazil	Sanger	ABI 3100 genetic analyzer	46
[51]	Argentina	Sanger	ABI Prism 3100 Genetic Analyzer	44
[52]	Gabon	Sanger	Automatic sequencing system (Euro Sequence Gene Services)	34
[53]	Brazil	Sanger	ABI 3100 genetic analyzer	8
[54]	Brazil	Sanger	ABI 3100 genetic analyzer	5
[55]	Argentina	Sanger	ABI PRISM 377 Automated DNA sequencer	114
[56]	Japan	Sanger	ABI 3730 Sequencer	19
[57]	Brazil	Sanger	ABI PRISM 310 Genetic Analyzer	25
[58]	Brazil	Sanger	ABI 3100 genetic analyzer	8
[59]	Mozambique	Sanger	ABI 3730 Automated DNA Sequencer	25
[60]	Colombia	Sanger	ABI PRISM 310 sequencer	30
[61]	Portugal and Spain	Sanger	Automated DNA sequencing	47
[62]	Brazil	Sanger	NA	1
[63]	Brazil	Sanger	ABI 3130 genetic analyzer	13
[64]	Brazil	Sanger	ABI 3100 genetic analyzer	32
[65]	Brazil	Sanger	ABI 3100 genetic analyzer	146

Table 1 (continued)

Reference	Sample origin	Sequencing methodology	Equipment	No. of sequences generated
[66]	Brazil	Sanger	ABI 3100 genetic analyzer	18
[67]	Cuba	Sanger	Genome Lab Dye Terminator Cycle Sequence	12
[78]	Brazil	Illumina	Illumina MiSeq System	90
[68]	Brazil	Sanger	ABI 1373 Automated DNA Sequencer	14
[75]	Brazil	Sanger and Ion Torrent	ABI 3130xl Genetic Analyzer / Ion 314TM Chip 8-pack	22
[69]	Iran	Sanger	ABI 3730 Sequencer	2
[70]	Brazil	Sanger	ABI PRISM 310 Genetic Analyzer	2
[71]	Japan and Brazil	Sanger	ABI PRISM 3740 Genetic Analyzer	14
[72]	Brazil	Sanger	ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer	24
[12]	Japan	Illumina	Illumina MiSeq or NextSeq	98
[73]	Iran	Sanger	NA	5
[79]	Brazil	Ion Torrent	Ion 318™ Chip PGM	31
[74]	Brazil	Sanger	ABI 3130 Genetic Analyzer	132
[76]	Brazil	Sanger	ABI 3100 Genetic Analyzer	21
[77]	Brazil and Japan	Sanger	ABI 1373 Sequencer	90

^aABI, Applied Biosystems; NA, not available; *, sequence region not described. Total for each instrument used: ABI 377/377A DNA Sequencer, 12; ABI 3100 Genetic Analyzer, 10; ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, 6; ABI 373 DNA sequencer, 4; Hitachi Fluorescent DNA sequencer SQ-5500, 3; ABI 3730 Sequencer, 3; ABI 3130/3130xl genetic analyzer, 3; ABI PRISM automatic sequencer, 3; Automated DNA sequencer, 2; ABI 1373 Automated DNA Sequencer, 2; Illumina MiSeq, 2; ABI Prism 3700, 1; Fmol DNA sequencing system (Promega), 1; Ion 318™ Chip PGM, 1; ABI PRISM 3740 Genetic Analyzer, 1; Illumina NextSeq, 1; Ceq2000 sequencer, 1; Automatic sequencing system (Euro Sequence Gene Services), 1; Genome Lab Dye Terminator Cycle Sequence 1

**Fig. 2** Numbers of sequences generated for each region of the HTLV-1 genome

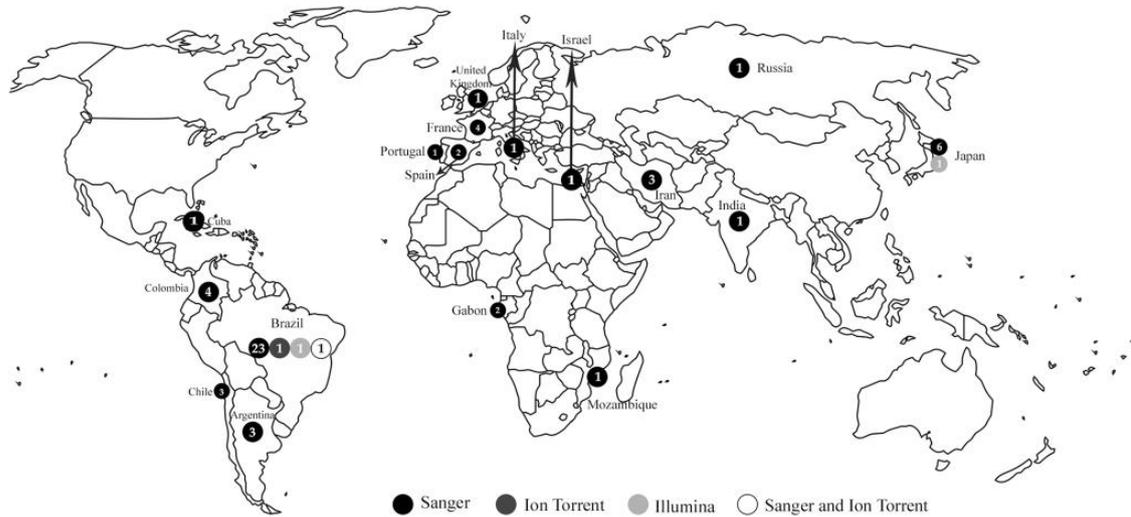


Fig. 3 Geographic origin of HTLV-1 sequences and methodology used for sequence generation

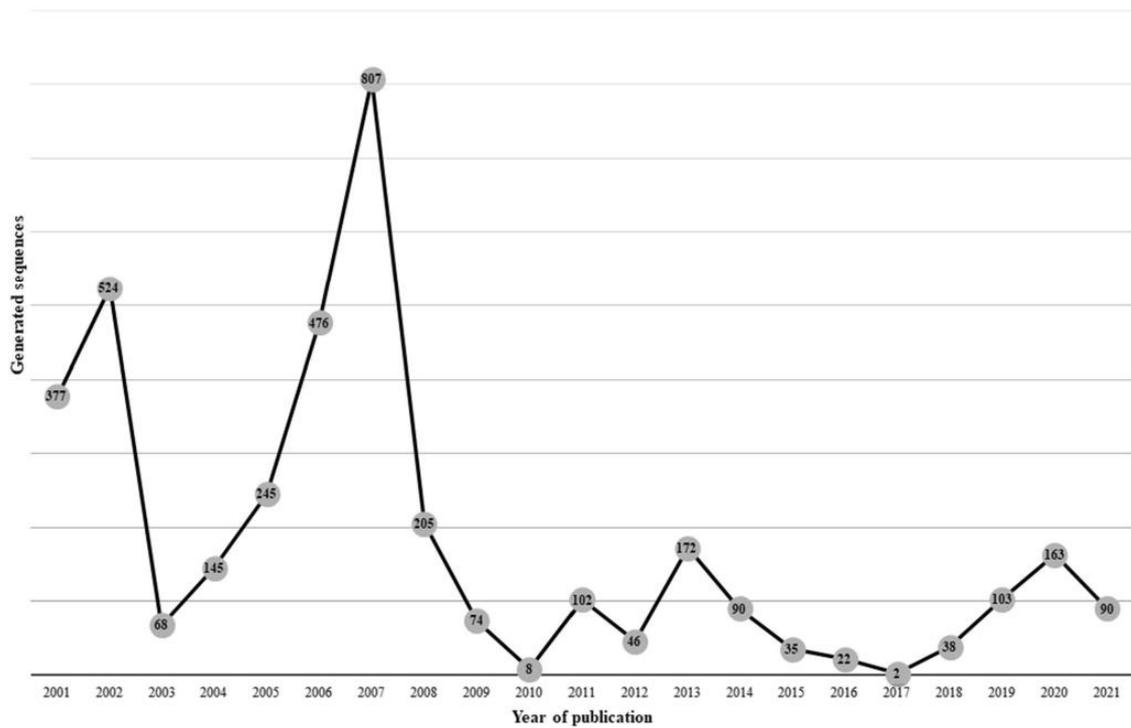


Fig. 4 Number of HTLV-1 sequences generated between 2000 and 2020

there is a monoclonal pattern, in patients with IDH or HAM/TSP, and in asymptomatic carriers, a polyclonal pattern is found [84, 85]. Therefore, the small size of the genome sequencing readout may make it difficult to identify viral quasispecies and may give an unrealistic biological picture.

It is important to highlight that sequencing of viral genomes is important for understanding the infection process [86]. Therefore, the use of few and old sequencing methods, despite the emergence of more innovative, faster, and often less expensive technologies, makes the goal of developing better alternatives for infection control and the understanding of viral pathogenesis increasingly distant. In addition, animal models are important in HTLV-1 research and have allowed significant advances in the understanding of viral infection and pathogenesis. Each animal model has its advantages. Rats are used in studies involving HAM/TSP, and non-human primates are used in studies analyzing the immune response and viral persistence [87].

The emergence of new sequencing protocols has led to a reduction in the time required and production costs [88]. Despite that, no article included in this study used more recent technologies, such as the third-generation sequencing. MinION and PacBio could be an interesting alternative, due to their shorter processing time, despite providing sequences with regular quality, when compared to older methods. These methods can be useful in HTLV-1 research, increasing the number of partial and/or complete sequences available on the platforms and contributing to a better understanding of the virus-host relationship.

In addition to the predominance of the older techniques, most of the studies focused on sequencing specific regions of the genome, with few studies generating complete genome sequences. The LTR and pX regions were the most frequently sequenced. This could be because of the importance of the LTR for the subtyping and the fact that pX encodes the HTLV-1 regulatory proteins. In this context, it is relevant to point out that complete genome sequencing is essential for the identification of gene functions and their involvement in disease as well as for vaccine development.

This systematic review demonstrated a deficit in the number of HTLV-1 sequences. However, this study has an important limitation, since sequences can be deposited in databases such as GenBank without being necessarily associated with a published article. However, our data corroborate an ongoing study carried out by our group that highlights the deficit of complete HTLV-1 genome sequences available in the GenBank database. In this study, we verified that only 242 complete HTLV-1 genome sequences were available in the GenBank database, and most of these sequences did not include clinical and epidemiological information about the patient.

On the other hand, the majority of studies provided geographical information about the samples sequenced. Most of

them were from endemic regions such as Japan and Brazil. Another country that deserves attention is Colombia. The Colombian island of Tumaco has a high population density and a very high prevalence of HAM/TSP, which is why this region is a focus of study of HTLV-1 [33]. Moreover, few articles from Africa were found, despite being the continent with the highest endemicity of HTLV-1 [1]. The European continent also contributes to the generation of HTLV-1 sequences, although relatively few articles describe the sequencing. Some studies did not report the origin of the sequence, which limits their epidemiological value. The sum of studies from each country does not correspond to the number of articles included, because some studies include samples from different countries, such as Bandeira et al., 2018 [71].

Interestingly, only 21 articles included in this review were published in the last 10 years, which is equivalent to almost 30% of the total number of studies, revealing that there is still low investment in research in the HTLV-1 field. The encouragement of more investments in HTLV-1 studies may contribute to an increased number of HTLV-1 sequences generated in different geographic regions, and this can assist in the understanding of the global and regional distribution of this virus [1].

There are gaps to be filled in relation to information on HTLV-1 infection. Although it was the first human retrovirus described and has been proven to be associated with the development of diseases, studies on the pathogenesis and treatment of this virus are not encouraged, and worse, investment in research is decreasing [89], demonstrating that HTLV-1 is still a neglected virus [90, 91]. Thus, more investment in HTLV-1 research and the implementation of worldwide prevention strategies will be the main motor for the eradication of these infections.

Conclusion

The analysis of the articles selected for this systematic review showed that the number of studies sequencing the HTLV-1 genome is much lower than for other retroviruses, and most of these studies still opt for Sanger sequencing despite the emergence of new methodologies. This demonstrates a lack of investment in this field. It is important to note that Sanger sequencing has advantages over other methods. However, NGS techniques also have characteristics that may be important for answering questions that remain about HTLV-1 infection. Investments in HTLV-1 research are needed, mainly in the use of more current methodologies, since they are methodologies that have been developed through lessons learned and improved by the previous generation.

Author contributions FOA: methodology, formal analysis, investigation, writing. MSC: methodology, formal analysis, investigation, writing. MMNB: methodology, investigation and writing. RCN: methodology. LLG: conceptualization and writing—review and editing. FFAR: conceptualization and writing—review and editing. LAS: conceptualization and writing—review and editing. FKB: conceptualization, formal analysis, writing—review and editing and supervision. All authors read and approved the final manuscript.

Funding This research was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), N. 421342/2018-8.

Declarations

Conflict of interest The authors declare no conflict of interest. The funder had no role in the design of the study; in the collection, analysis, or interpretation of data, in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

- Gessain A, Cassar O (2012) Epidemiological aspects and world distribution of HTLV-1 infection. *Front Microbiol* 3:388. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00388>
- Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF et al (1980) Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:7415–7419. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.12.7415>
- de-Thé G, Gessain A, Gazzolo L et al (1985) Comparative seroepidemiology of HTLV-I and HTLV-III in the French West Indies and some African countries. *Cancer Res* 45:4633s–4636s
- Hinuma Y, Nagata K, Hanaoka M et al (1981) Adult T-cell leukemia: antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:6476–6480
- Gessain A, Barin F, Vernant JC et al (1985) Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet* 2:407–410. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(85\)92734-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(85)92734-5)
- La Grenade L, Manns A, Fletcher V et al (1998) Clinical, pathologic, and immunologic features of human T-lymphotropic virus type I-associated infective dermatitis in children. *Arch Dermatol* 134:439–444. <https://doi.org/10.1001/archderm.134.4.439>
- Yoshida M, Miyoshi I, Hinuma Y (1982) Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:2031–2035. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.6.2031>
- Barreto FK, Khouri R, de Rego FFA et al (2016) Analyses of HTLV-1 sequences suggest interaction between ORF-I mutations and HAM/TSP outcome. *Infect Genet Evol* 45:420–425. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.08.020>
- Borba MMN, Farre L, Bittencourt AL et al (2019) Assessment of genetic diversity of HTLV-1 ORF-I sequences collected from patients with different clinical profiles. *AIDS Res Hum Retroviruses* 35:881–884. <https://doi.org/10.1089/AID.2019.0127>
- Cucco MS, de Moraes LEP, de Oliveira AF et al (2021) Molecular characterization of HTLV-1 genomic region hzb from patients with different clinical conditions. *J Med Virol*. <https://doi.org/10.1002/jmv.27005>
- Barreto FK, Araújo THA, Rego FF de A, Alcántara LCJ (2017) A fully annotated genome sequence of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1). *J Bioinf Com Sys Bio* 1(1):105
- Katsuya H, Islam S, Tan BJJ et al (2019) The nature of the HTLV-1 provirus in naturally infected individuals analyzed by the viral DNA-capture-seq approach. *Cell Rep* 29:724–735.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.09.016>
- Sanger F, Coulson AR (1975) A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* 94:441–448. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(75\)90213-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(75)90213-2)
- Ansorge WJ (2009) Next-generation DNA sequencing techniques. *N Biotechnol* 25:195–203. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2008.12.009>
- Kchouk M, Gibrat J-F, Elloumi M (2017) Generations of sequencing technologies: from first to next generation. *Biol Med*. <https://doi.org/10.4172/0974-8369.1000395>
- Yoshinaga Y, Daum C, He G, O'Malley R (2018) Genome sequencing. *Methods Mol Biol* 1775:37–52. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7804-5_4
- Rhoads A, Au KF (2015) PacBio sequencing and its applications. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 13:278–289. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2015.08.002>
- Jain M, Olsen HE, Paten B, Akeson M (2016) The oxford nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community. *Genome Biol* 17:239. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1103-0>
- Leclercq I, Mortreux F, Cavrois M et al (2000) Host sequences flanking the human T-cell leukemia virus type 1 provirus in vivo. *J Virol* 74:2305–2312. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.5.2305-2312.2000>
- Seki M, Higashiyama Y, Mizokami A et al (2000) Up-regulation of human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) tax/rex mRNA in infected lung tissues. *Clin Exp Immunol* 120:488–498. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2000.01237.x>
- Nakane S, Shirabe S, Moriuchi R et al (2000) Comparative molecular analysis of HTLV-I proviral DNA in HTLV-I infected members of a family with a discordant HTLV-I-associated myelopathy in monozygotic twins. *J Neurovirol* 6:275–283. <https://doi.org/10.3109/13550280009030753>
- Morozov VA, Lagaye S, Taylor GP et al (2000) Chimeric matrix proteins encoded by defective proviruses with large internal deletions in human T-Cell leukemia virus type 1-infected humans. *J Virol* 74:3933–3940
- Sonoda S, Li HC, Cartier L et al (2000) Ancient HTLV type 1 provirus DNA of Andean mummy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 16:1753–1756. <https://doi.org/10.1089/0889220050193263>
- Caterino-de-Araujo A, Favero A, de los Santos-Fortuna E et al (2000) HTLV-I/HTLV-II coinfection in an AIDS patient from São Paulo, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 16:715–719. <https://doi.org/10.1089/08892200308710>
- Mortreux F, Leclercq I, Gabet AS et al (2001) Somatic mutation in human T-cell leukemia virus type 1 provirus and flanking cellular sequences during clonal expansion in vivo. *J Natl Cancer Inst* 93:367–377. <https://doi.org/10.1093/jnci/93.5.367>
- Furukawa Y, Kubota R, Tara M et al (2001) Existence of escape mutant in HTLV-I tax during the development of adult T-cell leukemia. *Blood* 97:987–993. <https://doi.org/10.1182/blood.v97.4.987>
- Okazaki S, Moriuchi R, Yosizuka N et al (2001) HTLV-1 proviruses encoding non-functional TAX in adult T-cell leukemia. *Virus Genes* 23:123–135. <https://doi.org/10.1023/a:1011840918149>
- Dominguez MC, Castillo A, Cabrera J et al (2002) Envelope sequence variation and phylogenetic relations of human T cell lymphotropic virus type 1 from endemic areas of Colombia. *AIDS Res Hum Retroviruses* 18:887–890. <https://doi.org/10.1089/0889220260190371>

29. Manca N, Perandin F, De Simone N et al (2002) Detection of HTLV-I tax-rex and pol gene sequences of thymus gland in a large group of patients with myasthenia gravis. *J Acquir Immune Defic Syndr* 29:300–306. <https://doi.org/10.1097/00126334-200203010-00012>
30. Ramirez E, Cartier L, Villota C, Fernandez J (2002) Genetic characterization and phylogeny of human T-cell lymphotropic virus type I from Chile. *Virus Res* 84:135–149. [https://doi.org/10.1016/s0168-1702\(02\)00005-9](https://doi.org/10.1016/s0168-1702(02)00005-9)
31. Ramirez E, Fernandez J, Cartier L et al (2003) Defective human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) provirus in seronegative tropical spastic paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy (TSP/HAM) patients. *Virus Res* 91:231–239. [https://doi.org/10.1016/s0168-1702\(02\)00276-9](https://doi.org/10.1016/s0168-1702(02)00276-9)
32. Toro C, Rodés B, Poveda E, Soriano V (2003) Rapid development of subacute myelopathy in three organ transplant recipients after transmission of human T-cell lymphotropic virus type I from a single donor. *Transplantation* 75:102–104. <https://doi.org/10.1097/00007890-200301150-00019>
33. Balcázar N, Sánchez GI, García-Vallejo F (2003) Sequence and phylogenetic analysis of human T cell lymphotropic virus type I from Tumaco, Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98:641–648. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762003000500010>
34. Leclercq I, Mortreux F, Rabaaoui S et al (2003) Naturally occurring substitutions of the human T-cell leukemia virus type 1 3' LTR influence strand-transfer reaction. *J Virol Methods* 109:105–117. [https://doi.org/10.1016/s0166-0934\(03\)00052-1](https://doi.org/10.1016/s0166-0934(03)00052-1)
35. Furukawa Y, Usuku K, Izumo S, Osame M (2004) Human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) p121 is dispensable for HTLV-I transmission and maintenance of infection in vivo. *AIDS Res Hum Retroviruses* 20:1092–1099. <https://doi.org/10.1089/aid.2004.20.1092>
36. Chávez M, Domínguez MC, Blank A et al (2004) Reconstrucción de la evolución molecular de la infección actual por el virus linfotrópico humano tipo I en Colombia. *Biomédica (Bogotá)*. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v24i1.1245>
37. Vallinoto ACR, Muto NA, Pontes GS et al (2004) Serological and molecular evidence of HTLV-I infection among Japanese immigrants living in the Amazon region of Brazil. *Jpn J Infect Dis* 57:156–159
38. Morozov VA, Syrtsev AV, Ellerbrok H et al (2005) Mycosis fungoides in European Russia: no antibodies to human T cell leukemia virus type I structural proteins, but virus-like sequences in blood and saliva. *Intervirology* 48:362–371. <https://doi.org/10.1159/000086063>
39. Ohkura S, Yamashita M, Ishida T et al (2005) Phylogenetic heterogeneity of new HTLV type 1 isolates from southern India in subgroup A. *AIDS Res Hum Retroviruses* 21:325–330. <https://doi.org/10.1089/aid.2005.21.325>
40. Iñiguez AM, Otsuki K, Magalhães GP et al (2005) Genetic markers on the HTLV-1 p121 protein sequences from Brazilian HAM/TSP patients and asymptomatic HTLV-1 carrier isolates. *AIDS Res Hum Retroviruses* 21:580–582. <https://doi.org/10.1089/aid.2005.21.580>
41. Capdepon S, Londos-Gagliardi D, Joubert M et al (2005) New insights in HTLV-I phylogeny by sequencing and analyzing the entire envelope gene. *AIDS Res Hum Retroviruses* 21:28–42. <https://doi.org/10.1089/aid.2005.21.28>
42. Gastaldello R, Otsuki K, Barbas MG et al (2005) Molecular evidence of HTLV-1 intrafamilial transmission in a non-endemic area in Argentina. *J Med Virol* 76:386–390. <https://doi.org/10.1002/jmv.20370>
43. Kashima S, Alcantara LC, Takayanagui OM et al (2006) Distribution of human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) subtypes in Brazil: genetic characterization of LTR and tax region. *AIDS Res Hum Retroviruses* 22:953–959. <https://doi.org/10.1089/aid.2006.22.953>
44. Shohat M, Shohat B, Mimouni D et al (2006) Human T-cell lymphotropic virus type I provirus and phylogenetic analysis in patients with mycosis fungoides and their family relatives. *Br J Dermatol* 155:372–378. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2006.07312.x>
45. Vallinoto ACR, Pontes GS, Muto NA et al (2006) Identification of human T-cell lymphotropic virus infection in a semi-isolated Afro-Brazilian quilombo located in the Marajó Island (Pará, Brazil). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101:103–105. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762006000100020>
46. Souza LA, Lopes IGL, Maia EL et al (2006) Molecular characterization of HTLV-1 among patients with tropical spastic paraparesis/HTLV-1 associated myelopathy in Belém, Pará. *Rev Soc Bras Med Trop* 39:504–506. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822006000500017>
47. Kim FJ, Lavanya M, Gessain A et al (2006) Intrahost variations in the envelope receptor-binding domain (RBD) of HTLV-1 and STLV-1 primary isolates. *Retrovirology* 3:29. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-3-29>
48. Miyazaki M, Yasunaga J-I, Taniguchi Y et al (2007) Preferential selection of human T-cell leukemia virus type I provirus lacking the 5' long terminal repeat during oncogenesis. *J Virol* 81:5714–5723. <https://doi.org/10.1128/JVI.02511-06>
49. Kubota R, Hanada K, Furukawa Y et al (2007) Genetic stability of human T lymphotropic virus type I despite antiviral pressures by CTLs. *J Immunol* 178:5966–5972. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.9.5966>
50. de Mota ACA, Van Dooren S, de Fernandes FMC et al (2007) The close relationship between South African and Latin American HTLV type 1 strains corroborated in a molecular epidemiological study of the HTLV type 1 isolates from a blood donor cohort. *AIDS Res Hum Retroviruses*. <https://doi.org/10.1089/aid.2006.0203>
51. Eirin ME, Dileria DA, Berini CA et al (2008) Divergent strains of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) within the Cosmopolitan subtype in Argentina. *AIDS Res Hum Retroviruses* 24:1237–1244. <https://doi.org/10.1089/aid.2008.0024>
52. Etenna SL-D, Caron M, Besson G et al (2008) New insights into prevalence, genetic diversity, and proviral load of human T-cell leukemia virus types 1 and 2 in pregnant women in Gabon in equatorial central Africa. *J Clin Microbiol* 46:3607–3614. <https://doi.org/10.1128/JCM.01249-08>
53. de Magalhães TS, Miranda ACAM, Alcantara LCJ et al (2008) Phylogenetic and molecular analysis of HTLV-1 isolates from a medium sized town in northern of Brazil: tracing a common origin of the virus from the most endemic city in the country. *J Med Virol* 80:2040–2045
54. de Rego FFA, Alcantara LCJ, de Moura Neto JP et al (2008) 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
55. Gastaldello R, Iñiguez AM, Otsuki K et al (2008) HTLV type 1 genetic types among native descendants in Argentina. *AIDS Res Hum Retroviruses* 24:1139–1146. <https://doi.org/10.1089/aid.2007.0299>
56. Eguchi K, Fujii H, Oshima K et al (2009) Human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) genetic typing in Kakeroma Island, an island at the crossroads of the ryukyans and Wajin in Japan, providing further insights into the origin of the virus in Japan. *J Med Virol* 81:1450–1456. <https://doi.org/10.1002/jmv.21540>
57. dos Santos EL, Tamegão-Lopes B, Machado LFA et al (2009) Molecular characterization of HTLV-1/2 among blood donors in Belém, State of Pará: first description of HTLV-2b subtype in the

- Amazon region. *Rev Soc Bras Med Trop* 42:271–276. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822009000300007>
58. de Rego FFA, Miranda AM, de Santos ES et al (2010) Seroprevalence and molecular epidemiology of HTLV-1 isolates from HIV-1 co-infected women in Feira de Santana, Bahia, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses*. <https://doi.org/10.1089/aid.2009.0298>
 59. Vicente ACP, Gudo ES, Iñiguez AM et al (2011) Genetic characterization of human T-cell lymphotropic virus type 1 in Mozambique: transcontinental lineages drive the HTLV-1 endemic. *PLoS Negl Trop Dis*. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001038>
 60. Salcedo-Cifuentes M, Domínguez MC, García-Vallejo F (2011) Genome epidemiology and tropical spastic paraparesis associated with human T-cell lymphotropic virus type 1. *Rev Panam Salud Publica* 30:422–430
 61. Pádua E, Rodés B, Pérez-Piñar T et al (2011) Molecular characterization of human T cell leukemia virus type 1 subtypes in a group of infected individuals diagnosed in Portugal and Spain. *AIDS Res Hum Retroviruses* 27:317–322. <https://doi.org/10.1089/aid.2010.0195>
 62. Zanella L, Otsuki K, Marin MA et al (2012) Complete genome sequence of Central Africa human T-cell lymphotropic virus subtype 1b. *J Virol* 86:12451. <https://doi.org/10.1128/JVI.02258-12>
 63. Magri MC, de Brigido LFM, Rodrigues R et al (2012) Tax gene characterization of human T-Lymphotropic virus type 1 strains from Brazilian HIV-coinfected patients. *AIDS Res Hum Retroviruses* 28:1775–1778. <https://doi.org/10.1089/aid.2011.0389>
 64. Magri MC, de Macedo Brigido LF, Rodrigues R et al (2012) Phylogenetic and similarity analysis of HTLV-1 isolates from HIV-coinfected patients from the South and Southeast regions of Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 28:110–114. <https://doi.org/10.1089/aid.2011.0117>
 65. Miranda ACAM, Barreto FK, de Amarante MFC et al (2013) Molecular characterization of HTLV-1 gp46 glycoprotein from health carriers and HAM/TSP infected individuals. *Virology*. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-75>
 66. Mota-Miranda ACA, Barreto FK, Baptista E et al (2013) Molecular study of HBZ and gp21 human T cell leukemia virus type 1 proteins isolated from different clinical profile infected individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses* 29:1370–1372. <https://doi.org/10.1089/AID.2013.0015>
 67. Machado LY, Navea LM, Díaz HM et al (2013) Phylogenetic analysis of human T cell lymphotropic virus type 1 isolated from Cuban individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses* 29:1168–1172. <https://doi.org/10.1089/AID.2012.0225>
 68. Bandeira LM, Uehara SNO, Asato MA et al (2015) High prevalence of HTLV-1 infection among Japanese immigrants in non-endemic area of Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 9:e0003691. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003691>
 69. Rafatpanah H, Torkamani M, Valizadeh N et al (2016) Prevalence and phylogenetic analysis of HTLV-1 in a segregated population in Iran. *J Med Virol* 88:1247–1253. <https://doi.org/10.1002/jmv.24448>
 70. de Aguiar SA, de Souza França SA, Santana BB et al (2017) Human T-lymphotropic virus 1aA circulation and risk factors for sexually transmitted infections in an Amazon geographic area with lowest human development index (Marajó Island, Northern Brazil). *BMC Infect Dis*. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2859-x>
 71. Bandeira LM, Uehara SNO, Puga MAM et al (2018) HTLV-1 intrafamilial transmission among Japanese immigrants in Brazil. *J Med Virol* 90:351–357. <https://doi.org/10.1002/jmv.24938>
 72. Ribeiro IP, Kozłowski AG, Dias de Matos MA et al (2018) HTLV-1 and -2 in a first-time blood donor population in North-eastern Brazil: prevalence, molecular characterization, and evidence of intrafamilial transmission. *J Med Virol* 90:1651–1657. <https://doi.org/10.1002/jmv.25231>
 73. Mirhosseini A, Mohareri M, Arab R et al (2019) Complete sequence of human T cell leukemia virus type 1 in ATLL patients from Northeast Iran, Mashhad revealed a prematurely terminated protease and an elongated pX open reading frame III. *Infect Genet Evol* 73:460–469. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.05.012>
 74. Campos KR, Caterino-de-Araújo A (2020) Provirus mutations of human T-lymphotropic virus 1 and 2 (HTLV-1 and HTLV-2) in HIV-1-coinfected individuals. *mSphere*. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00923-20>
 75. de Rego FFA, de Oliveira T, Giovanetti M et al (2016) Deep sequencing analysis of human T cell lymphotropic virus type 1 long terminal repeat 5' region from patients with tropical spastic paraparesis/human T cell lymphotropic virus type 1-associated myelopathy and asymptomatic carriers. *AIDS Res Hum Retroviruses*. <https://doi.org/10.1089/aid.2015.0273>
 76. Aleluia MM, Mello MAG, Alcântara LCJ et al (2015) The origin of HTLV-1 in southern Bahia by phylogenetic, mtDNA and β -globin analysis. *Virology* 5:63–74. <https://doi.org/10.1016/j.virep.2015.05.002>
 77. Bandeira LM, Puga MAM, Weis-Torres SMS et al (2021) Human T-cell leukemia virus type 1 infection among Japanese immigrants and their descendants living in Southeast Brazil: a call for preventive and control responses. *PLoS Negl Trop Dis* 15:e0009066. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009066>
 78. Pessôa R, Watanabe JT, Nukui Y et al (2014) Molecular characterization of human T-cell lymphotropic virus type 1 full and partial genomes by illumina massively parallel sequencing technology. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093374>
 79. Araújo THA, Barreto FK, Menezes ADL et al (2020) Complete genome sequence of human T-cell lymphotropic type 1 from patients with different clinical profiles, including infective dermatitis. *Infect Genet Evol* 79:104166. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.104166>
 80. Nguyen Quang N, Goudey S, Ségéral E et al (2020) Dynamic nanopore long-read sequencing analysis of HIV-1 splicing events during the early steps of infection. *Retrovirology*. <https://doi.org/10.1186/s12977-020-00533-1>
 81. Cabral F, Arruda LB, de Araújo ML et al (2012) Detection of human T-cell lymphotropic virus type 1 in plasma samples. *Virus Res* 163:87–90. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.08.014>
 82. Demontis MA, Sadiq MT, Golz S, Taylor GP (2015) HTLV-1 viral RNA is detected rarely in plasma of HTLV-1 infected subjects. *J Med Virol* 87:2130–2134. <https://doi.org/10.1002/jmv.24264>
 83. Liu L, Li Y, Li S et al (2012) Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol*. <https://doi.org/10.1155/2012/251364>
 84. Bangham CRM, Cook LB, Melamed A (2014) HTLV-1 clonality in adult T-cell leukaemia and non-malignant HTLV-1 infection. *Semin Cancer Biol* 26:89–98. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2013.11.003>
 85. Wattel E, Vartanian JP, Pannetier C, Wain-Hobson S (1995) Clonal expansion of human T-cell leukemia virus type 1-infected cells in asymptomatic and symptomatic carriers without malignancy. *J Virol* 69:2863–2868
 86. Capobianchi MR, Giombini E, Rozera G (2013) Next-generation sequencing technology in clinical virology. *Clin Microbiol Infect* 19:15–22. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12056>
 87. Panfil AR, Al-Saleem JJ, Green PL (2013) Animal models utilized in HTLV-1 research. *Virology (Auckl)* 4:49–59. <https://doi.org/10.4137/VRT.S12140>
 88. Heather JM, Chain B (2016) The sequence of sequencers: the history of sequencing DNA. *Genomics* 107:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2015.11.003>
 89. Martin F, Tagaya Y, Gallo R (2018) Time to eradicate HTLV-1: an open letter to WHO. *Lancet* 391:1893–1894. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30974-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30974-7)

90. Cao F, Ji Y, Huang R et al (2000) Sequence note: nucleotide sequence analyses of partial envgp46 gene of human T-lymphotropic virus type I from inhabitants of Fujian Province in Southeast China. *AIDS Res Hum Retroviruses* 16:921–923. <https://doi.org/10.1089/08892220050042855>
91. Chou SK, Okayama A, Tachibana N et al (1995) Nucleotide sequence analysis of a full-length human T-cell leukemia virus type I from adult T-cell leukemia cells: a prematurely terminated

PX open reading frame II. *Int J Cancer* 60:701–706. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910600522>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

VII. DISCUSSÃO

Os avanços das tecnologias de sequenciamento permitiu possibilidades para tentar entender e desvendar o desenvolvimento de doenças, identificar novos patógenos, determinar a movimentação desses patógenos nas diferentes populações, entre outras aplicações. Essas plataformas de sequenciamento ajudam no desenvolvimento de estudos mais complexos e eficientes dos genomas de diversos patógenos, neste caso especialmente os vírus, possibilitando identificação de mutações e outros fatores que diferenciam um do outro, além de contribuir para o desenvolvimento de vacinas, diagnóstico e terapia.

Neste trabalho, focado no cenário do HTLV-1, podemos perceber que as tecnologias de sequenciamento vêm evoluindo ao longo do tempo, ao ponto que estamos atualmente na terceira geração, chamado de sequenciamento de nova geração (NGS), que engloba as metodologias de sequenciamento por nanoporos (*Oxford Nanopore Technologies*) e *Pacific Biosciences* (PacBio). Essas tecnologias facilitam o sequenciamento de genoma completo além de serem tecnologias que entregam resultados de forma mais rápida e muitas vezes com custos mais baixos. Entretanto, no que diz respeito ao sequenciamento de HTLV-1, a tecnologia Sanger continua sendo a mais usada (DE OLIVEIRA ANDRADE et al., 2021).

O motivo para os indivíduos infectados pelo HTLV-1 permanecerem no quadro clínico intitulado como assintomático, ou desenvolverem alguma das manifestações clínicas associadas a esse vírus, não é completamente elucidado. Existem diversos trabalhos que buscam identificar mutações específicas de determinadas formas clínicas, para que a partir disso seja possível iniciar trabalhos que foquem em meios de impedir o desenvolvimento dessas doenças (BARRETO et al., 2016; BORBA et al., 2019; MOTA-MIRANDA et al., 2013; REGO et al., 2016). A identificação desses fatores que influenciam o desenvolvimento ou não de doenças é de grande importância, além da contribuição para desenvolvimento de terapias, para que os pacientes sejam acompanhados de forma mais direcionada, podendo estabelecer um diagnóstico precoce e iniciar os cuidados que podem melhorar a qualidade de vida desses indivíduos.

Os dados aqui relatados mostram a presença de mutações exclusivas em determinadas manifestações clínicas. A mutação V15M na proteína HBZ do HTLV-1 pode ser uma mutação específica dessa manifestação, visto que foi observada apenas em amostras de indivíduos com HAM/TSP. Entretanto, mais estudos são necessários, visto que a população estudada foi pequena, e dentro das sequências de banco de dados não foi observada esta mutação, indicando ainda que pode ser uma mutação presente na população de Salvador. Outras duas mutações foram observadas apenas em sequências provenientes de indivíduos com ATLL, I164V e K184R. Além disso, a mutação R119Q foi identificada em amostras provenientes de todas as formas clínicas avaliadas – AC, HAM/TSP, ATLL e IDH –, porém mais frequente em AC,

sugerindo que pode ser fator de proteção, mas são necessários mais estudos. É possível perceber que existem especificidades genômicas e patogênicas para cada uma das manifestações clínicas.

Já na caracterização de LTR, resultado da subseção 2 (VI.1.2), observa-se mutações que impactam na criação ou deleção de sítios de transcrição, podendo influenciar a expressão de determinados genes que têm seus promotores nessas regiões. Rego et al., 2016 relatou algumas mutações em LTR que resultaram nessas alterações, que podem afetar a expressão viral, tanto diminuindo como aumentando.

Apesar dos estudos para entender os fatores que levam a aumento ou diminuição de expressão viral, de carga proviral ou desenvolvimento de doenças, os esforços ainda são poucos comparado ao que poderia ser feito. Com base nas duas revisões sistemáticas apresentadas nas seções dois e três (VI.2 e VI.3) deste trabalho, existem poucas sequências de genomas completos disponibilizadas nos bancos de dados, sendo os genomas parciais focados nas regiões LTR e pX, seguidos da região *env*. Mesmo assim, quando comparado a outros retrovírus, como o HIV – descoberto depois do HTLV – são poucas sequências de genoma completo e parciais publicadas, piorando o cenário quando falamos de sequências com dados clínicos associados. Além disso, pouco investimento é feito na intenção de usar novas metodologias de sequenciamento, sendo Sanger a metodologia ainda mais usada para estudos de HTLV-1 (DE OLIVEIRA ANDRADE et al., 2021)

O trabalho visto na seção VI.2 apresenta resultados interessantes quanto a estudos que sequenciaram alguma região do HTLV-1, porém uma pequena porção deles conseguiu associar as mutações encontradas com o perfil clínico. Destes, Barreto et al., 2016 e Borba et al., 2019 descreveram mutações presentes em ORF-1, que codifica p12 e p8, importantes no processo de disseminação do vírus no organismo (BANERJEE; FEUER; BARKER, 2007; BARRETO et al., 2016; BORBA et al., 2019; KORALNIK et al., 1992; VAN PROOYEN et al., 2010). Socorro et al., 2018 descreveu duas mutações na proteína gp46, codificada por *env*, importante no processo de infecção da célula do hospedeiro.

O impacto das mutações no genoma viral, apesar de muitas vezes não ser completamente elucidado, pode estar relacionado à carga proviral do indivíduo (normalmente elevada nos casos sintomáticos), como observado no estudo de Barreto et al. de 2017, onde as mutações S63P e R83C da ORF-1 foram associadas à alta carga proviral e HAM/TSP, assim como as mutações em LTR, G126C/T, G306C, e C479T, em regiões de sítio de ligação de fatores de transcrição, estando presentes em indivíduos com baixa carga proviral/assintomáticos (BARRETO et al., 2016; REGO et al., 2016).

Além disso, podem estar associadas à estrutura dimensional da proteína e também alterando propriedades físico-químicas (influenciando as ligações com outras moléculas), o que

foi observado como consequência das mutações V15M, P65L, R119Q, I164V e K184R no estudo de 2021, onde foi descrito alteração na flexibilidade, acesso à proteína, antigenicidade e outras características, podendo alterar a funcionalidade da proteína HBZ (CUCCO et al., 2021). Esses fatores de possível impacto na função das proteínas e de regiões como LTR ressaltam o quão importante é manter uma vigilância molecular desse vírus, e consequentemente possibilitando o desenvolvimento de terapias e tratamentos que sejam focados em neutralizar a ação do HTLV-1.

Os recursos e informações devem ser trabalhados de forma a desenvolver conhecimento com capacidade de ajudar os mais impactados pela infecção: os pacientes. A geração de genomas completos, uso de metodologias mais recentes, disponibilização de informações clínicas e epidemiológicas, adicionado à caracterização dessas sequências, e estratégias de prevenção disseminadas mundialmente, poderá favorecer o caminho para o tratamento e erradicação de infecções como o HTLV-1.

VIII. PERSPECTIVA DE ESTUDO

O grupo pretende dar continuidade no trabalho, abrangendo também as mutações e fatores do hospedeiro que possam contribuir no estabelecimento e desenvolvimento das doenças associadas ao vírus. Os próximos passos seriam, além de sequenciar novas amostras e apenas identificar as mutações, fazer uma análise de expressão, para avaliar qual o impacto das mutações na expressão de genes, tanto virais como do hospedeiro.

IX. CONCLUSÃO

Os resultados descritos neste trabalho demonstram que:

- As mutações V15M (exclusiva de HAM/TSP) e R119Q (mais frequente em AC), identificadas na proteína HBZ (codificada pelo gene também *hbz*) podem ser importantes fatores no desenvolvimento de HAM/TSP e de proteção ao desenvolvimento das doenças associadas ao HTLV-1, respectivamente.
- As alterações encontradas nos sítios de ligação de fatores de transcrição (adição e exclusão de sítios) podem estar relacionadas a um desequilíbrio da produção e, conseqüentemente, da expressão dos genes virais importantes para disseminação e patogênese do HTLV-1.
- Diversos estudos já identificaram mutações nas diferentes regiões do HTLV-1, entretanto a grande maioria não conseguiu relacionar essas mutações com o desenvolvimento de HAM/TSP. Cinco mutações em ORF-I (C39Y, P45L, S69G, P86S e R88K) duas mutações em *env* - gp46 (S72G e N93D) e duas mutações em *hbz* (V15M e R119Q) foram observadas e relacionadas com o desenvolvimento de HAM/TSP.
- Existem diversas e novas tecnologias de sequenciamento, entretanto a mais utilizada nos trabalhos de HTLV-1 ainda é a metodologia de Sanger. Apesar dos esforços para geração de seqüências, não existem muitos investimentos na área do HTLV e, dos estudos existentes, poucos disponibilizam as seqüências com informações clínica e epidemiológicas que possibilitariam análises genômicas mais completas.

X. SUMMARY

Background: HTLV-1 is a globally distributed pathogen that affects approximately 5 to 10 million people. It is estimated that Brazil has about 800,000 people living with the virus, which characterizes it as one of the countries with the highest absolute number of cases. In Brazil, the North and Northeast regions are the most affected by the virus. HTLV-1 infection can lead to the development of diseases such as ATLL, HAM/TSP and IDH. The HTLV-1 genome has structural genes and a region responsible for encoding accessory and regulatory proteins, important for the establishment, dissemination, and action of the virus. The sequencing of this genome can elucidate factors of this virus that influence the spread and development of clinical manifestations associated with HTLV-1. **Objective:** The main objective of this work is to evaluate the role of mutations in the HTLV-1 genome and its possible association with the development of HTLV-1-associated diseases. **Methods:** Cross-sectional study, with samples from individuals infected with HTLV-1, which were sequenced to identify mutations in the LTR and hbx regions of the virus genome. In addition, two systematic reviews were performed following the PRISMA instructions for deepening and reviewing the study areas. **Results:** Two mutations, V15M and R119Q, were observed in the hbx region, with V15M observed exclusively in HAM/TSP patients, while R119Q appears to be a protective factor for the development of the disease. In LTR, mutations were found that led to the appearance or deletion of transcription factor binding sites. In addition, one of the systematic reviews found four studies that associated mutations in env and ORF-1 with the development of some clinical form. Regarding the sequencing study, the Sanger methodology is more used for the study of HTLV-1. **Conclusions:** It was possible to observe the presence of mutations related to the development of HAM/TSP, such as C39Y, P45L, S69G, P86S and R88K (ORF-I), S72G and N93D (gp46) and V15M and R119Q (HBZ). Alterations in transcription factor binding sites were also observed, which may be related to an imbalance in the production and expression of viral genes. In addition, it was possible to observe that despite advances in sequencing technologies, HTLV-1 studies still work with the first generation of sequencing, Sanger.

Key words: HTLV-1; sequencing; mutation, molecular characterization

REFERÊNCIAS

- ANDRESEN, V. et al. Suppression of HTLV-1 replication by tax-mediated rerouting of the p13 viral protein to nuclear speckles. **Blood**, v. 118, n. 6, p. 1549–1559, 2011.
- BANERJEE, P.; FEUER, G.; BARKER, E. Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 (HTLV-1) p12 I Down-Modulates ICAM-1 and -2 and Reduces Adherence of Natural Killer Cells, Thereby Protecting HTLV-1-Infected Primary CD4 + T Cells from Autologous Natural Killer Cell-Mediated Cytotoxicity despite the R. **Journal of Virology**, v. 81, n. 18, p. 9707–9717, 2007.
- BANGHAM, C. R. M. The immune control and cell-to-cell spread of human T-lymphotropic virus type 1. **Journal of General Virology**, v. 84, n. 12, p. 3177–3189, 2003.
- BARATELLA, M. et al. Cytoplasmic Localization of HTLV-1 HBZ Protein: A Biomarker of HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP). **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 1, p. 1–15, 2017.
- BARRETO, F. K. et al. Analyses of HTLV-1 sequences suggest interaction between ORF-I mutations and HAM/TSP outcome. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 45, n. 3, p. 420–425, nov. 2016.
- BENTLEY, D. R. et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. **Nature**, v. 456, n. 7218, p. 53–59, nov. 2008.
- BINDHU, M.; NAIR, A.; LAIRMORE, M. D. Role of accessory proteins of HTLV-1 in viral replication, T cell activation, and cellular gene expression. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 9, n. 614, p. 2556–2576, 2004.
- BITTENCOURT, A. L. et al. Adult T-cell leukemia/lymphoma in Bahia, Brazil: Analysis of prognostic factors in a group of 70 patients. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 128, n. 5, p. 875–882, 2007.
- BORBA, M. M. N. et al. Assessment of Genetic Diversity of HTLV-1 ORF-I Sequences Collected from Patients with Different Clinical Profiles. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 35, n. 9, p. 881–884, 2019.
- BORBA, M. M. N. **ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÔMICA DO HTLV-1 EM PORTADORES DO VÍRUS COM DIFERENTES CONDIÇÕES CLÍNICAS**. [s.l.] Oswaldo Cruz Foundation - Gonçalo Moniz Institute, 2020.
- BRANCACCIO, R. N. et al. MinION nanopore sequencing and assembly of a complete human papillomavirus genome. **Journal of Virological Methods**, v. 294, p. 114180, 2021.
- CALATTINI, S. et al. Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. **Retrovirology**, v. 2, p. 4–7, 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**, v. 35, n. 5, p. 499–508, 2002.

CATALAN-SOARES, B.; CARNEIRO-PROIETTI, A. B. DE F.; PROIETTI, F. A. Heterogeneous geographic distribution of human T-cell lymphotropic viruses I and II (HTLV-I/II): serological screening prevalence rates in blood donors from large urban areas in Brazil. **Cadernos de saúde pública / Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública**, v. 21, n. 3, p. 926–931, 2005.

CHEN, J. et al. HTLV Type I Isolated from a Pygmy in Cameroon Is Related to but Distinct from the Known Central African Type. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 11, n. 12, p. 1529–1531, 1995.

CIMARELLI, A. et al. Clonal expansion of human T-cell leukemia virus type II in patients with high proviral load. **Virology**, v. 223, n. 2, p. 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**, v. 66, n. 3, p. 1737–1745, 1992.

CIMINALE, V. et al. Mitochondrial targeting of the p13(II) protein coded by the x-II ORF of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I (HTLV-I). **Oncogene**, v. 18, n. 31, p. 4505–4514, 1999.

CLERC, I. et al. An interaction between the human T cell leukemia virus type 1 basic leucine zipper factor (HBZ) and the KIX domain of p300/CBP contributes to the down-regulation of tax-dependent viral transcription by HBZ. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 35, p. 23903–23913, 2008.

COHEN-GIHON, I. et al. Identification and Whole-Genome Sequencing of a Monkeypox Virus Strain Isolated in Israel. **Microbiology Resource Announcements**, v. 9, n. 10, p. 5–6, 2020.

CUCCO, M. S. et al. Molecular characterization of HTLV-1 genomic region hbz from patients with different clinical conditions. **Journal of Medical Virology**, v. 93, n. 11, p. 6418–6423, 2021.

DE JESUS, J. G. et al. Acute Vector-Borne Viral Infection: Zika and MinION Surveillance. **Microbiology Spectrum**, v. 7, n. 4, p. 1–12, 2019.

DE OLIVEIRA ANDRADE, F. et al. An overview of sequencing technology platforms applied to HTLV-1 studies: a systematic review. **Archives of Virology**, v. 166, n. 11, p. 3037–3048, 2021.

DE THÉ, G.; BOMFORD, R. An HTLV-I Vaccine: Why, How, for Whom? **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 9, n. 5, p. 381–386, maio 1993.

- DEMONTIS, M. A.; HILBURN, S.; TAYLOR, G. P. Human T cell lymphotropic virus type 1 viral load variability and long-term trends in asymptomatic carriers and in patients with human T cell lymphotropic virus type 1-related diseases. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 29, n. 2, p. 359–364, 2013.
- DING, W. et al. Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 p12 I Expression Increases Cytoplasmic Calcium To Enhance the Activation of Nuclear Factor of Activated T Cells. **Journal of Virology**, v. 76, n. 20, p. 10374–10382, 15 out. 2002.
- DOURADO, I. et al. HTLV-I in the General Population of Salvador, Brazil. **JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 34, n. 5, p. 527–531, 2003.
- ENOSE-AKAHATA, Y.; VELLUCCI, A.; JACOBSON, S. Role of HTLV-1 Tax and HBZ in the pathogenesis of HAM/TSP. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. DEC, p. 1–10, 2017.
- FRANCHINI, G. Molecular mechanisms of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I infection. **Blood**, v. 86, n. 10, p. 3619–3639, 1995.
- FUTSCH, N.; MAHIEUX, R.; DUTARTRE, H. HTLV-1, the Other Pathogenic Yet Neglected Human Retrovirus: From Transmission to Therapeutic Treatment. **Viruses**, v. 10, n. 1, p. 1, 21 dez. 2017.
- GALLO, R. C. Research and discovery of the first human cancer virus, HTLV-1. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 24, n. 4, p. 559–565, 2011.
- GALVAO-CASTRO, B. et al. Distribution of human T-lymphotropic virus type I among blood donors: A nationwide Brazilian study. **Transfusion**, v. 37, n. 2, p. 242–243, 1997.
- GASMI, M. et al. Long Terminal Repeat Sequence Analysis of HTLV Type I Molecular Variants Identified in Four North African Patients. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 10, n. 10, p. 1313–1315, 1994.
- GAUDRAY, G. et al. The Complementary Strand of the Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 RNA Genome Encodes a bZIP Transcription Factor That Down-Regulates Viral Transcription. **Journal of Virology**, v. 76, n. 24, p. 12813–12822, 2002.
- GESSAIN, A. et al. Antibodies To Human T-Lymphotropic Virus Type-I in Patients With Tropical Spastic Paraparesis. **The Lancet**, v. 326, n. 8452, p. 407–410, 1985.
- 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. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 17, p. 7694–7698, 1991.
- GESSAIN, A.; CASSAR, O. Epidemiological aspects and world distribution of HTLV-1 infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. NOV, p. 1–23, 2012.
- GESSAIN, A.; GALLO, R. C.; FRANCHINI, G. Low degree of human T-cell

leukemia/lymphoma virus type I genetic drift in vivo as a means of monitoring viral transmission and movement of ancient human populations. **Journal of Virology**, v. 66, n. 4, p. 2288–2295, 1992.

GHEZ, D. et al. Neuropilin-1 Is Involved in Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 Entry. **Journal of Virology**, v. 80, n. 14, p. 6844–6854, 2006.

GHORBEL, S. et al. Human T-cell leukemia virus type I p30 nuclear/nucleolar retention is mediated through interactions with RNA and a constituent of the 60 S ribosomal subunit. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 48, p. 37150–37158, 2006.

GIAM, C. Z.; SEMMES, O. J. HTLV-1 infection and adult T-cell leukemia/ lymphoma-A tale of two proteins: Tax and HBZ. **Viruses**, v. 8, n. 6, 2016.

GONCALVES, D. U. et al. HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) inflammatory network. **Inflammation and Allergy - Drug Targets**, v. 7, n. 2, p. 98–107, 2008.

GRANT, C. et al. Human T cell leukemia virus type I and neurologic disease: Events in bone marrow, peripheral blood, and central nervous system during normal immune surveillance and neuroinflammation. **Journal of Cellular Physiology**, v. 190, n. 2, p. 133–159, 2002.

HAHN, B. H. et al. Molecular cloning and analysis of a new variant of human T-cell leukemia virus (HTLV-Ib) from an African patient with adult T-cell leukemia-lymphoma. **International Journal of Cancer**, v. 34, n. 5, p. 613–618, 1984.

HANON, E. et al. Fracticide among CD8+ T lymphocytes naturally infected with human T cell lymphotropic virus type I. **Immunity**, v. 13, n. 5, p. 657–664, 2000.

HEO, Y. **IMPROVING QUALITY OF HIGH-THROUGHPUT SEQUENCING READS.**
[s.l: s.n.].

HINUMA, Y. et al. Adult T-cell leukemia: Antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera (immunofluorescence/lymphoid cell line/specific antibody/type C virus). **Medical Sciences**, v. 78, n. 10, p. 6476–6480, 1981.

HIVIN, P. et al. Nuclear localization of HTLV-I bZIP factor (HBZ) is mediated by three distinct motifs. **Journal of Cell Science**, v. 118, n. 7, p. 1355–1362, 2005.

HÖLLSBERG, P.; HAFLER, D. A. What is the pathogenesis of human T-cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis? **Annals of Neurology**, v. 37, n. 2, p. 143–145, 1995.

IGAKURA, T. et al. Spread of HTLV-I Between Lymphocytes by Virus-Induced Polarization of the Cytoskeleton. **Science**, v. 299, n. 5613, p. 1713–1716, 14 mar. 2003.

IJICHI, S.; OSAME, M. Human T Lymphotropic Virus Type I (HTLV-I)-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP). Recent Perspectives.

Internal Medicine, v. 34, n. 8, p. 713–721, 1995.

IP, C. L. C. et al. MinION Analysis and Reference Consortium: Phase 1 data release and analysis. **F1000Research**, v. 4, p. 1075, 15 out. 2015.

JACOBSON, S. Immunopathogenesis of human T cell lymphotropic virus type I-associated neurologic disease. **Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. SUPPL. 2, p. 187–192, 2002.

JOHNSON, J. M.; HARROD, R.; FRANCHINI, G. Molecular biology and pathogenesis of the human T-cell leukaemia/lymphotropic virus type-1 (HTLV-1). **International Journal of Experimental Pathology**, v. 82, n. 3, p. 135–147, 2001.

JONES, K. S. et al. Molecular aspects of HTLV-1 entry: Functional domains of the HTLV-1 surface subunit (SU) and their relationships to the entry receptors. **Viruses**, v. 3, n. 6, p. 794–810, 2011.

KALYAANAMOORTHY, S. et al. ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates. **Nature Methods**, v. 14, n. 6, p. 587–589, 30 maio 2017.

KALYANARAMAN, V. S. et al. A New Subtype of Human T-Cell Leukemia Virus (HTLV-II) Associated with a T-Cell Variant of Hairy Cell Leukemia. **Science**, v. 218, n. 4572, p. 571–573, 5 nov. 1982.

KATAOKA, K. et al. Integrated molecular analysis of adult T cell leukemia/lymphoma. **Nature Genetics**, v. 47, n. 11, p. 1304–1315, 2015.

KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 4, p. 772–780, abr. 2013.

KAWATSUKI, A. et al. HTLV-1 bZIP factor protein targets the Rb/E2F-1 pathway to promote proliferation and apoptosis of primary CD4+ T cells. **Oncogene**, v. 35, n. 34, p. 4509–4517, 25 ago. 2016.

KCHOUK, M.; GIBRAT, J. F.; ELLOUMI, M. Generations of Sequencing Technologies: From First to Next Generation. **Biology and Medicine**, v. 09, n. 03, 2017.

KIYOKAWA, T.; SEIKI, M.; IWASHITA, S. p27(x-III) and p21(x-III), proteins encoded by the pX sequence of human T-cell leukemia virus type I. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, n. 24, p. 8359–8363, 1985.

KNIGHT, S. C. et al. DENDRITIC CELLS IN HIV-1 AND HTLV-1 INFECTION. **Fundamental and Clinical Immunology**, p. 545–549, 1993.

KORALNIK, I. J. et al. Protein isoforms encoded by the pX region of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 18, p. 8813–8817, 1992.

KOYANAGI, Y. et al. **In Vivo Infection of Human T-Cell Leukemia Virus Type I in Non-**

T Cells Virology, 1993.

KUBOTA, S.; HATANAKA, M.; POMERANTZ, R. J. Nucleo-cytoplasmic redistribution of the HTLV-I rex protein: Alterations by coexpression of the HTLV-I p21x protein. **Virology**, v. 220, n. 2, p. 502–507, 1996.

LA GRENADE, L. et al. Clinical, pathologic, and immunologic features of human T-lymphotrophic virus type I-associated infective dermatitis in children. **Archives of Dermatology**, v. 134, n. 4, p. 439–444, 1998.

LAGRENADE, L. et al. Infective dermatitis of Jamaican children: a marker for HTLV-I infection. **The Lancet**, v. 336, n. 8727, p. 1345–1347, dez. 1990.

LEE, S. M. et al. HTLV-1 induced molecular mimicry in neurological disease. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 296, p. 125–136, 2005.

LEVIN, M. C. et al. Autoimmunity due to molecular mimicry as a cause of neurological disease. **Nature Medicine**, v. 8, n. 5, p. 509–513, maio 2002.

LEVIN, M. C.; JACOBSON, S. Cellular and humoral immune responses associated with HTLV-I associated Myelopathy/Tropical spastic paraparesis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 835, p. 142–152, 1997.

LIU, L. et al. Comparison of next-generation sequencing systems. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, 2012.

LOMAN, N. J. et al. Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. **Nature Biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 434–439, 2012.

LU, H.; GIORDANO, F.; NING, Z. Oxford Nanopore MinION Sequencing and Genome Assembly. **Genomics, Proteomics and Bioinformatics**, v. 14, n. 5, p. 265–279, 2016.

MAHIEUX, R. et al. Molecular epidemiology of 58 new African human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) strains: identification of a new and distinct HTLV-1 molecular subtype in Central Africa and in Pygmies. **Journal of Virology**, v. 71, n. 2, p. 1317–1333, 1997.

MANEL, N. et al. Institut de Genetique Moleculaire de Montpellier, CNRS UMR 5535/IFR 122, F-34293 Montpellier Cedex 5, France. **Cell**, p. 3218–3241, 2004.

MANEL, N.; BATTINI, J. L.; SITBON, M. Human T cell leukemia virus envelope binding and virus entry are mediated by distinct domains of the glucose transporter GLUT1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 32, p. 29025–29029, 2005.

MANN, A. et al. Quantitative Proviral DNA and Antibody Levels in the Natural History of HTLV-I Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 180, n. 5, p. 1487–1493, 1999.

MARTEL, M.; GOTUZZO, E. HTLV-1 Is Also a Sexually Transmitted Infection. **Frontiers in Public Health**, v. 10, n. March, p. 1–6, 2022.

MARTIN, F.; TAGAYA, Y.; GALLO, R. Time to eradicate HTLV-1: an open letter to WHO.

- The Lancet**, v. 391, n. 10133, p. 1893–1894, 2018.
- MARUYAMA, M. et al. Evidence for aberrant activation of the interleukin-2 autocrine loop by HTLV-1-encoded p40x and T3/Ti complex triggering. **Cell**, v. 48, n. 2, p. 343–350, 1987.
- MASOUDI-NEJAD, A.; NARIMANI, Z.; HOSSEINKHAN, N. **Next Generation Sequencing and Sequence Assembly**. New York, NY: Springer New York, 2013. v. 4
- MATSUOKA, M. Human T-cell leukemia virus type I and adult T-cell leukemia. **Oncogene**, v. 22, n. 33 REV. ISS. 2, p. 5131–5140, 2003.
- MATSUOKA, M. Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) infection and the onset of adult T-cell leukemia (ATL). **Retrovirology**, v. 2, p. 1–13, 2005.
- MATSUOKA, M.; JEANG, K. T. Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 4, p. 270–280, 2007.
- MATUTES, E. Adult T-cell leukaemia/lymphoma. **Journal of Clinical Pathology**, v. 60, n. 12, p. 1373–1377, 2007.
- MAXAM, A. M.; GILBERT, W. A new method for sequencing DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 2, p. 560–564, fev. 1977.
- MCCALLUM, R. M. et al. Arthritis syndromes associated with human T cell lymphotropic virus type I infection. **Medical Clinics of North America**, v. 81, n. 1, p. 261–276, 1997.
- MIKHEYEV, A. S.; TIN, M. M. Y. A first look at the Oxford Nanopore MinION sequencer. **Molecular Ecology Resources**, v. 14, n. 6, p. 1097–1102, 2014.
- MINH, B. Q. et al. IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. **Molecular Biology and Evolution**, v. 37, n. 5, p. 1530–1534, 1 maio 2020.
- MITOBE, Y. et al. HTLV-1 bZIP Factor RNA and protein impart distinct functions on t-cell proliferation and survival. **Cancer Research**, v. 75, n. 19, p. 4143–4152, 2015.
- MIURA, T. et al. Phylogenetic subtypes of human T-lymphotropic virus type I and their relations to the anthropological background. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 3, p. 1124–1127, 1994.
- MIURA, T. et al. Molecular phylogeny of human T-cell leukemia virus type I and II of Amerindians in Colombia and Chile. **Journal of Molecular Evolution**, v. 44, n. SUPPL. 1, p. 76–82, 1997.
- MOCHIZUKI, M. et al. Uveitis associated with human T-cell lymphotropic virus type I. **American Journal of Ophthalmology**, v. 114, n. 2, p. 123–129, 1992.
- MONTANHEIRO, P. A. et al. The elevated interferon gamma production is an important immunological marker in HAM/TSP pathogenesis. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 70, n. 4, p. 403–407, 2009.

- MOTA-MIRANDA, A. C. A. et al. Molecular study of HBZ and gp21 human t cell leukemia virus type 1 proteins isolated from different clinical profile infected individuals. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 29, n. 10, p. 1370–1372, 2013.
- MUNIZ, A. L. et al. Association of cytokines, neurological disability, and disease duration in HAM/TSP patients. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 64, n. 2 A, p. 217–221, 2006.
- MURATA, K. et al. A Novel Alternative Splicing Isoform of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 bZIP Factor (HBZ-SI) Targets Distinct Subnuclear Localization. **Journal of Virology**, v. 80, n. 5, p. 2495–2505, 2006.
- NAKAMURA, S. et al. Detection of tumor necrosis factor- α -positive cells in cerebrospinal fluid of patients with HTLV-I-associated myelopathy. **Journal of Neuroimmunology**, v. 42, n. 2, p. 127–130, 1993.
- NATH, M. D. et al. Regulation of the cell-surface expression of an HTLV-I binding protein in human T cells during immune activation. **Blood**, v. 101, n. 8, p. 3085–3092, 2003.
- NEJMEDDINE, M. et al. HTLV-1-Tax and ICAM-1 act on T-cell signal pathways to polarize the microtubule-organizing center at the virological synapse. **Blood**, v. 114, n. 5, p. 1016–1025, 2009.
- NEJMEDDINE, M.; BANGHAM, C. R. M. The HTLV-1 virological synapse. **Viruses**, v. 2, n. 7, p. 1427–1447, 2010.
- NETO, W. K. et al. Correlation between LTR point mutations and proviral load levels among Human T cell Lymphotropic Virus type 1 (HTLV-1) asymptomatic carriers. **Virology Journal**, v. 8, n. 1, p. 535, 2011.
- NICOT, C. et al. HTLV-1-encoded p30II is a post-transcriptional negative regulator of viral replication. **Nature Medicine**, v. 10, n. 2, p. 197–201, 2004.
- OKAYAMA, A. et al. Role of HTLV-1 proviral DNA load and clonality in the development of adult T-cell leukemia/lymphoma in asymptomatic carriers. **International Journal of Cancer**, v. 110, n. 4, p. 621–625, 2004.
- OSAME, M. et al. Htlv-I Associated Myelopathy, a New Clinical Entity. **The Lancet**, v. 327, n. 8488, p. 1031–1032, 1986.
- OSAME, M. Pathological mechanisms of human T-cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy (HAM/TSP). **Journal of NeuroVirology**, v. 8, n. 5, p. 359–364, 2002.
- PAIS-CORREIA, A. M. et al. Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses. **Nature Medicine**, v. 16, n. 1, p. 83–89, 2010.
- PEREIRA, F. M. et al. Evidence of new endemic clusters of human T-cell leukemia virus (HTLV) infection in Bahia, Brazil. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. MAY, p. 1–12, 2019.
- PINEDA, M. V. et al. Relevance of HTLV-1 proviral load in asymptomatic and symptomatic

- patients living in endemic and non-endemic areas of Argentina. **PLoS ONE**, v. 14, n. 11, p. 1–10, 2019.
- PIÑON, J. D. et al. Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Envelope Glycoprotein gp46 Interacts with Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycans. **Journal of Virology**, v. 77, n. 18, p. 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. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, n. 12 II, p. 7415–7419, 1980.
- RAVAL, G. U. et al. Localization, quantification and interaction with host factors of endogenous HTLV-1 HBZ protein in infected cells and ATL. **Retrovirology**, v. 12, n. 1, p. 1–15, 2015.
- REGO, F. F. D. A. et al. Deep sequencing analysis of Human T cell lymphotropic virus Type 1 long terminal repeat 5' region from patients with tropical spastic Paraparesis/Human T cell lymphotropic virus Type 1-associated myelopathy and asymptomatic carriers. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 32, n. 3, p. 279–283, 2016.
- REUTER, J. A.; SPACEK, D. V.; SNYDER, M. P. High-Throughput Sequencing Technologies. **Molecular Cell**, v. 58, n. 4, p. 586–597, maio 2015.
- RHOADS, A.; AU, K. F. PacBio Sequencing and Its Applications. **Genomics, Proteomics and Bioinformatics**, v. 13, n. 5, p. 278–289, 2015.
- RICHARDSON, J. H. et al. In vivo cellular tropism of human T-cell leukemia virus type 1. **Journal of Virology**, v. 64, n. 11, p. 5682–5687, 1990.
- ROCHA, C.; BARRETO, F. Avaliação Da Proteína Hbz No Desenvolvimento Da Leucemia/Linfoma De Células T Do Adulto: Uma Revisão Sistemática. **Saúde.com**, v. 14, n. 4, p. 1303–1309, 2018.
- ROSADAS, C.; TAYLOR, G. P. Mother-to-child HTLV-1 transmission: Unmet research needs. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. MAY, p. 1–18, 2019.
- ROTHBERG, J. M. et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. **Nature**, v. 475, n. 7356, p. 348–352, 2011.
- SAKAI, J. A. et al. In vitro spontaneous lymphoproliferation in patients with human T-cell lymphotropic virus type I-associated neurologic disease: Predominant expansion of CD8+ T cells. **Blood**, v. 98, n. 5, p. 1506–1511, 2001.
- SALEMI, M. et al. Two new human T-lymphotropic virus type I phylogenetic subtypes in seroindeterminates, a Mbuti pygmy and a gabonese, have closest relatives among African STLV-1 strains. **Virology**, v. 246, n. 2, p. 277–287, 1998.

- SANGER, F.; COULSON, A. R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. **Journal of Molecular Biology**, v. 94, n. 3, p. 441–448, 1975.
- SATOU, Y. et al. HTLV-I basic leucine zipper factor gene mRNA supports proliferation of adult T cell leukemia cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 3, p. 720–725, 2006.
- SEIKI, M. et al. Human adult T-cell leukemia virus: Complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 80, n. 12 I, p. 3618–3622, 1983.
- SEIKI, M. et al. Nonspecific integration of the HTLV provirus genome into adult T-cell leukaemia cells. **Nature**, v. 309, n. 5969, p. 640–642, jun. 1984.
- SETOYAMA, M. et al. Detection of HTLV-1 by polymerase in situ hybridization in adult T-cell leukemia/lymphoma. **American Journal of Pathology**, v. 152, n. 3, p. 683–689, 1998.
- SHENDURE, J.; JI, H. Next-generation DNA sequencing. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 10, p. 1135–1145, 2008.
- SHIMOYAMA, M. Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukaemia-lymphoma. **British Journal of Haematology**, v. 79, n. 3, p. 428–437, nov. 1991.
- SMITH, M. R.; GREENE, W. C. Characterization of a novel nuclear localization signal in the HTLV-I tax transactivator protein. **Virology**, v. 187, n. 1, p. 316–320, 1992.
- TANAKA-NAKANISHI, A. et al. HTLV-1 bZIP factor suppresses apoptosis by attenuating the function of FoxO3a and altering its localization. **Cancer Research**, v. 74, n. 1, p. 188–200, 2014.
- THI HOANG, D. et al. UFBoot2: Improving the Ultrafast Bootstrap Approximation. **Mol. Biol. Evol.**, v. 35, n. 2, p. 518–522, 2017.
- THUDI, M. et al. Current state-of-art of sequencing technologies for plant genomics research. **Briefings in Functional Genomics**, v. 11, n. 1, p. 3–11, 2012.
- TREVIÑO, A. et al. Molecular epidemiology and clinical features of human T cell lymphotropic virus type 1 infection in Spain. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 30, n. 9, p. 856–862, 2014.
- TSCHACHLER, E. et al. Human T-lymphotropic virus type I tax regulates the expression of the human lymphotoxin gene. **Blood**, v. 81, n. 1, p. 95–100, 1993.
- UCHIYAMA, T. et al. Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. **Blood**, v. 50, n. 3, p. 481–92, set. 1977.
- UMEHARA, F. et al. Cytokine Expression in the Spinal Cord Lesions in HTLV-I-associated Myelopathy. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 53, n. 1, p. 72–77, jan. 1994.

- URETA-VIDAL, A. et al. Mother-to-child transmission of human T-cell-leukemia/lymphoma virus type I: Implication of high antiviral antibody titer and high proviral load in carrier mothers. **International Journal of Cancer**, v. 82, n. 6, p. 832–836, 1999.
- VAN DOOREN, S. et al. Evidence for a post-Columbian introduction of human T-cell lymphotropic virus in Latin America. **Journal of General Virology**, v. 79, n. 11, p. 2695–2708, 1998.
- VAN DOOREN, S. J. A. **Molecular investigation of the evolutionary history and diversity of primate T-lymphotropic virus types 1 and 3.** [s.l.: s.n.].
- VAN PROOYEN, N. et al. Human T-cell leukemia virus type 1 p8 protein increases cellular conduits and virus transmission. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 48, p. 20738–20743, 2010.
- VANDAMME, A. M. et al. **Primate T-Lymphotropic Virus Type I LTR Sequence Variation and Its Phylogenetic Analysis: Compatibility with an African Origin of PTLV-IVirology**, 1994.
- VARMUS, H. E. Form and function of retroviral proviruses. **Science**, v. 216, n. 4548, p. 812–820, 1982.
- VIDAL, A. U. et al. Phylogenetic classification of human T cell leukaemia/lymphoma virus type I genotypes in five major molecular and geographical subtypes. **Journal of General Virology**, v. 75, n. 12, p. 3655–3666, 1994.
- WATTEL, E. et al. Clonal expansion of human T-cell leukemia virus type I-infected cells in asymptomatic and symptomatic carriers without malignancy. **Journal of Virology**, v. 69, n. 5, p. 2863–2868, 1995.
- WOLFE, N. D. et al. Emergence of among central unique African primate viruses bushmeat hunters. **Pnas**, v. 102, n. 22, p. 7994–7999, 2005.
- YAMAMOTO-TAGUCHI, N. et al. HTLV-1 bZIP Factor Induces Inflammation through Labile Foxp3 Expression. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 9, p. 1–12, 2013.
- YAMANO, Y.; SATO, T. Clinical pathophysiology of human T-lymphotropic virus-type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. NOV, p. 1–10, 2012.
- YASUNAGA, J. I.; MATSUOKA, M. Human T-cell leukemia virus type I induces adult T-cell leukemia: From clinical aspects to molecular mechanisms. **Cancer Control**, v. 14, n. 2, p. 133–140, 2007.
- YE, J. et al. HTLV-1 Rex is required for viral spread and persistence in vivo but is dispensable for cellular immortalization in vitro. **Blood**, v. 102, n. 12, p. 3963–3969, 1 dez. 2003.
- YOSHIDA, M. et al. Transcriptional Control of Spliced and Unspliced Human T-Cell

Leukemia Virus Type 1 bZIP Factor (HBZ) Gene. **Journal of Virology**, v. 82, n. 19, p. 9359–9368, 2008.

YOUNIS, I.; GREEN, P. L. The human T-cell leukemia virus Rex protein. **Frontiers in Bioscience**, v. 10, n. 1, p. 431–445, 2005.

ZHANG, W. et al. Human T-Lymphotropic Virus Type 1 p30 II Functions as a Transcription Factor and Differentially Modulates CREB-Responsive Promoters . **Journal of Virology**, v. 74, n. 23, p. 11270–11277, 2000.

ZHAO, T. et al. Human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor selectively suppresses the classical pathway of NF- κ B. **Blood**, v. 113, n. 12, p. 2755–2764, 2009.

ANEXO 1



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Aprimoramento do diagnóstico laboratorial do HTLV-1 e avaliação da carga proviral como biomarcador de evolução da HAM/TSP: comparação de ensaios de diagnósticos, padronização da detecção da carga proviral e análise da indeterminação diagnóstica

Pesquisador: Bernardo Galvão Castro Filho

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 11594513.3.0000.5544

Instituição Proponente: Fundação Bahiana para Desenvolvimento das Ciências

Patrocinador Principal: CONS NAC DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLÓGICO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 464.286

Data da Relatoria: 30/10/2013

Apresentação do Projeto:

As infecções pelos HTLV-1/2 estão disseminadas em todas as regiões do Brasil, porém esta distribuição é heterogênea, observando-se taxas mais elevadas no Norte e Nordeste. Estima-se que o Brasil tenha o maior número absoluto (2 milhões) de indivíduos infectados pelo HTLV-1 no mundo.

Este vírus causa a leucemia/linfoma de células T do adulto, a paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1 (PET/MAH), uveíte associada ao HTLV-1, dermatite infectiva e alterações imunológicas. Há poucas evidências da associação do HTLV-2 com doença. O diagnóstico laboratorial do HTLV-1/2 é feito com testes de triagem (ELISA) e confirmatórios (Western Blot, PCR). Porém em alguns casos, o diagnóstico é indeterminado pela técnica de WB e a técnica de PCR ainda não foi padronizada para uso em larga escala. Levando-se isto em consideração, propusemos contribuir para o

Endereço: AVENIDA DOM JOÃO VI, Nº 275

Bairro: BROTAS

UF: BA

Município: SALVADOR

Telefone: (71)3276-8225

CEP: 40.290-000

E-mail: cep@bahiana.edu.br



Continuação do Parecer: 464.286

aprimoramento

do diagnóstico laboratorial do HTLV-1 e avaliar se carga proviral é um biomarcador de evolução da HAM/TSP, com isso, pretendemos comparar a sensibilidade e especificidade, valor preditivo positivo e negativo de testes de diagnóstico laboratoriais (ELISA e WB) disponíveis no mercado nacional. Além de padronizar a detecção da carga proviral e analisar as possíveis indeterminações diagnósticas.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Contribuir para o aprimoramento do diagnóstico laboratorial do HTLV-1 e avaliar a carga proviral como biomarcador de evolução da HAM/TSP.

Objetivos Secundários:

- 1) Comparar a sensibilidade e especificidade, valor preditivo positivo e negativo de testes de diagnóstico laboratorial (ELISA e WB) disponíveis no mercado nacional;
- 2) Padronizar a técnica da detecção da carga proviral (CPV) ;
- 3) Analisar as causas da indeterminação diagnóstica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O pesquisador informa que não haverá nenhum risco para os pacientes porque as amostras a serem testadas já estão disponíveis no biobanco do Centro HTLV. As amostras a serem utilizadas são constituídas por células mononucleares do sangue periférico, plasma e soros de 100 indivíduos infectados pelo HTLV-1. O sangue periférico foi coletado, por punção venosa da veia cubital. Os soros/plasma e as amostras de DNA constituiram um painel de soros e de DNA que serão testados anonimamente. O sigilo em relação aos pacientes será guardado.

Benefícios:

O elevado custo dos kits para detecção da infecção pelo HTLV-1/2 muitas vezes inviabiliza a

Endereço: AVENIDA DOM JOÃO VI, Nº 275

Bairro: BROTAS

UF: BA

Município: SALVADOR

CEP: 40.290-000

Telefone: (71)3276-8225

E-mail: cep@bahiana.edu.br



Continuação do Parecer: 464.286

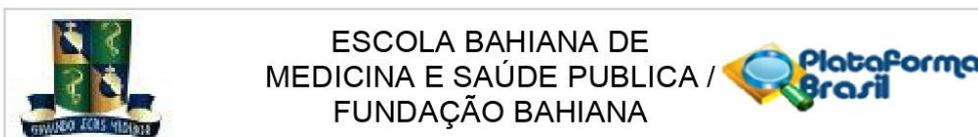
detecção

destes vírus em populações de risco impedindo uma sistematização da vigilância epidemiológica. A falta desta vigilância contribui para a disseminação da infecção principalmente por via perinatal desde que a triagem perinatal não é mandatória no Brasil com exceção de Minas Gerais. O diagnóstico da infecção pelo HTLV é complexo. Esta complexidade é agravada no Brasil devido a que não existe uma norma clara e precisa do Ministério da Saúde indicando um fluxograma para o diagnóstico da infecção, o que resulta na indefinição sobre o status infeccioso do indivíduo. A ausência desta diretriz desobriga os laboratórios e bancos de sangue de realizar os testes confirmatórios que definem o diagnóstico laboratorial definitivo da infecção. Portanto, deixando dúvidas em relação a um caso suspeito o que resulta graves danos no seu bem estar físico e mental impactando negativamente na sua qualidade de vida. Além disso não permite que estes indivíduos sejam acompanhados clinicamente o que resultará graves consequências na saúde dos mesmos. Em resumo, o conhecimento do status de portador permite o adequado aconselhamento evitando a transmissão da infecção. Além disso, o melhor entendimento da indeterminação sorológica poderá contribuir para a manufatura de testes nacionais mais sensíveis e específicos para a população brasileira. Desta forma, evitase o dispendioso custo para o esclarecimento do diagnóstico laboratorial.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Para alcançar os objetivos, o pesquisador informa que utilizará as seguintes estratégias e metodologias:
Objetivo 1: será determinada a capacidade dos ELISAs em identificar casos suspeitos de infecção por HTLV

Endereço: AVENIDA DOM JOÃO VI, Nº 275	CEP: 40.290-000
Bairro: BROTAS	
UF: BA	Município: SALVADOR
Telefone: (71)3276-8225	E-mail: cep@bahiana.edu.br



Continuação do Parecer: 464.286

-1 e HTLV-2;

Objetivo 2: nesta etapa serão comparadas as técnicas TaqMan e SBYER Green, avaliadas a sensibilidade e especificidade das técnicas de detecção de CPV utilizando as regiões tax e pol e analisadas a sensibilidade das técnicas a partir de sangue total e PBMC. O sangue periférico, as células mononucleares do sangue periférico (PBMC);

Objetivo 3: nesta etapa serão sequenciadas as regiões gênicas codificantes das proteínas gp46, gp21, p19, p24 e p12 (HTLV-1) provenientes de indivíduos soro indeterminados, positivos, não tipados, e com resultado falso-positivo para coinfeção HTLV-1/HTLV-2 no WB, o que permitirá a identificação de mutações no genoma proviral que codifica as proteínas referidas. Estas proteínas serão também caracterizadas quanto ao perfil físico-químico, à apresentação de epítomos alelo-específico, assinaturas proteicas, e síntese de RNA. Serão feitas comparações de valores da CPV nos diferentes grupos de indivíduos envolvidos nesta etapa de estudo. Verificar-se-á também se existe uma associação entre a frequência dos alelos da p12 e a CPV, como também com as manifestações clínicas e o perfil sorológico;

Diagnóstico da infecção pelo HTLV-1/2: de todas as amostras, (positivas para o HTLV-1 e HTLV- 2, indeterminadas, não tipadas, HTLV-1/2 e as provenientes de indivíduos com coinfeção (HTLV-1 e HTLV-2), foi extraído o DNA a partir de sangue total, utilizando o QIAGEN QIAamp® DNA Blood Kit. O DNA foi submetido a duas nested-PCR para a região LTR e uma nested-PCR para o gene pol, para confirmar a infecção pelo HTLV-1 nos indivíduos com resultado inconclusivo no WB. Dois fragmentos complementares para a região LTR foram amplificados: o fragmento LTR-gag com 473 pb e o fragmento tax-LTR a uma eletroforese em gel de agarose a 1% com brometo de etídio e

Endereço: AVENIDA DOM JOÃO VI, Nº 275

Bairro: BROTAS

UF: BA

Município: SALVADOR

Telefone: (71)3276-8225

CEP: 40.290-000

E-mail: cep@bahiana.edu.br



Continuação do Parecer: 464.286

visualizados sob luz

ultravioleta;

Os pacientes com perfil de WB indeterminado e não tipado, no W.Blot e com infecção confirmada por detecção molecular, serão convocados para uma nova coleta de sangue

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentados de forma satisfatória.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sanadas as pendências anteriormente assinaladas, projeto exequível que atende à REs. 466/12.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

É da responsabilidade do pesquisador responsável o encaminhamento dos relatórios parciais /final. O não cumprimento implicará na não apreciação de novos projetos deste pesquisador.

SALVADOR, 22 de Novembro de 2013

Assinador por:
Roseny Ferreira
(Coordenador)

Endereço: AVENIDA DOM JOÃO VI, Nº 275

Bairro: BROTAS

UF: BA

Município: SALVADOR

CEP: 40.290-000

Telefone: (71)3276-8225

E-mail: cep@bahiana.edu.br