

Olga Maria Carvalho Pfeilsticker

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Grupo Interdisciplinar de Pesquisa em HTLV-1 e 2:  
PESQUISA DO VÍRUS HTLV-1 EM BIÓPSIAS DE PELE DE INDIVÍDUOS  
SOROPOSITIVOS:  
ASPECTOS ULTRAESTRUTURAIS E MOLECULARES**

**UFMG**

**2002**

**Olga Maria Carvalho Pfeilsticker**

**Grupo interdisciplinar de pesquisa em HTLV-1 e 2:  
PESQUISA DO VÍRUS HTLV-1 EM BIÓPSIAS DE PELE DE INDIVÍDUOS  
SOROPOSITIVOS:  
ASPECTOS ULTRAESTRUTURAIS E MOLECULARES**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG como requisito parcial para obtenção do grau do Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Profa. Erna Geesien Kroon

Co-orientadora: Dra. Anna Bárbara de Freitas  
Carneiro Proietti - Fundação Hemominas

Belo Horizonte  
**Instituto de Ciências Biológicas da UFMG**  
**2002**

Criar e transcender... experimentar e compartilhar...

descobrir o caminho que permeia a ciência:

o caminho da busca de si mesmo,

da busca do outro,

do encontro com Deus.

Max, amigo e companheiro,  
e filhos André, Pedro e Bruno,  
que me ajudaram nesta caminhada

a vocês dedico este trabalho

## AGRADECIMENTOS

Poder viver, escolher, participar da missão Daquele que nos escolhe, nos acolhe e orienta.

Agradeço a Deus por esta oportunidade e pela constante presença.

À Profa. Erna, orientadora e amiga, por ter me proporcionado um grande desenvolvimento técnico, científico e pessoal e por sua visão prática e objetiva.

À Dra. Anna Bárbara Freitas Carneiro Proietti, presidente da Fundação HEMOMINAS, coordenadora do Grupo Interdisciplinar de Pesquisas em HTLV (GIPH) e co-orientadora deste trabalho, por sua liderança, dedicação e confiança.

Ao Prof. Antônio Carlos Guedes, principal colaborador deste trabalho, pela sua prestimosa atuação na coleta das biópsias de pele, pelo seu apoio, atenção e disponibilidade.

Ao Dr. Roberto Zimmer Prados, cirurgião plástico, pela coleta das peles de indivíduos submetidos à cirurgia reparadora de mama, pela disponibilidade e atenção.

À Marina Lobato Martins, chefe do serviço de pesquisa da Fundação HEMOMINAS, que contribuiu com o fornecimento dos iniciadores das reações de PCR e da célula de linhagem MT-2. Obrigado pela ajuda no encaminhamento do projeto de pesquisa ao Comitê de Ética da Fundação HEMOMINAS e pela disponibilidade sempre que foi preciso.

À Dra. Bernadette Corrêa Catalan Soares, chefe da divisão de desenvolvimento técnico-científico da Fundação HEMOMINAS, que colaborou na obtenção de dados técnicos, clínicos e laboratoriais. Agradeço também pelos conselhos e disponibilidade.

Ao Prof. Múcio Flávio Ribeiro, ex-diretor do Centro de Microscopia Eletrônica do ICB/UFMG (CEMEL), pelo apoio, compreensão e ajuda.

Ao Conselho Diretor do CEMEL: Prof. Gregory Kitten, Profa. Maria Elizabeth Camargo, Profa. Patrícia Massara, pelo apoio, compreensão e ajuda.

À Profa. Gleydes Ggambogi Parreira, do Departamento de Morfologia do ICB/UFMG, pela disponibilidade e ajuda na interpretação das micrografias eletrônicas.

Ao Prof. Cláudio Antônio Bonjardim pela relatoria deste trabalho, pelos conselhos, acompanhamento e sugestões.

Ao Prof. Paulo César Peregrino pela disponibilidade e ajudas quando preciso.

À Dra. Jaqueline Germano de Oliveira, pela ajuda com o seqüenciamento e sugestões.

À Profa. Matilde Cota Koury, coordenadora do curso de pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

A todos os meus colegas e amigos do Laboratório de Vírus: Felipe, Dani, Landa, Leozinha, Márcia, Anderson, Breno, Lina, Cíntia, Kátia, Patrícia, Cris, Juliana, Juju, Sara, Renata, Daniel, Rodrigo, Fabrício, Antônio, pelo convívio alegre, pelo companheirismo, sugestões e ajuda nas horas difíceis.

Aos funcionários e amigos do Laboratório de Vírus: João Rodrigues, Angela, Cida e Ilda, pelo profissionalismo, eficiência e ajuda.

À Maria Cristina de Almeida Prado, secretária da pós-graduação em Microbiologia, pela eficiência, disponibilidade e boa vontade.

À Profa. Jeannie Nascimento dos Santos Corrêa, da Universidade Federal do Pará, UFPA e doutoranda da FIOCRUZ, em Belo Horizonte, pela ajuda na obtenção das fotos das lâminas histológicas das biópsias de pele, sugestões, disponibilidade e boa vontade.

À Ivete Bozzi, amiga e funcionária do CEMEL pela ajuda na confecção de micrografias eletrônicas, pelo apoio e compreensão.

Aos membros do GIPH que acreditaram no meu trabalho.

Aos doadores de sangue, que tiveram suas peles biopsiadas, a minha gratidão pela participação voluntária e consciente.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

De todo o meu coração agradeço ao Max pelo carinho, cumplicidade e incentivo e ao André, Pedro e Bruno, pelas demonstrações de afeto, compreensão e apoio.

A toda minha família, aos meus pais Olga e Antônio, à minha tia Daisy, às minhas irmãs, à minha sogra Lídia, aos meus cunhados e todos os meus sobrinhos pelo apoio, compreensão e amizade.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>v</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xi</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>XII</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xiv</b>
<b>I. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Histórico .....</b>	<b>1</b>
<b>2. O vírus HTLV-1.....</b>	<b>2</b>
2.1. Classificação.....	2
2.2. Morfologia, estrutura e composição química da partícula viral.....	3
2.3. Genoma.....	5
2.4. Proteínas codificadas pelo genoma do HTLV-1.....	7
2.4.1. Gag .....	8
2.4.2. Polimerase (pol).....	8
2.4.3. Protease (pro).....	9
2.4.4. Envelope (env).....	9
2.4.5. Tax.....	10
2.4.6. Rex.....	13
2.4.7. As proteínas p12 <sup>I</sup> , p30 <sup>II</sup> e p13 <sup>II</sup> .....	13
2.5. Ciclo de multiplicação .....	14
<b>3. Variabilidade genética do HTLV .....</b>	<b>18</b>
<b>4. Epidemiologia .....</b>	<b>19</b>
<b>5. Doenças associadas ao HTLV-1 .....</b>	<b>24</b>
5.1. Leucemia/ Linfoma de Células T do Adulto (ATL).....	25

5.1.1. Patogênese da ATL.....	27
5.2. Mielopatia associada ao HTLV-1/Paraparesia espástica tropical (TPS/HAM).....	28
5.2.1. Patogênese da TSP/HAM.....	29
5.3. Manifestações oculares.....	31
5.4. Manifestações dermatológicas associadas ao HTLV-1.....	31
<b>6. Diagnóstico laboratorial do HTLV-1 e 2.....</b>	<b>33</b>
6.1. Testes sorológicos.....	33
6.2. PCR (Reação em cadeia da polimerase).....	36
<b>7. Métodos de estudo do HTLV-1 na pele.....</b>	<b>37</b>
7.1. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	38
7.2. Imunohistoquímica.....	39
7.3. Crioultramicrotomia.....	39
7.4. Hibridização <i>in situ</i> .....	40
<b>II. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>41</b>
<b>III. OBJETIVOS.....</b>	<b>43</b>
<b>1. Objetivo Geral.....</b>	<b>43</b>
<b>2. Objetivos Específicos.....</b>	<b>43</b>
<b>IV. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>44</b>
<b>1. Indivíduos participantes: Triagem e seleção.....</b>	<b>44</b>
<b>2. Coleta das amostras de pele.....</b>	<b>44</b>
<b>3. Delineamento do estudo.....</b>	<b>45</b>
3.1 Controles.....	46
<b>4. Cultura de Células MT-2.....</b>	<b>46</b>
<b>5. Processamento do material selecionado.....</b>	<b>46</b>
5.1. Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	46
5.1.1. Processamento das biópsias de pele.....	46



5.1.2. Escolha da área nos cortes semi-finos: .....	47
5.1.3. Processamento das células MT-2 para MET (MIYOSHI <i>et al.</i> , 1981). .....	47
5.2. Extração do DNA genômico das biópsias de pele (LAIR <i>et al.</i> , 1991 mod.).....	48
5.3. Extração de DNA genômico de células MT-2.....	48
5.3.1. Controle da extração do DNA das biópsias de pele .....	49
5.4. Amplificação do gene <i>env</i> que codifica parte da gp21 e gp46 do HTLV-1 através da “nested” PCR.....	50
5.5. Purificação dos produtos da “nested” PCR .....	51
5.6. Clonagem.....	52
5.7. Transformação bacteriana.....	52
5.8. Obtenção do DNA plasmidial para o seqüenciamento .....	52
5.9. Seqüenciamento dos clones .....	53
5.10. Análise das seqüências de DNA .....	53
<b>V. RESULTADOS .....</b>	<b>55</b>
<b>1. Análise das biópsias de pele ao microscópio eletrônico .....</b>	<b>55</b>
<b>2. Controle da extração e quantificação do DNA obtido das biópsias de pele .....</b>	<b>85</b>
<b>3. Detecção do HTLV-I nas biópsias de pele através da “nested” PCR .....</b>	<b>85</b>
<b>4. Seleção dos clones para seqüenciamento .....</b>	<b>85</b>
<b>5. Seqüências de nucleotídeos, alinhamento, e análise filogenética.....</b>	<b>89</b>
<b>VI. DISCUSSÃO .....</b>	<b>92</b>
<b>1. Microscopia Eletrônica .....</b>	<b>92</b>
<b>2. Caracterização Molecular do HTLV-1.....</b>	<b>94</b>
<b>VII. CONCLUSÃO.....</b>	<b>97</b>
<b>VIII. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>99</b>
<b>IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>100</b>

<b>ANEXO 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO PARA BIÓPSIA. ....</b>	<b>114</b>
<b>ANEXO 2a – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP HEMOMINAS.....</b>	<b>115</b>
<b>ANEXO 2b – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP HEMOMINAS. ....</b>	<b>116</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

IL-2	Interleucina 2
HTLV-1 e 2	Vírus Linfotrópico Humano de Células T - 1 e 2
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
CTC	Linfoma Cutâneo de Células T
ATLL	Leucemia/Linfoma de Células T do Adulto
ATL	Leucemia de Células T do Adulto
ATLV	Vírus da Leucemia de Células T do Adulto
TSP	Paraparesia Espástica Tropical
HAM	Mielopatia Associada ao HTLV-1
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
MET	Microscopia Eletrônica da Transmissão
ME	Microscópio Eletrônico
SU	glicoproteínas de superfície
TM	glicoproteínas Transmembrana
CA	capsídeo
MA	matriz
PR	protease
RT	transcriptase reversa
IN	integrase
NC	nucleocapsídeo
RNA	ácido ribonucléico
RNaseH	endonuclease
“cap”	seqüência de início de transcrição
tRNA	ácido ribonucléico de transporte
PBS	sítio de ligação do “primer”
PPT	trato de polipurina
TRE	elemento de resposta a Tax
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro
LTR	seqüências longas terminais repetidas
ATF/CREB	fator de ativação de transcrição
CRE	elemento de resposta a c-AMP
RT	transcriptase reversa

Gag	proteínas internas
Pol	polimerase
Pro	protease
Env	envelope
ORF	janelas abertas de leitura
IL-2R	receptor de interleucina 2
CD2/LFA-3	linhagem diferencial linfócitos 2 com função linfocitária do antígeno 3
LFA-1/ICAM-1	função linfocitária do antígeno 1 com molécula de adesão intercelular 1
IL-1, IL-2	interleucinas 1 e 2
IL-3, IL-6	interleucinas 3 e 6
IL-2R $\alpha$	cadeia $\alpha$ do receptor para IL-2
GM-CFS	fator estimulante de colônias de macrófago-granulócito
TGF- $\beta$	fator de crescimento tumoral $\beta$
MHC-1	complexo principal de histocompatibilidade de classe 1
DNA	ácido desoxiribonucléico
c-AMP	adenosina monofosfato cíclico de resposta de ligação
NF- $\kappa$ B	fator nuclear $\kappa$ B
I $\kappa$ B $\alpha$ /NF- $\kappa$ B	inibidor do fator nuclear $\kappa$ B/fator nuclear $\kappa$ B
JAK/STAT	signal de transdução e ativação de transcrição
SRE	elemento de resposta do soro
SRF	fator de resposta do soro
CDK4 e 6	ciclina dependentes de quinases 4 e 6
Rb	proteína retinoblastoma supressora de tumor
E2F	fator de transcrição
INK4	proteína inibidora de quinase 4
p53	proteína supressora de tumor
G1	primeira etapa da intérfase (ciclo celular)
G2/M	passagem da segunda etapa da intérfase (ciclo celular) para Mitose
MAD-1	(proteína de segregação mitótica-1)
R $\times$ RE	elemento de resposta a rex
CRS	seqüência de repressão atuando em <i>cis</i>
CTLs	linfócitos T citotóxicos
SNC	Sistema Nervoso Central
LDH	dehidrogenase láctica

CD2+, CD3+, CD4+	linhagens diferenciais de linfócitos 2+, 3+, 4+, 8-, 25+
CD8-, CD25+	linhagens diferenciais de linfócitos 8-, 25+
HLA-DR	Receptor celular de superfície do antígeno leucocitário de histocompatibilidade humana de classe II
IgG, IgA e IgM	imunoglobulinas G, A e M
IL-10	interleucina 10
INF- $\gamma$	interferon gama
TNF- $\alpha$	fator de necrose tumoral alfa
LFA-1	função linfocitária associada ao antígeno 1
VLA-4	antígeno tardio 4
ICAM-1	molécula de adesão intercelular 1
VCAM-1	molécula de adesão vascular 1
MMP-3 e MMP-9	metaloproteinases 3 e 9
TIMP-3	inibidor de metaloproteinase 3
ID	dermatite infecciosa
Ki-67	células em ciclo mitótico
ELISA	ensaio da imunoabsorção da enzima ligada
p15, p19, p21, p24	proteínas virais
rp21, gp46	proteínas recombinantes derivadas dos genes <i>env</i>
rgp21, p21 <i>env</i> r	proteínas recombinantes derivadas dos genes <i>env</i>
PHSCC/EUA	comitê de consenso em saúde pública dos Estados Unidos da América
IFI	imunofluorescência indireta
RIPA/PAGE	radioimunoprecipitação em gel de poliacrilamida
WB	ensaio Western Blot
UV	luz ultravioleta
gp 46, gp 68	antígenos do envelope viral
FDA	Administração de alimentos e drogas dos Estados Unidos da América
OMS	Organização Mundial da Saúde
SDS-PAGE	Técnica de eletrorese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
IME	imunomicroscopia eletrônica
MET	microscopia eletrônica de transmissão
ISH	hibridização <i>in situ</i>
PTLV-1	vírus linfotrópico de células T de primatas, tipo 1

STLV-1	vírus linfotrópico de células T de símios, tipo 1
MO	microscopia ótica
HE	hematoxilina-eosina
VR	vermelho de rutênio
EDTA	ácido etilenodiamino tetracético
PBS	solução salina tamponada
HLA-DQ $\alpha$	antígeno celular leucocitário de histocompatibilidade humana de classe II - DQ $\alpha$
P	probabilidade
MAP	seqüência múltipla de alinhamento
CD45RO+	fenótipo de células dendríticas
ME-NJ	método Neighbour-joining de mínima evolução

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Visualização da partícula do HTLV-1 ao MET com o uso de vermelho de rutênio	04
Figura 2.	Estrutura da partícula viral do HTLV-1	05
Figura 3.	Sequência dos genes do RNA genômico	06
Figura 4.	Representação do genoma e principais proteínas do HTLV-1	07
Figura 5.	As três vias de transativação por <b>Tax</b>	11
Figura 6.	Ciclo de multiplicação dos retrovírus	15
Figura 7.	Síntese da fita dupla de DNA viral	16
Figura 8.	Integração da fita dupla de DNA com a formação do provírus	17
Figura 9.	Distribuição dos vírus STLV-1 e HTLV-1 no mundo	21
Figura 10.	Características morfológicas ultraestruturais da pele normal (1)	56
Figura 11.	Características morfológicas ultraestruturais da pele normal (2)	59
Figura 12.	Características morfológicas ultraestruturais da pele lesada	61
Figura 13.	Ultraestrutura dos vasos da derme lesada	63
Figura 14.	Corte histológico de biópsia de pele corado pelo método HE	66
Figura 15.	Ultraestrutura das células mononucleares que foram vistas infiltrando a derme da pele lesada	67

Figura 16.	Áreas de destruição e reconstrução da matriz extracelular	71
Figura 17.	Características morfológicas ultraestruturais das partículas do HTLV-1 em células MT-2	73
Figura 18.	Célula com características morfológicas ultraestruturais de um fibrócito ativado	79
Figura 19.	Partícula com características morfológicas ultraestruturais da partícula do HTLV-1 sendo liberada na derme	81
Figura 20.	Partícula com características morfológicas ultraestruturais da partícula do HTLV-1 sendo produzida por fibroblasto	83
Figura 21.	Amplificação da região codificadora do gene HLA-DQ $\alpha$ através da PCR	86
Figura 22.	Amplificação da região codificadora de parte do gene <i>env</i> do HTLV-1 através da “nested” PCR	87
Figura 23.	Amplificação do inserto de 312 pb presente em clones recombinantes de <i>Escherichia coli</i> competente	88
Figura 24.	Análise eletroforética em gel de agarose 1,0% para quantificação do DNA plasmidial após extração pelo sistema Wizard® Plus SV Minipreps	89
Figura 25.	Resultado do alinhamento	90
Figura 26.	Árvore filogenética	91



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Gêneros da família <i>Retroviridae</i> e principais representantes conforme ICTV	03
Tabela 2.	Iniciadores, localização no gene HLA-DQ $\alpha$ e as sequências de bases	49
Tabela 3.	Iniciadores, localização no gene <i>env</i> que codifica parte da gp21 e gp46 do HTLV-1 e as sequências de bases	50
Tabela 4.	Isolados clínicos utilizados na análise filogenética baseada na região do gene <i>env</i>	54
Tabela 5.	Alterações morfológicas ultraestruturais na epiderme	75
Tabela 6.	Alterações morfológicas ultraestruturais na derme	76

## RESUMO

O vírus HTLV-1 pode ser considerado um vírus emergente se levarmos em conta que a cada dia novos isolados virais vão sendo caracterizados. Por exemplo, os grupos **e** e **f**, na África Central, caracterizados por SALEMI *et al.* (1998) e suportados pela análise filogenética, demonstraram terem evoluído através de transmissões inter-espécies entre humanos e símios que ocorrem desde os tempos mais remotos e que ainda podem estar ocorrendo. De 10 a 20 milhões de pessoas se encontram infectadas ao redor do mundo e os aspectos da interação vírus-hospedeiro, bem como a caracterização molecular dos isolados virais das regiões endêmicas, são de suma importância para o estudo da epidemiologia e das formas de controle, prevenção e tratamento dessa virose. Os isolados virais objetos deste trabalho foram obtidos de biópsias de pele de indivíduos soropositivos para o HTLV-1 e com manifestação dermatológica de dermoepidermite crônica. Após extração do DNA genômico das biópsias de pele destes indivíduos foi feita a “nested” PCR de parte do gene *env* do HTLV-1. Das biópsias de pele, 90% deram resultado de PCR positivo, corroborando o teste sorológico positivo para o HTLV-1 nestes indivíduos. O alvo principal do HTLV-1 é o linfócito T CD4+, presente em grande proporção no infiltrado, e que permanece imortalizado após ter sido infectado. A proteína tax do HTLV-1 é responsável pela transcrição e indução de vários genes celulares, tais como citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão que são essenciais para a disseminação e localização tecidual destes linfócitos.

A microscopia eletrônica de transmissão destas biópsias foi realizada com a finalidade de verificar preliminarmente a presença do HTLV-1, e de observar a morfologia ultraestrutural das células do infiltrado e sua localização tecidual. Células mononucleares foram encontradas infiltrando as papilas dérmicas e regiões peri-vasculares, tendo sido observada a migração destas células para a epiderme. Elas apresentaram núcleo convoluto, endentado, com nucléolo evidente e prolongamentos citoplasmáticos aumentados. Também foi observada a presença de vacúolos em algumas células. A lise celular estava quase ausente. Estruturas com diâmetro variando de 100 nm a 400 nm e características ultraestruturais da partícula do HTLV-1, foram observadas próximas ou brotando da membrana citoplasmática de células com características morfológicas ultraestruturais da série linfóide e de fibroblastos. Uma linhagem celular de cordão umbilical transformada pelo HTLV-1, MT-2, foi usada como controle positivo das técnicas realizadas. Como controle negativo foram obtidos fragmentos de pele normal de indivíduo submetido à cirurgia plástica reparadora de mama.

Os achados deste trabalho corroboram a hipótese de que a pele é um dos órgãos alvo do HTLV-1. Este vírus continua se multiplicando nos compartimentos da pele e causando uma reação inflamatória crônica local nos indivíduos infectados, cuja finalidade é a tentativa de controlar a infecção.

De acordo com dados mundiais existe um risco de 1% a 5 % dos indivíduos infectados desenvolverem alguma doença associada ao HTLV-1, de 40 a 50 anos após a infecção. Como em nosso meio a idade deste comprometimento tem sido menor, torna-se necessário a caracterização molecular destes isolados virais visando um melhor entendimento da epidemiologia do HTLV-1 em nosso meio. Após a clonagem e seqüenciamento do segmento amplificado de parte do gene *env* do HTLV-1, e posterior análise filogenética., os resultados apurados demonstraram que os isolados virais analisados pertencem ao grupo Cosmopolita a, sub-grupo transcontinental A, que é um genótipo de maior prevalência e distribuição no Brasil e no mundo.

Esta pesquisa faz parte de um estudo transversal de coorte aberta dos indivíduos da Fundação HEMOMINAS de Belo Horizonte, com sorologia positiva para o HTLV-1, que já conta com mais de 500 indivíduos cadastrados e acompanhados de 2 em 2 anos. Portanto está inserido dentro de um projeto maior desenvolvido pelo GIPH, Grupo Interdisciplinar de Pesquisa em HTLV-1 e 2, do qual eu faço parte, e envolve vários profissionais de várias áreas e de diversas instituições de pesquisa tais como a Fundação HEMOMINAS de Belo Horizonte, a UFMG e o Hospital Sara Kubistchek.

Os resultados deste estudo serão de imenso valor para se conhecer melhor as manifestações do HTLV-1 na pele dos portadores do HTLV-1 em nosso meio. Dessa forma, poderemos realizar um controle e tratamento mais eficiente das doenças relacionadas.

**Palavras-chave:** aspectos ultraestruturais HTLV-1 (MET), doença dermatológica crônica, GIPH, análise filogenética HTLV1/2.

## ABSTRACT

The virus HTLV-1 can be considered an emerging virus if we take into account that each day new viral isolates are characterized. For example, **groups e** and **f**, in Central Africa, characterized by SALEMI *et al.* (1998) and supported by phylogenetic analysis, showed they have evolved through interspecies transmissions among humans and apes occurring since ancient times and that may still be occurring. Of 10 to 20 million people are infected around the world and aspects of virus-host interaction, as well as the molecular characterization of viral isolates of endemic regions, are of paramount importance for the study of epidemiology and forms of control, prevention and treatment of this virus. The viral isolates objects in this work were obtained from skin biopsies of seropositive individuals for HTLV-1 and with dermatological manifestation of chronic disease. After extraction of genomic DNA from skin biopsies of these individuals was made the PCR "nested" of part of the HTLV-1 *env* gene. Of skin biopsies, 90% gave positive PCR result, corroborating the serological test positive for HTLV-1 in these individuals. The main target of HTLV-1 is the CD4+ T lymphocyte, present in large proportion in inflammatory infiltrate, and that remains immortalized after being infected. The tax protein of HTLV-1 is responsible for transcription and induction of several cellular genes, such as cytokines, chemokines and adhesion molecules that are essential for dissemination and tissue localization of these lymphocytes.

Transmission electron microscopies of these biopsies were performed in order to verify the presence of preliminarily HTLV-1, and observe the ultrastructural morphology of inflammatory infiltrate cells and tissue location. Mononuclear cells were found infiltrating the dermal papillae and peri-vascular regions, having been observed migration of these cells to the epidermis. They presented a convoluted nucleus, indentation, with evident nucleoli and increased cytoplasmic extensions. It was also observed the presence of vacuoles in some cells. The cell lysis was almost absent. Structures with a diameter ranging from 100 nm to 400 nm and ultrastructural characteristics of particle of HTLV-1, were observed near or springing from the cytoplasmic membrane of cells with ultrastructural lymphoid series and fibroblasts morphologic characteristics. An umbilical cord cell line transformed by the HTLV-1, MT-2, was used as positive control techniques performed. As negative control were obtained fragments of normal skin from individual subjected to breast reconstructive plastic surgery.

The findings of this study support the hypothesis that the skin is one of the target organs of HTLV-1. This virus keeps multiplying in magazines of the skin and causing a

chronic inflammatory reaction site in infected individuals, whose purpose is to attempt to control the infection.

According to global data there is a risk of 1% to 5% of infected individuals develop any disease associated with HTLV-1, of 40 to 50 years after infection. As in our middle age of this commitment has been minor, it becomes necessary to the molecular characterization of these viral isolates aiming at a better understanding of the epidemiology of HTLV-1 in our midst. After the cloning and sequencing of amplified segment of part of the HTLV-1 *env* gene, and subsequent phylogenetic analysis, the results obtained have shown that the viral isolates analyzed pertain to the Cosmopolitan group a, transcontinental sub-group A, which is a genotype of higher prevalence and distribution in Brazil and in the world.

This research is part of a cross-sectional study of open cohort of individuals HEMOMINAS Foundation of Belo Horizonte, with positive serology for HTLV-1, which already has more than 500 individuals registered and accompanied at two- year intervals. So is inserted within a larger project developed by the GIPH, Interdisciplinary Group of Research in HTLV-1 and 2, of which I am part, and involves various professionals from various areas and various research institutions such as the HEMOMINAS Foundation of Belo Horizonte, the UFMG and the Sara Kubitschek Hospital.

The results of this study will be of immense value to know better the manifestations of HTLV-1 in skin of the carriers of HTLV-1 in our midst. In this way, we can perform a control and more efficient treatment of related diseases.

**Key-words:** ultrastructural aspects HTLV-1 (TEM), chronic dermatological disease, GIPH, phylogenetic analysis HTLV-1/2.

# I. INTRODUÇÃO

## 1. Histórico

Com a descoberta da enzima transcriptase reversa, que é essencial para a replicação e integração de genomas retrovirais, e os fatores de crescimento de células T, como a interleucina-2 (IL-2) nos anos setenta, foram possíveis o estabelecimento de culturas celulares de longa duração e o progresso científico nessa área. Historicamente, estes achados levaram ao isolamento do primeiro retrovírus em humanos, o HTLV-1, em uma cultura de células HUT 102 de um linfoma cutâneo de células T (CTCL), por POIESZ *et al.* (1980), nos Estados Unidos.

Um estudo retrospectivo apontou que este mesmo paciente provavelmente tivesse leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL). Com os trabalhos de HINUMA (1981) e YOSHIDA (1982), no Japão, foi demonstrado que a linhagem de células MT-1, proveniente de um paciente com ATLL, também possuía um retrovírus, que recebeu o nome de vírus da leucemia de células T do adulto (ATLV) e produzia antígenos que reagiam com o soro de pacientes com ATLL. Posteriormente, foi verificado que estas duas linhagens de células produziam o mesmo vírus, com seqüências de nucleotídeos idênticas (POPOVIC, 1982; WATANABE, 1984; GALLO, 1985) Este vírus tem hoje o nome de *Human T-lymphotropic virus 1* (HTLV-1) sendo considerado então, o agente causador da neoplasia leucemia/linfoma de células T do adulto (ATL).

O HTLV infecta linfócitos T maduros geralmente CD3+ e CD4+ *in vivo*, e numa proporção menor CD8+, linfócitos B e monócitos (POIESZ *et al.*, 2000; revisado por GRANT *et al.*, 2002). *In vitro* ocorre a infecção de vários tipos de células humanas ou animais (JOHNSON *et al.*, 2001).

Em 1985, o soro de pacientes com sintomas neurológicos de Paraparesia Espástica Tropical (TSP), doença endêmica no oeste da Índia, apresentaram imuno-reatividade para o HTLV-1. Ao mesmo tempo, OSAME *et al.* (1986), demonstraram que o soro de pacientes com sintomas neurológicos não ATLL, também reagiram com o HTLV-1, numa condição que ele então designou como Mielopatia Associada ao HTLV-1 (HAM). Assim, a desordem neurológica TSP/HAM foi associada ao HTLV-1 (revisado por JOHNSON *et al.*, 2001).

O *Human T-lymphotropic virus 2* (HTLV-2) foi isolado das células de um paciente com diagnóstico de leucemia de células pilosas (“hairy cell leukemia”)

(KALYANARAMAN, 1982). O HTLV-2 infecta preferencialmente linfócitos T CD8+ e tem sido associado com raros cânceres de células T CD8+ (POIESZ *et al.*, 2000).

Como os exames sorológicos rotineiros de triagem disponíveis não conseguem distinguir entre os dois tipos de vírus é costume referir-se ao indivíduo submetido a estes testes, como sendo soropositivo para HTLV-1 e 2. A diferenciação entre a infecção por HTLV-1 e HTLV-2 é feita através de testes moleculares e sorológicos mais complexos uma vez que o prognóstico das doenças causadas por estes vírus é divergente (revisado por FRANCHINI *et al.*, 2000).

Os testes para HTLV-1 e 2 no sangue de doadores foram introduzidos no Japão em 1986, nos Estados Unidos em 1988 e no Brasil tornaram-se obrigatórios pela portaria nº 1376 de 19 de novembro de 1993 do Ministério da Saúde (PROIETTI & MARTINS, 2000).

O HTLV-I foi demonstrado através da PCR em múmias andinas, o que significa que este vírus está presente entre os humanos desde tempos remotos. Atualmente, de 10 a 20 milhões de pessoas estão infectadas pelo HTLV-1 no mundo e a grande maioria vai permanecer como portadores, sendo que somente de 1% a 5 % devem desenvolver ATL, menos de 1% HAM/TSP e de 5% a 10% outras patologias relacionadas com o HTLV-1 (CATALAN *et al.*, 2000; revisado por FRANCHINI *et al.*, 2001).

## **2. O vírus HTLV-1**

### **2.1. Classificação**

A família *Retroviridae* tem recebido muita atenção, principalmente após a descoberta do *Human immunodeficiency virus* (HIV), em 1983. Muitos retrovírus que hoje conhecemos infectam diversos vertebrados, e com base nos estudos de genética molecular e de comparação de seqüências de nucleotídeos, a família *Retroviridae* tem sido classificada em 7 gêneros conforme mostrado na TABELA 1.

O HTLV-1 é um membro da família *Retroviridae*, classificado como pertencente ao gênero *Deltaretrovirus* (VII Report of The International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV, VAN REGENMORTEL *et al.* (eds.), San Diego, 2000).

**TABELA 1:** Gêneros da família *Retroviridae* e principais representantes conforme ICTV

<b>Gênero</b>	<b>Protótipo</b>
<i>Alpharetrovirus</i>	<i>Avian leukosis virus</i> (ALV)
<i>Betaretrovirus</i>	<i>Mouse mammary tumor virus</i> ((MMTV)
<i>Gammaretrovirus</i>	<i>Murine leukemia virus</i> (MLV)
<i>Deltaretrovirus</i>	<i>Bovine leukemia virus</i> (BLV)
<i>Epsilonretrovirus</i>	<i>Walleye dermal sarcoma virus</i> (WDSV)
<i>Lentivirus</i>	<i>Human immunodeficiency virus 1</i> (HIV 1)
<i>Spumavirus</i>	<i>Chimpanzee foamy virus</i> (CFV)

([www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/)).

Outras espécies pertencentes a este gênero incluem: *Bovine leukemia virus* (BLV), *Human T-lymphotropic virus 2* (HTLV-2), *Simian T-lymphotropic virus 1* (STLV-1), *Simian T-lymphotropic virus 2* (STLV-2), *Simian T-lymphotropic virus 3* (STLV-3), *Primate T-lymphotropic virus 1* (PTLV-1), *Primate T-lymphotropic virus 2* (PTLV-2) e *Primate T-lymphotropic virus 3* (PTLV-3).

## **2.2. Morfologia, estrutura e composição química da partícula viral**

De acordo com a morfologia observada através da técnica de contraste negativo ao microscópio eletrônico (ME), o HTLV-1 é um vírus envelopado, levemente pleomórfico e esférico, com um nucleóide concêntrico e espículas pouco visíveis, encontradas dispersas uniformemente por toda superfície do vírus. As espículas podem ser distinguidas, pois tornam a superfície do vírus rugosa (FIGURA 1). Estas espículas porém são muito frágeis e não são bem preservados nas preparações padrão para microscopia eletrônica de transmissão (MET), sendo utilizado o vermelho de rutênio para a sua preservação (SARNGADHARAN *et al.*, 1986).

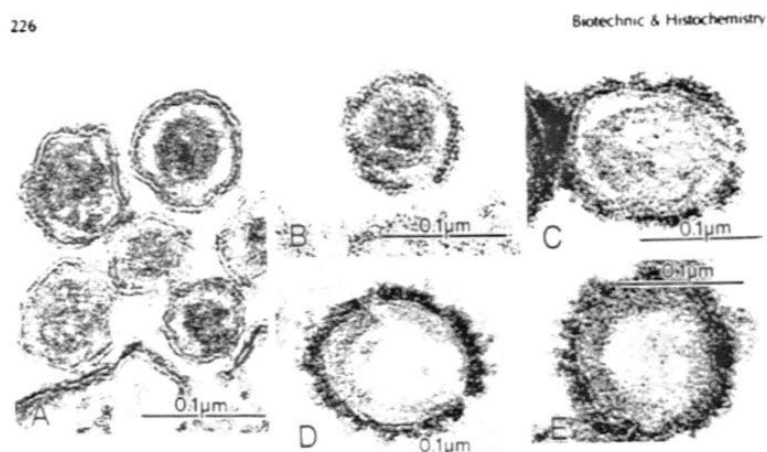
As partículas de HTLV-1 apresentam tamanhos variados, algumas com 40 a 50 nm de diâmetro e outras indo de 100 a 200 nm, com uma média de 102,7 nm, conforme as primeiras descrições ao ME (POIESZ *et al.*, 1980; HINUMA *et al.*, 1981 e MIYAUCHI & MARUYAMA, 1990) e outras posteriores (KUBOTA *et al.*, 1995 e TAFFAREL *et al.*, 1995).

A estrutura da partícula viral (FIGURA 2) é semelhante à dos demais retrovírus. Na parte externa do envelope lipídico são encontradas as glicoproteínas de superfície (SU), os

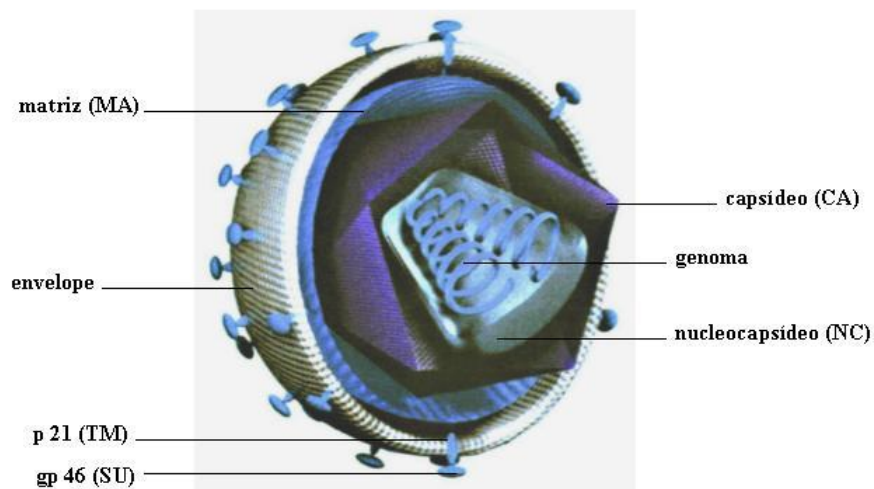


maiores antígenos virais, responsáveis pela ligação com o receptor celular. Envolvendo as SU e ligadas a elas por pontes dissulfeto são encontradas as glicoproteínas transmembrana (TM), responsáveis pela fusão com a membrana celular. Internamente ao envelope, o capsídeo (CA), de simetria isométrica a esférica, é envolvido pela matriz (MA), uma proteína codificada pelo gene *gag*, e que faz limite com a parte interna do envelope. Ao ME, as proteínas do CA e a da MA apresentam-se amorfas. A proteína do CA é a mais abundante da partícula viral, correspondendo à aproximadamente 33% do peso total. Dentro do CA é encontrada uma protease (PR), essencial para a clivagem da proteína precursora de **gag** durante a maturação da partícula viral. A proteína do CA serve também de proteção para o cerne. Este é formado pela enzima transcriptase reversa (RT), pela integrase (IN), pelo nucleocapsídeo (NC) e pelo ácido ribonucléico (RNA) genômico. A RT é responsável pela transcrição do RNA genômico e tem também atividade RNaseH (endonuclease). A IN, codificada pelo gene *pol*, é necessária para a integração do provírus ao genoma da célula hospedeira. O NC, usualmente uma estrutura eletrodensa de formato cônico ao ME, envolve o RNA e o protege (COFFIN *et al.*, 1995; PROIETTI & MARTINS, 2000)..

Os vírus contem 2% de RNA, 3% de carboidratos, 35% de lipídeos e 60% de proteínas (COFFIN *et al.*, 1995; PROIETTI & MARTINS, 2000).



**FIGURA 1:** Visualização das espículas e do envelope do HTLV-1 com o uso do vermelho de rutênio. **A e B**, sem o vermelho de rutênio; **C,D e E**, com o vermelho de rutênio (FASSEL *et al.*, 1998).



**FIGURA 2:** Estrutura da partícula viral do HTLV-1 ([www.virology.net](http://www.virology.net))

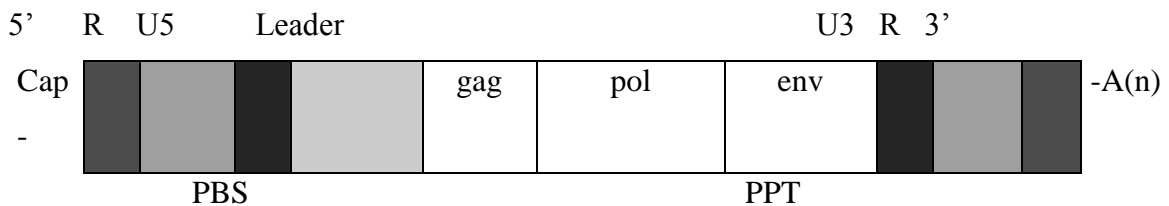
### 2.3. Genoma

O genoma do HTLV-1 consiste de um dímero, isto é, dois monômeros idênticos de RNA de fita simples, linear, de senso positivo, ligados parcialmente por pontes de hidrogênio. O comprimento total do monômero é de 9032 pares de bases. A porção 5' do genoma possui um "cap", sequência de início de transcrição, do tipo 1m7G5ppp5'GmpNp (metilguanossina 3P). A porção 3' de cada monômero possui uma região poliadenilada (poli A), que dá estabilidade à molécula. Além disso, existe também uma estrutura similar ao tRNA celular, tipo prolina, necessária para a replicação, presente em todas as partículas e que está ligada à terminação 5' do RNA viral. O RNA é somente genômico (COFFIN *et al.*, 1995) e as seqüências (FIGURA 3) compreendem as seguintes regiões:

- Região R: seqüência de 18-250 nt redundante em ambas terminações 5' e 3'.
- U5: uma região única de 75-250 nt, que é a primeira a ser transcrita pela RT, formando a terminação 3' do genoma do provírus.
- Sítio de ligação do "primer" (PBS): seqüência de 18 nt complementar à terminação 3' do "primer" de tRNA<sup>PRO</sup> usado pelo vírus para iniciar a transcrição reversa.

- Sequência líder: sequência de 50-90 nt, não traduzida, localizada “downstream” PBS e presente na terminação 5’ de todos os mRNAs virais. É o sinal para o empacotamento do mRNA genômico.
- Genes *gag*, *pol* e *env*.
- Trato de polipurina (PPT): pequena sequência de aproximadamente 10 resíduos A/G, que inicia a síntese da fita de DNA senso positivo durante a transcrição reversa.
- U3: região única, não codificadora de 200-1200 nt que forma a terminação 5’ do provírus depois da transcrição reversa e contém os promotores responsáveis pela regulação da transcrição do provírus.

A região U3 contém três sequências imperfeitas de 21 nucleotídeos, designadas de TER, elemento de resposta a **tax**, que em *trans*, controlam a transcrição do provírus, através da atividade transativadora de **tax**. Contém também sequências responsáveis pela terminação e poliadenilação dos mRNAs. A terminação 5’ da região U3 codifica também a terminação carboxila da proteína **tax** (CANN & CHEN, 1996).

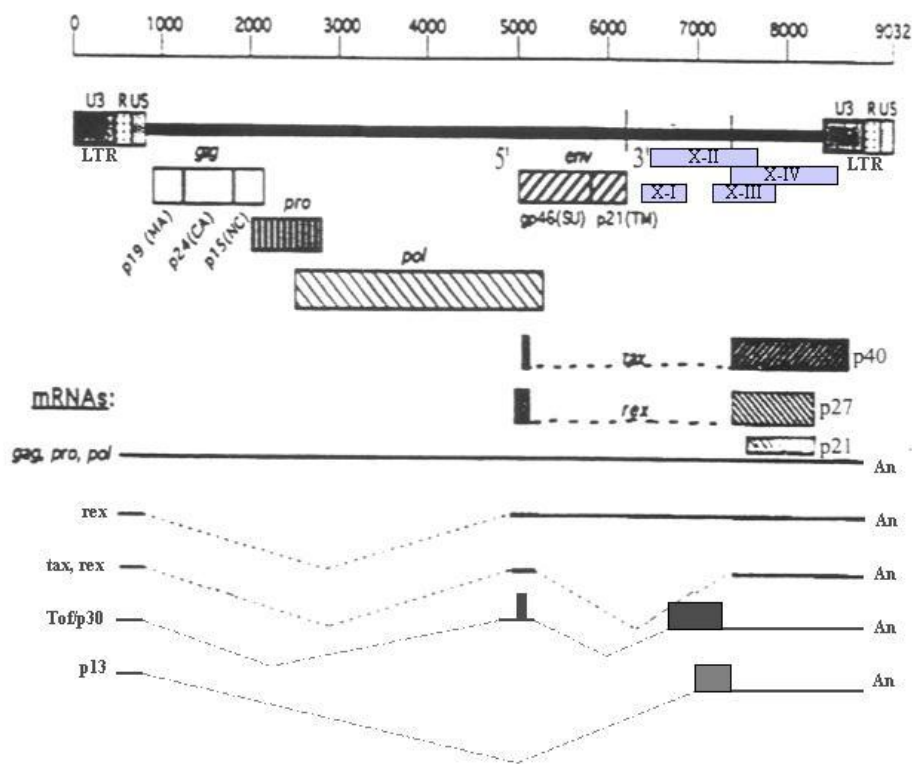


**FIGURA 3:** Sequência dos genes do RNA genômico (CANN & CHEN, 1996 mod.).

O RNA viral transcrito pela RT após penetrar na célula, forma uma fita dupla de DNA. A fita dupla de DNA assim formada é conhecida como provírus e difere do RNA viral por conter mais uma sequência U3, R, U5. Como resultado, o provírus possui nas suas extremidades 5’ e 3’, as LTR, sequências longas terminais repetidas. Os genes *gag*, *pol* e *env* dos três antígenos grupo-específicos: proteínas internas (**gag**), RT ou polimerase (**pol**), e envelope (**env**), estão arranjados no sentido de 5’ para 3’. Além das LTR e dos genes *gag*, *pol* e *env*, existe uma região na porção final de 3’, a região X, não encontrada em outros retrovírus, e cujas sequências revelam 4 janelas abertas de leitura (ORFs I, II, III e IV), que se sobrepõem e que codificam os genes *tax* e *rex*, através das ORFs III e IV, e através das ORFs I e II, as proteínas **p12<sup>I</sup>**, **Tof/p30<sup>II</sup>** e **p13<sup>II</sup>**. O gene *tax* codifica uma proteína responsável pela ativação transcricional das LTR e o gene *rex* é necessário para a expressão das proteínas

estruturais. A similaridade do HTLV-1 e HTLV-2 é relativamente baixa na região X, comparada com o resto do genoma (FIGURA 4) (CANN & CHEN, 1996; PROIETTI & MARTINS, 2000).

Estudos comparativos entre as LTRs do HTLV-1 e do HTLV-2 mostraram homologia nos segmentos importantes para a expressão viral (as seqüências de 21 nucleotídeos, o sinal de poliadenilação, e TATA “box”). As regiões R e U5, que formam as seqüências líder, são muito longas em relação a outros retrovírus (CANN & CHEN, 1996; revisado por GRANT *et al.*, 2002).



**FIGURA 4:** Representação do genoma e principais proteínas do HTLV-1 (CANN & CHEN, 1996 mod.).

#### 2.4. Proteínas codificadas pelo genoma do HTLV-1

Em todos os retrovírus os genes *gag*, *pro* e *pol* formam um mRNA genômico, que quando traduzido, expressa as poliproteínas **gag**, **gag-pro**, e **gag-pro-pol**, de maneira que 5 a 10% a mais de **pol** do que **gag** é produzida. O vírus utiliza esta estratégia para manter as proporções corretas destas proteínas e assegurar que elas sejam empacotadas. Assim, a síntese da protease é feita como parte do precursor poliproteico **gag** acompanhado por desvio de

leitura (“frame-shifting”). Ele ocorre nos poliribosomas livres no citoplasma. Os produtos **gag**, **pro** e **pol** estão em três diferentes ORFs, requerendo, portanto, dois desvios de leitura. Ao contrário do que ocorre com **gag**, **pro** e **pol**, a proteína **env**, é sintetizada em poliribosomas associados com o retículo endoplasmático rugoso utilizando um mRNA subgenômico processado (FIGURA 4), (CANN & CHEN, 1996; PROIETTI & MARTINS, 2000; revisado por GRANT *et al.*, 2002).

Além dos genes que codificam proteínas estruturais do vírus, a região pX, presente na terminação 3’ do genoma codifica proteínas regulatórias: **tax**, **rex**, **p21<sup>rex</sup>**, **p12<sup>I</sup>**, **p13<sup>II</sup>** e **p30<sup>II</sup>** que estão envolvidas na replicação viral e/ou patogênese (revisado por FRANCHINI *et al.*, 2000; revisado por GRANT *et al.*, 2002).

#### 2.4.1. Gag

Inicialmente a região do gene *gag*, nucleotídeos 802 a 2019, é traduzida em uma poliproteína precursora, a p55, a qual é subsequentemente clivada para formar os polipeptídeos maduros de **gag**: a MA, de 19 kDa (p19), o CA, de 24 kDa (p24) e o NC de 15 kDa (p15). A proteína precursora p55, após miristilação, migra e se liga à superfície interna da membrana celular. A MA sofre modificação pós-transcricional, como os outros produtos de *gag* e contém ácido mirístico na sua terminação NH<sub>2</sub>. Este fato parece ser importante na migração e brotamento das partículas virais nas células infectadas, como ocorre com outros retrovírus, e talvez também com o HTLV. Uma grande variedade de outros polipeptídeos relacionada com *gag* foi encontrada em células infectadas pelo HTLV, incluindo alguns de 70, 55, 37, 29 e 28 kDa. O mapeamento de peptídeos destas proteínas indicou que eles seriam precursores imaturos de **gag**, mas experimentos de “pulso e caça” sugeriram que p55 seria o precursor original (CANN & CHEN, 1996; PROIETTI & MARTINS, 2000; revisado por GRANT *et al.*, 2002).

#### 2.4.2. Polimerase (pol)

Além da região de nucleotídeos 2497 a 5187, delimitada pelo gene *pol*, é necessário um evento de “frame-shifting” para expressar a polimerase (**pol**), um peptídeo de 864 aa. Sua terminação 5’ codifica a proteína RT e “downstream”, as funções da IN, e da RNase H (CANN & CHEN, 1996; PROIETTI & MARTINS, 2000; GRANT *et al.*, 2002).

### 2.4.3. Protease (pro)

Uma ORF que vai da porção terminal 3' do gene *gag* até a porção 5' de *pol* codifica a protease (**pro**). Em alguns clones do HTLV-1, a ORF da protease contém códons de terminação que devem ser os responsáveis pela perda de infectividade destes clones. *In vitro*, as funções da protease são de processar os produtos maduros de **gag**, gerar a molécula madura de protease por clivagem auto-catalizada (CANN & CHEN, 1996; PROIETTI & MARTINS, 2000; revisado por GRANT *et al.*, 2002).

### 2.4.4. Envelope (env)

O gene *env* codifica uma glicoproteína precursora (**env**) de 61 ou 68 kDa, que é detectada na superfície das células infectadas. Algumas glicoproteínas de alto peso molecular, relacionadas com as glicoproteínas acima citadas, têm sido o resultado de fusões anormais das proteínas **env** e **tax**. A glicoproteína precursora é clivada em duas proteínas maduras: a SU (gp46) e a TM (p21) ou (p21e). Sobrenadantes de células transformadas pelo HTLV contêm grandes quantidades de gp46 livres que se desprendem da superfície da célula. As glicoproteínas do envelope, por ativarem respostas humoral e celular, seriam boas candidatas para uma possível vacina para o HTLV. (CANN & CHEN, 1996; PROIETTI & MARTINS, 2000).

A expressão da proteína **env** do HTLV-1 na superfície celular é essencial para a capacidade de formação de sincício pelas células infectadas. Um aumento de **env** tem uma implicação importante na transmissão célula a célula pelo HTLV-1, pois ele é primariamente transmitido entre células infectadas e não infectadas através da fusão de membranas celulares (ANDREWS *et al.*, 1998). Assim as glicoproteínas de **env** exercem um papel crucial na infecção viral, como a facilitação da ligação com o receptor celular e da penetração na célula. Existem evidências de que o HTLV-1, através da interação de gp46 com o receptor celular é um agente mitogênico para células T em repouso. A replicação dos retrovírus é geralmente bloqueada em células quiescentes e a menos que elas sejam induzidas a entrarem na fase S da replicação celular, não ocorre infecção produtiva. É sabido que 95% das células T na circulação periférica encontram-se no estado de repouso. A proliferação de células T quiescentes normais por mitose induz também a expressão dos genes interleucina-2 (IL-2) e do receptor de IL-2 (IL-2R), que por sua vez são importantes no processo de ativação celular.

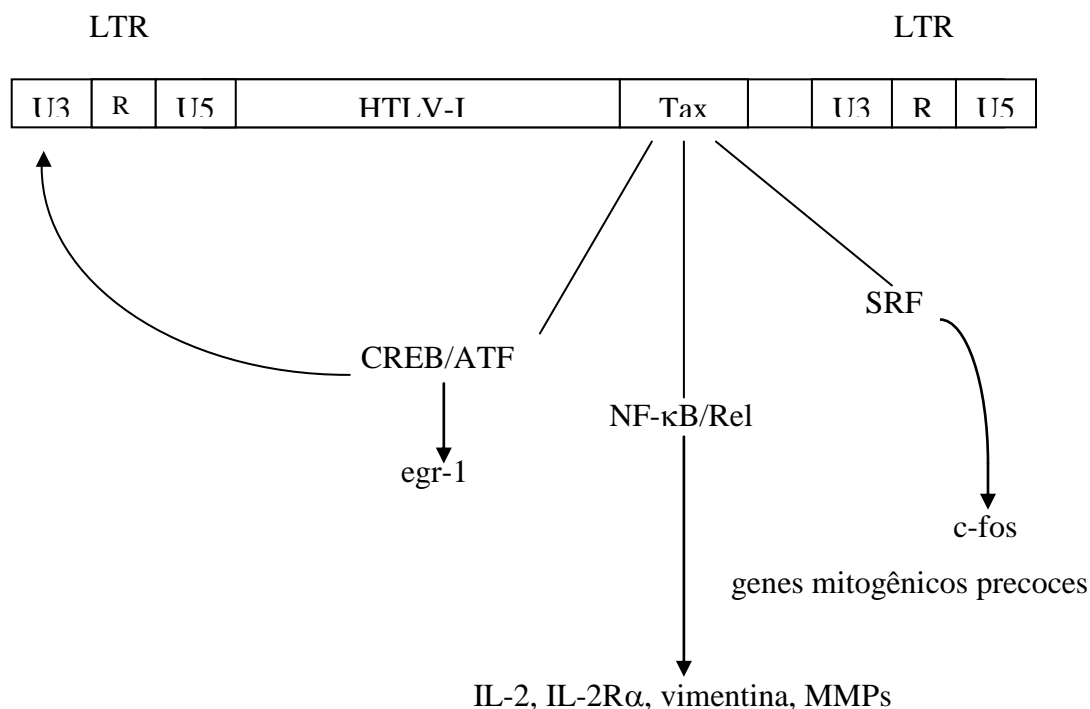
Esta ativação inicial de células em repouso é fundamental no estabelecimento da replicação retroviral e na proliferação policlonal de células alvo apropriadas. Esta atividade mitogênica parece operar via CD2/LFA-3 (função linfocitóide associada ao antígeno 3) e LFA-1/ICAM-1 (função linfocitóide associada ao antígeno 1/molécula de adesão intercelular-1) e também IL-2/IL-2R (interleucina 2/receptor de interleucina 2) (CANN & CHEN, 1996; revisado por JOHNSON, J. M., *et al*, 2001).

#### 2.4.5. Tax

O gene *tax* codifica uma proteína de 40 kDa, que está localizada primariamente numa região chamada de matriz nuclear, no núcleo das células infectadas. A proteína **tax** estimula a replicação viral aumentando a taxa de transcrição inicial por ação indireta em três regiões “enhancer” (FIGURA 5), na região U3 da terminação 5’ LTR do genoma proviral (revisado por JOHNSON *et al.*, 2001; revisado por GRANT *et al.*, 2002).

A proteína **tax** é uma nucleoproteína transativadora, que age sem se ligar diretamente com o DNA, porém, interage com e/ou modifica fatores transcricionais celulares pré-existentes. Todos estes fatores modulam a transcrição viral e redirecionam a replicação viral em etapas precoces e tardias. Do mesmo modo, ao interagir com diferentes proteínas regulatórias celulares, **tax** pode induzir indiretamente replicação viral em etapas precoces e tardias. Pode também induzir indiretamente a expressão de genes celulares de crescimento, *c-fos*, *c-myc* e *egr*; fatores de crescimento ou seus receptores, como IL-1, IL-2, IL-3, IL-6 (interleucinas 1,2,3 e 6), IL-2R $\alpha$  (cadeia  $\alpha$  do receptor para IL-2), GM-CSF (fator estimulante de colônias de macrófago-granulócito), TGF- $\beta$  (fator de crescimento tumoral  $\beta$ ), vimentina (proteína do citoesqueleto), MHC-1 (complexo principal de histocompatibilidade de classe 1) e outros. Por causa desta atividade, **tax** está potencialmente envolvida no processo de transformação das células infectadas pelo HTLV.

**Tax** aumenta a taxa de dimerização das proteínas “bZip” que se ligam ao DNA por uma região ligante básica de domínio de leucina (“enhancer”). Estas proteínas incluem: adenosina monofosfato cíclico (c-AMP) de resposta de ligação (CREB), fator de ativação de transcrição (CREB/ATF) e outros. A dimerização destas proteínas é necessária para a ligação com o DNA e conseqüente ativação da transcrição (MARTINS, 2000; revisado por FRANCHINI, 2000; revisado por JOHNSON *et al.*, 2001; revisado por GRANT *et al.*, 2002).



**FIGURA 5:** As três vias de transativação por **Tax** ( PROIETTI & MARTINS, 2000).

**Tax** ativa também o sítio de ligação para membros da família de proteínas NF- $\kappa$ B (fator nuclear  $\kappa$  B). As proteínas NF- $\kappa$ B atuam como fatores de transcrição e para isto devem ser translocadas para o núcleo e se ligarem a sítios específicos no DNA celular. Este controle é feito através do complexo I $\kappa$ B $\alpha$  /NF- $\kappa$ B (inibidor do fator nuclear  $\kappa$  B/ fator nuclear  $\kappa$  B). **Tax** afeta a ativação de NF- $\kappa$ B se ligando ao inibidor I $\kappa$ B $\alpha$  e liberando NF- $\kappa$ B, que fica livre para se translocar para o núcleo, e se ligando a NF- $\kappa$ B no núcleo e potencializando a sua atividade. As proteínas NF- $\kappa$ B tem um papel importante na transcrição celular e na ativação imunológica das células linfóides. O promotor das metaloproteinases é ativado pela ação de NF- $\kappa$ B. As metaloproteinases promovem a destruição da matriz extracelular e da membrana basal dos tecidos infectados o que facilita o trânsito das células infectadas. Os genes IL-2 e IL-2R $\alpha$  contém sítios para ligação de NF- $\kappa$ B. A ativação da via de sinalização IL-2/IL-2R é importante para a célula se multiplicar, mas uma vez transformada pelo HTLV-1 ela passa a se auto-estimular indefinidamente e ocorre sua imortalização, com a expansão policlonal das células infectadas, agora independentes de IL-2.

Esta proliferação independente de IL-2 vem sendo relacionada com a ativação constitutiva das proteínas JAK/STAT (sinal de transdução e ativação de transcrição), mas para haver transformação completa em célula neoplásica parece ser necessária a participação de



outros fatores como, por exemplo, a recém-descoberta proteína viral p12 (MARTINS, 2000; revisado por FRANCHINI, 2000; revisado por JOHNSON *et al.*, 2001; revisado por GRANT *et al.*, 2002).

Outro “enhancer” é o sítio de SRE (elemento de resposta do soro) e **tax** se liga ao SRF (fator de resposta do soro) potencializando a ligação com SRE e estimulando os genes que contêm esta seqüência, como o proto-oncogene c-fos, e outros genes de resposta imediata de crescimento, levando a um descontrole nos estágios iniciais de ativação de células T, culminando com sua transformação. Outro evento celular que também pode participar na imortalização das células infectadas pelo HTLV é a inativação da proteína p53-supressora de tumor. **Tax** também poderia contribuir indiretamente com o aumento de danos nos cromossomos e do número de mutações oncogênicas acumuladas nas células infectadas por reduzir os níveis intracelulares de  $\beta$ -polimerase, uma enzima celular envolvida no reparo de danos no DNA (MARTINS, 2000; revisado por FRANCHINI, 2000; revisado por JOHNSON *et al.*, 2001; revisado por GRANT *et al.*, 2002).

**Tax** também afeta proteínas regulatórias do ciclo celular. As ciclinas dependentes de quinases, (CDK4 e CDK6), formam complexos com as ciclinas do tipo D promovendo a fosforilação da proteína retinoblastoma supressora de tumor (Rb), com liberação de E2F e estimulação da progressão do ciclo celular de G1 para S. **Tax** se liga com INK4 (proteína inibidora de quinases 4) e interfere com a capacidade de p16<sup>INK4A</sup> reprimir a atividade de CDK4 (revisado por FRANCHINI, 2000).

Geralmente, p53 (proteína supressora de tumor) é expressa após dano no DNA, resultando em inibição de G1 e indução da apoptose. **Tax** aumenta a expressão de p53, mas sua atividade transcricional é inativada por hiperfosforilação. E finalmente **tax** afeta o “checkpoint” da passagem de G2/M, resultando em perpetuação de anormalidades cariotípicas, por exemplo, a inibição de MAD-1 (proteína de segregação mitótica-1), que resulta em multinucleação celular (revisado por FRANCHINI, 2000).

Através de um estudo com modelo animal para desenvolvimento da leucemogênese do HTLV-1 em camundongos transgênicos e imunocomprometidos, foi possível verificar que a proteína **tax** por si só é capaz de produzir leucemia nos compartimentos linfóides por estímulo de certas citocinas e moléculas de adesão que tomam parte importante na infiltração dos órgãos por células leucêmicas e no desenvolvimento da doença (GROSSMAN & RATNER, 1997).

#### 2.4.6. Rex

O gene *rex* codifica uma proteína de 27 kDa e outra de 21 kDa. O maior produto do gene *rex* é uma fosfoproteína também localizada no núcleo, particularmente no nucléolo das células infectadas, que parece se ligar diretamente a uma seqüência de *gag*, *pol* e *env*, respectivamente, e aumentar a expressão destas proteínas virais promovendo uma distribuição subcelular do núcleo para o citoplasma, isto é, através de uma regulação pós-transcricional. Os efeitos de **rex** são mediados através de seqüências específicas *cis* nas LTR. O aumento da expressão das seqüências líder (região R/U5) codificadas na terminação 5' dos mRNAs pela proteína **rex**, requer duas distintas seqüências em *cis*. Uma é a chamada RxRE, elemento de resposta a **rex**, que faz com que **rex** sobreponha o efeito inibidor da outra, chamada CRS, seqüência repressiva em *cis*. No HTLV-1, RxRE está localizada na terminação 3' da LTR do vírus. A região U5 desta LTR contém seqüências funcionalmente definidas como CRS. (CANN & CHEN, 1996; revisado por FRANCHINI *et al.*, 2000; revisado por GRANT *et al.*, 2002).

Desta forma **rex** atua como um regulador pós-transcricional do genoma do HTLV-1 ao controlar o processamento do mRNA viral. **Rex** regula positivamente a transcrição de mRNA não processado, que codifica as proteínas **gag/pol** e processado, que codifica as proteínas do envelope. **Rex** regula negativamente a transcrição de mRNA duplamente processados, que codificam a própria proteína **rex**, a proteína **tax** e outros mRNAs de processamentos alternativos (MARTINS, 2000; revisado por GRANT *et al.*, 2002).

#### 2.4.7. As proteínas p12<sup>I</sup>, p30<sup>II</sup> e p13<sup>II</sup>

A ORF<sup>I</sup> codifica uma proteína de 12 kDa encontrada *in vitro* e *ex vivo* em linfócitos T e macrófagos infectados, e se localiza no retículo endoplasmático e no Complexo de Golgi. A proteína p12<sup>I</sup> interage com as cadeias  $\beta$  e  $\gamma$  de IL-2R (receptor de interleucina 2). A interação de p12 com as cadeias  $\beta$  e  $\gamma$  de IL-2R reteria estas cadeias fazendo com que a via Jak/Stat de transdução de sinal não liberasse mais IL-2, disparando os eventos de sinalização por esta via sem a necessidade de IL-2 no meio extracelular. Isto foi verificado em cultura de células mononucleares do sangue periférico *in vitro* e corresponderia ao que acontece *in vivo* nas etapas iniciais da leucemogênese. A proteína p12<sup>I</sup> confere uma vantagem proliferativa nas células infectadas por HTLV-1 na presença de estímulo antigênico diminuído ativando a

célula hospedeira nos estágios iniciais da infecção (FRANCHINI *et al.*, 2000; revisado por JOHNSON *et al.*, 2001; NICOT *et al.*, 2001; revisado por GRANT *et al.*, 2002).

A proteína p12<sup>I</sup> se liga com a cadeia pesada de MHC de classe I *in vitro* e previne sua associação com  $\beta_2$ -microglobulina. O complexo MHC I-Hc/p12<sup>I</sup> é em parte alvo para degradação por proteassomo, o que altera o tráfico deste complexo para a membrana celular, diminuindo a apresentação de antígenos e prevenindo a lise celular pelos linfócitos T citotóxicos (CTLs) (revisado por FRANCHINI *et al.*, 2000; revisado por JOHNSON *et al.*, 2001; revisado por GRANT *et al.*, 2002).

As proteínas p13<sup>II</sup> e p30<sup>II</sup>, codificadas pela ORF<sup>II</sup> não são essenciais para a multiplicação viral mas são importantes para a infectividade do vírus (estudos *in vitro*). A proteína p13, codificada por um mRNA de processamento simples se localiza na mitocôndria *in vitro* e quando expressa altera a sua estrutura e seu potencial de membrana, o que pode ser relevante para a patogenicidade do vírus (revisado por JOHNSON *et al.*, 2001; revisado por D'AGOSTINO *et al.*, 2001).

Codificada por um mRNA duplamente processado p30<sup>II</sup> está localizada no nucléolo e contém domínios ricos em serina e homologia com vários ativadores transcricionais o que sugere o seu papel como modulador transcricional de genes celulares (revisado por JOHNSON *et al.*, 2001; revisado por D'AGOSTINO *et al.*, 2001; revisado por GRANT *et al.*, 2002).

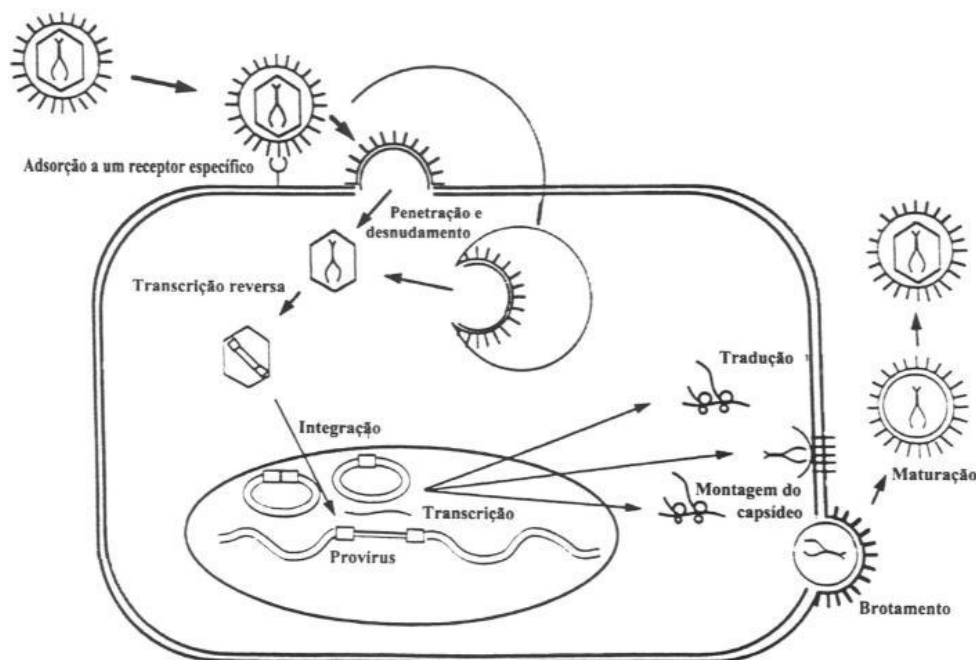
## 2.5. Ciclo de multiplicação

O HTLV-1 infecta diferentes tipos de células humanas e animais *in vivo*. Estudo realizado por SETOYAMA *et al.* (1998), revelou a existência de provírus do HTLV-1 no núcleo de células do endotélio vascular e em algumas células epiteliais das glândulas sudoríparas. A presença de provírus foi também descrita em linfócitos T CD8+, monócitos no sangue, células dendríticas, linfócitos B e astrócito no SNC, infectados pelo HTLV-1 (revisado por GRANT *et al.*, 2002). Até então o provírus de HTLV-1 só tinha sido demonstrado, *in vivo*, em linfócitos T e monócitos (COSCOY *et al.*, 1997).

A infecção *in vitro* ocorre através do co-cultivo de células alvo com as células de linhagem transformadas pelo HTLV-1, pois as preparações contendo partículas virais livres são pouco infecciosas. A capacidade do HTLV-1 de infectar vários tipos celulares *in vivo* e *in*

*in vitro* sugere que o receptor celular é expresso de forma ubíqua na natureza (revisado por FRANCHINI *et al.*, 2000).

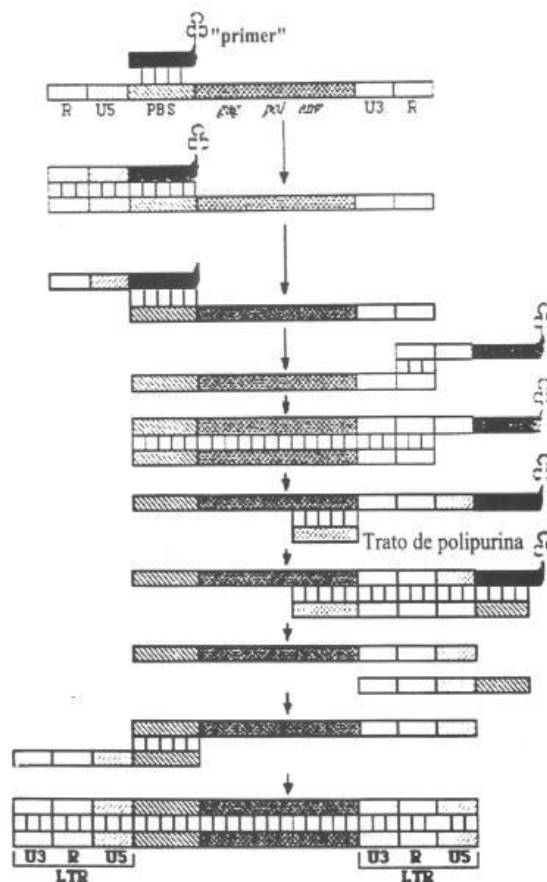
Para iniciar a infecção (FIGURA 6), a glicoproteína de superfície do envelope se liga a um receptor específico, ainda não conhecido na superfície da célula hospedeira. Através de uma provável mudança na conformação química da estrutura quaternária da glicoproteína das espículas do envelope (SU), ocorre uma exposição do sítio de fusão da proteína transmembrana (TM), levando à fusão do envelope do vírus com a membrana celular. A penetração e o desnudamento da partícula viral são pouco conhecidos, mas sabe-se que este desnudamento é parcial, ficando vestígios de capsídeo e nucleocapsídeo dentro do citoplasma. A transcrição reversa inicia-se dentro desta estrutura, com os nucleotídeos, o RNA e a RT virais, livres na matriz amorfa, e continua dentro do citoplasma da célula até formar o provírus, uma fita dupla de DNA contendo as LTR (CANN & CHEN, 1996).



**FIGURA 6:** Ciclo de multiplicação dos retrovírus. (CANN & CHEN, 1996).

A síntese da fita de DNA senso negativo inicia-se com o iniciador de tRNA<sup>PRO</sup> que se encontra ligado a PBS na terminação 5' do RNA viral. À medida que esta fita vai sendo sintetizada, simultaneamente pela ação da RnaseH a fita molde de RNA viral vai sendo destruída.

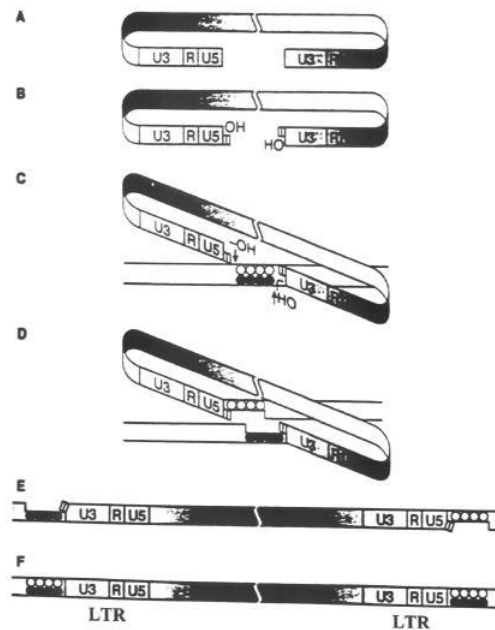
Ocorre um primeiro “salto” e a região R, U5, recentemente sintetizada vai se ligar na região R da terminação 3’ da fita molde de RNA, e a síntese da fita DNA senso negativo continua até a região de PBS. A síntese da fita DNA senso positivo é iniciada, tendo o trato de PPT da fita molde, resistente à ação de RnaseH, como iniciador. Ocorre um segundo “salto” e a fita DNA senso positivo se liga à região homóloga de PBS na fita DNA senso negativo. A síntese procede nos dois sentidos até formar o provírus, (FIGURA 7) (CANN & CHEN, 1996).



**FIGURA 7:** Síntese da fita dupla de DNA viral (provírus) (CANN & CHEN, 1996 mod.).

Depois desta fase citoplasmática o provírus migra para dentro do núcleo, aonde vai se integrar com o DNA do hospedeiro, pela ação da IN. O provírus se integra de forma randômica no DNA da célula hospedeira (recombinação não homóloga). A integração é um processo bastante específico em relação ao genoma do provírus e a forma linear é o substrato utilizado nesta integração. A integração ocorre em três fases distintas. Primeiro, duas bases são removidas de ambas as terminações 3’ das LTRs do provírus, pela ação da IN. Segundo,

as terminações 3'-OH são pareadas com 4-6 pares de bases em algum ponto de fragilidade genética do DNA do hospedeiro, que é então clivado. Terceiro, as falhas (“gaps”), e as bases não pareadas são reparadas, e uma vez integrado, o provírus se torna estável e não pode ser excisado(FIGURA 8) (CANN, 1997; CANN & CHEN, 1996; PROIETTI & MARTINS, 2000).



**FIGURA 8:** Integração da fita dupla de DNA com a formação do provírus. **A e B:** remoção de bases das LTRs do provírus pela ação da integrase; **C e D:** as terminações 3' –OH são pareadas com o DNA do hospedeiro, que é então clivado; **E e F:** as falhas (“gaps”) e as bases não pareadas são reparadas (CANN & CHEN, 1996).

Três formas de provírus são encontradas em todas as células infectadas: a) uma forma circular com uma LTR (não infecciosa), b) uma forma circular com duas LTR (infecciosa), c) uma forma linear com duas LTR (infecciosa) (CANN & CHEN, 1996; CANN, 1997).

Ainda dentro do núcleo o DNA proviral é transcrito pela maquinaria celular através da enzima RNA polimerase II DNA-dependente. A região U3 da LTR contem os promotores responsáveis pela iniciação da transcrição, que sofrem também a ação de **tax**, uma proteína que regula a expressão transcricional e pós-transcricional dos mRNA. Três diferentes tipos de mRNAs, contendo um “cap” e o sinal de poliadenilação são produzidos e transportados para o citoplasma onde serão traduzidos. A saber, um mRNA total, genômico, que será empacotado

para formar o vírion e/ou será utilizado para a síntese das proteínas **gag** e **pol**; um mRNA subgenômico, com a remoção de um intron, que codifica os produtos do gene *env*, e com a remoção de dois introns, um segundo mRNA subgenômico, que codifica as proteínas **tax**, **rex**, **p12<sup>I</sup>**, **p30<sup>II</sup>** e **p13<sup>II</sup>** em ORFs alternativas (CANN & CHEN, 1996; PROIETTI & MARTINS, 2000; revisado por GRANT *et al.*, 2002).

A montagem da partícula viral é um processo pouco conhecido na replicação dos retrovírus. No caso do HTLV ela ocorre na superfície da célula infectada e é simultânea com o brotamento da partícula viral, num processo dinâmico. As proteínas processadas de *env* são exportadas para a membrana celular sinalizando o local da montagem para as proteínas da MA e do CA. As proteínas do envelope permanecem na parte mais externa da membrana e as proteínas de *gag* na parte interna, onde as proteínas do NC se ligam ao RNA genômico, e a partícula pode ser liberada para o meio externo (CANN & CHEN, 1996; PROIETTI & MARTINS, 2000).

A maturação da partícula viral é iniciada por clivagens sucessivas catalisadas pela protease. As mudanças estruturais da partícula imatura, com seu capsídeo pouco visível (partícula vazia), leva à formação da partícula madura, com seu nucleocapsídeo condensado bem visível ao microscópio eletrônico (partícula cheia) (CANN & CHEN, 1996; PROIETTI & MARTINS, 2000).

### **3. Variabilidade genética do HTLV**

As pesquisas com o HTLV-1, de 1990 a 1994, foram no intuito de fazer ligações entre os achados epidemiológicos e os estudos moleculares, e posterior associação dos subtipos encontrados com uma patologia em particular, o que não foi verificado. Apesar disto, o avanço técnico da PCR e do seqüenciamento do DNA nos últimos anos trouxeram novas perspectivas à tentativa de correlacionar os dados epidemiológicos aos dados moleculares com a finalidade de identificar determinantes genéticos específicos para determinada patologia. Entretanto, para que uma variação na seqüência de nucleotídeos seja relacionada com uma condição patológica, deve ser excluída a possibilidade potencial de uma mutação pontual subtipo-específica. Até o presente momento nenhum “cluster” de seqüência doença-específica foi encontrado em amostras de HTLV-1 isolados de portadores, pacientes com ATL ou HAM/TSP; nem com tropismo celular-específico do vírus em isolados contendo seqüências divergentes, como acontece com o HIV-1 (FERREIRA & MARTINS, 2000).

Sequenciamento de vários isolados de HTLV-1 em regiões endêmicas e não endêmicas mostraram uma marcante similaridade, com um grau muito baixo de variabilidade, da ordem de 1 a 3,5% em nível de nucleotídeos. Isolados do Japão tem mostrado de 97 a 99% de similaridade, e mesmo isolados obtidos de diferentes regiões geográficas como, por exemplo, Caribe, Japão e África, mostraram de 96 a 99% de similaridade. Uma grande variabilidade genética foi encontrada entre os isolados de populações remotas da Melanésia e dos aborígenes australianos. A seqüência de nucleotídeos de MEL5, um isolado das Ilhas Solomon, mostrou divergência de 8,5% do isolado ATK, um protótipo japonês de um paciente com ATL, enquanto a região env de um isolado australiano MSHR-1, mostrou uma variabilidade de 6,5 a 7%. Uma análise filogenética sugeriu que os isolados australiano e melanésio poderiam ter evoluído de um ancestral comum (SALEMI, 1998).

Baseado nestes dados foi observado que pequenas mudanças nos nucleotídeos entre os isolados, “clusters”, estavam mais associadas com a origem geográfica dos pacientes e sua origem étnica do que com diferentes tipos de patologia (SEGURADO *et al.*, 2002).

O HTLV-1 e o HTLV-2 apresentam 65% de similaridade em nível de seqüência de nucleotídeos. A similaridade é baixa na região das LTR e da região não codificadora e alta na região de tax e rex (CANN & CHEN, 1996).

A baixa variabilidade genética do HTLV está provavelmente relacionada com o fato de que a replicação passiva do provírus via expansão clonal das células infectadas é preferido à replicação viral por transcrição reversa o que permite ao vírus um grau de escape à pressão evolucionária positiva exercida pelo ambiente e pela resposta imune do hospedeiro (VAN DOOREN *et al.*, 1998; GESSAIN & MAHIEUX, 2000).

#### **4. Epidemiologia**

A presente distribuição do HTLV deve ser interpretada através de “background” antropológicos das populações infectadas, como também do contato espacial entre elas. Análises moleculares têm mostrado um ancestral comum, o PTLV-1 (vírus linfotrópico de células T de primatas, tipo 1), entre o HTLV-1 e o STLV-1 (vírus linfotrópico de células T de símios, tipo 1). O PTLV é provavelmente um vírus africano, mas o PTLV-1 parece ter uma origem asiática. Este vírus provavelmente migrou de um símio da Ásia de volta para a África e evoluiu através de transmissões inter-espécies na Ásia e África para diferentes subtipos em humanos (VAN DOOREN *et al.* 1998).



Sugerindo uma história evolucionária marcada por repetidas transmissões inter e intra-espécies dentro de uma mesma região, e devido a uma taxa diminuída de transmissão horizontal, ocorreu a persistência do HTLV-1 entre populações humanas isoladas e a recente distribuição global do vírus através de migrações das populações infectadas (YAMASHITA *et al.*, 1998).

Assim a epidemiologia molecular do HTLV-1 e do STLV-1, nos dá importante suporte para entender a origem e a disseminação deste retrovírus, os movimentos da raça humana através do mundo, no passado, e o surgimento de novos isolados virais (FIGURA 9) (YAMASHITA, M. *et al.*, 1996; SALEMI, M. *et al.*, 1998; revisado por SLATTERY, J. *et al.*, 2000).

O HTLV-1 está distribuído pelo mundo inteiro, mas é endêmico no Japão, no Caribe, na região oeste e central da África, em vários países da América do Sul, incluindo o Brasil e na Melanésia/Austrália. Assim o HTLV-1 pode ser classificado em três grandes genótipos geográficos: HTLV-1a, o Cosmopolita; HTLV-1b, o da África Central e HTLV-1c, o da Melanésia. Cada um desses grupos parece ter evoluído de transmissão remota inter-espécies entre macacos infectados com STLV-1 e humanos (LIU *et al.*, 1996).

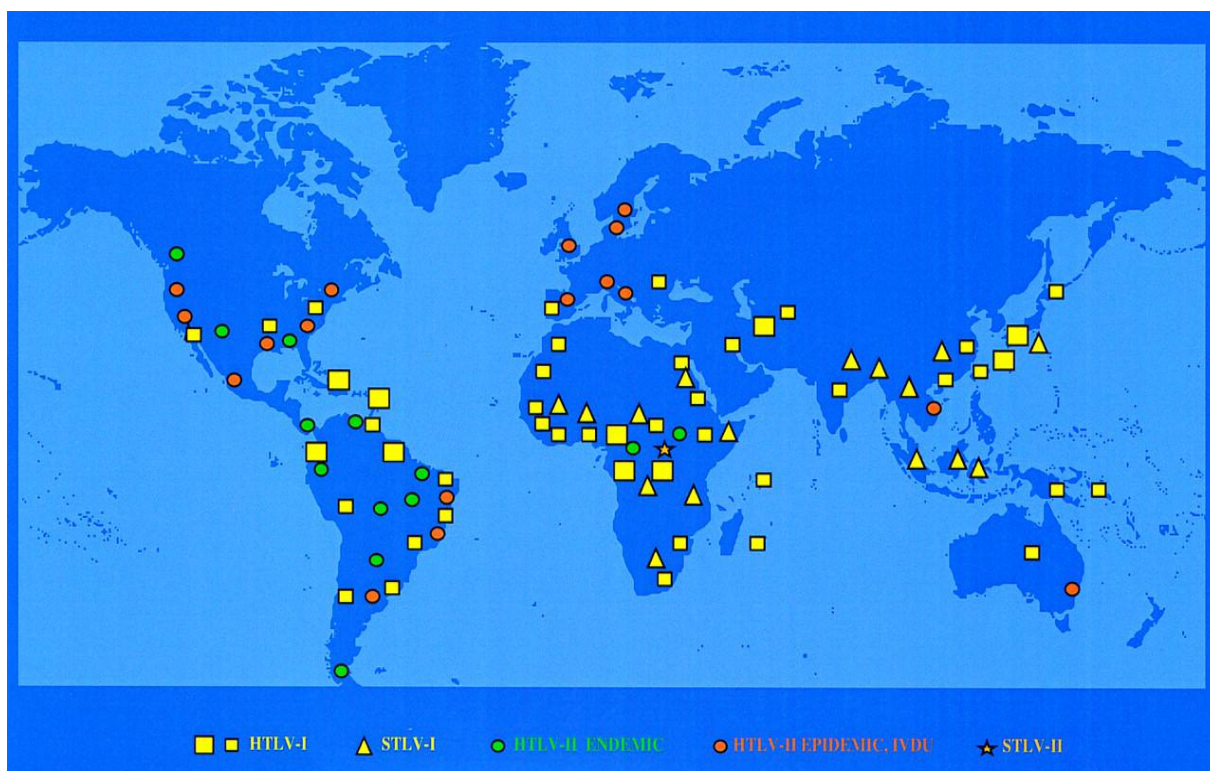
Estudos posteriores baseados na região das LTR e de *env* indicaram que entre estes três maiores grupos havia subgrupos definidos por mutações específicas, mas nem sempre suportados pela análise filogenética. Assim, foram designados quatro subgrupos dentro do grupo Cosmopolita: subgrupo A (Transcontinental), B (Japão), C (Oeste da África/Caribe) e D (Norte da África) (Miura *et al.*, 1997).

No Japão, estão presentes dois subgrupos: o clássico Cosmopolita A (Transcontinental) representando 25% do total e o B. Da mesma forma, os subgrupos C e D estão geralmente limitados às suas respectivas áreas. O subgrupo Transcontinental está amplamente distribuído no mundo. Assim, nas Américas são encontrados os subgrupos A e C. Dentro do grupo Central Africano, temos o subgrupo dos Pigmeus, descrito como HTLV-1d e que difere dos demais habitantes da região (GESSAIN *et al.*, 1996; SALEMI *et al.*, 1998).

A descrição de dois novos subgrupos foi feita posteriormente, suportados pela análise filogenética: o HTLV-1e e o HTLV-1f, que foram isolados de indivíduos soro-indeterminados da África Central (SALEMI *et al.*, 1998).

Um estudo filogenético de 27 amostras de HTLV-1 no Brasil, de indivíduos etnicamente diferentes, mostrou que sua recente introdução a partir do Japão está limitada aos imigrantes japoneses. Seis das novas amostras não apresentaram similaridade entre si e

divergiram daquelas da África e Japão, mas foram similares àsquelas de outros países sul americanos. Estes resultados sugerem que a divergência da maioria dos subtipos do HTLV-1 prevalentes na América do Sul foi a partir dos ancestrais ameríndios, que possuíam este retrovírus desde o seu estabelecimento na América (YAMASHITA *et al.*,1999).



**FIGURA 9:** Distribuição dos vírus STLV-1 e HTLV-1 ao redor do mundo. Através do estudo de epidemiologia molecular destas viroses podemos observar como o HTLV-1 evoluiu através de transmissões inter-espécies e de deslocamentos de populações infectadas em épocas remotas e recentes (retângulos pequenos: HTLV-1; retângulos grandes: HTLV-1 endêmico; elipse verde: STLV-1; elipse laranja: grupos étnicos endêmicos para o HTLV-2; estrela: STLV-2) (revisado por SLATTERY, J. *et al.*, 2000).

Estudos em 42 portadores assintomáticos do HTLV-1 e 28 pacientes de HAM/TSP no Brasil, através de análise por RFLP da região LTR do provírus identificou entre os portadores, 73,8% pertencentes ao grupo cosmopolita, subgrupo A; 7,1 % do subgrupo B; 7,1% do subgrupo C, e 12% do subtipo E. Entre os pacientes com HAM/TSP, 89,3% eram do subgrupo A; 7,1% do subgrupo C; e 3,6% do subtipo E. Este último exhibe um padrão de RFLP da seqüência do provírus na região de LTR, que tem muita similaridade com o

subgrupo cosmopolita A e difere somente pela perda do nucleotídeo 113 no local de restrição de ApaI (SEGURADO *et al.*, 2002).

Enquanto o HTLV-1 tem distribuição mais cosmopolita, o HTLV-2 é mais restrito ao hemisfério ocidental (CATALAN SOARES *et al.*, 2000).

O HTLV-2 está restrito a dois diferentes subtipos, 2a e 2b, que apresentam similaridade de 95% . Estudos preliminares mostraram que o HTLV-2b predomina entre os índios nas Américas (Seminole na Flórida, Guaymi no Panamá, Cayapo e Kraho no Brasil e Navajo e Pueblo, no Novo México) e usuários de drogas intravenosas italianos, enquanto os dois subtipos são encontrados em áreas urbanas e entre usuários de drogas intravenosas nos Estados Unidos (revisado por SLATTERY *et al.*, 1999).

Do ponto de vista epidemiológico, a infecção pelo HTLV-1 e 2 se caracteriza por agrupamento ("cluster") da infecção em algumas regiões geográficas no mundo, variação espacial das taxas de soroprevalência, aumento da soroprevalência com a idade e soroprevalência mais elevada em mulheres (CATALAN SOARES, 2000).

O arquipélago do Japão é uma área com soroprevalência especialmente elevada. Áreas endêmicas do Japão atingem soroprevalência de 37% até 45% (sudeste, Shikoku, e nordeste, Hokkaido). Outros países da Ásia, como Coréia, Taiwan e República Popular da China, não apresentam soroprevalência elevada. O Caribe é a segunda área endêmica mais estudada. Soroprevalência em torno de 5% é observada na Jamaica, Barbados e Haiti. Na África, estudo realizado em sete países demonstrou uma tendência de aumento da soroprevalência a partir do norte para o sul, variando de 0,6% em Marrocos a 17% na Tanzânia. Na Europa a infecção pelo HTLV-1 e 2 parece ser rara, restrita a certos grupos, que são imigrantes de áreas endêmicas, hemofílicos, homo e bissexuais e usuários de drogas intravenosas (UDIV). Nos Estados Unidos a soroprevalência é baixa, com valores de 0,016% em um estudo com 4,5 milhões de doadores de sangue e soroprevalência de 0,025% em 400.000 doadores de sangue (CATALAN SOARES *et al.*, 2000).

Considerando a América do Sul, na Venezuela a soroprevalência é de 6,8% em amostra da população geral; na Colômbia, foi demonstrada a soroprevalência de 4,3% entre indivíduos vivendo na área litorânea, e de 0,6% na área montanhosa; no Chile foi observada a soroprevalência de 0,73% entre 954 doadores de sangue; na Argentina a soroprevalência foi de 0,07% em 12.891 doadores de sangue; no Peru, soroprevalência de 7% entre mulheres profissionais do sexo (DOURADO *et al.*, 1999; CATALAN SOARES *et al.*, 2000).

No Brasil, predomina o grupo cosmopolita, subgrupo transcontinental, com o HTLV-1 presente em todas as regiões. A soroprevalência média encontrada entre doadores é cerca de 20 a 100 vezes maior do que aquela relatada para os Estados Unidos e Europa. Existem cerca de 750.000 indivíduos HTLV-1 e 2 soropositivos para uma população de 150 milhões de habitantes. Considerando a área territorial e a soroprevalência média observada em indivíduos aptos à doação, o Brasil é o país com o maior número absoluto de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e 2 do mundo (CATALAN SOARES *et al.*, 2000).

Os estudos de prevalência têm considerado grupos específicos (candidatos à doação de sangue, gestantes, pacientes co-infectados e com doenças sexualmente transmissíveis); portanto em nosso meio ainda não temos dados de prevalência de base populacional. Estudo realizado em algumas capitais brasileiras, utilizando metodologia única na coleta, estocagem, transporte e testes de 1200 amostras para o HTLV-1 e 2 detectou a seguinte soropositividade: Manaus, 0,08%; Recife, 0,33%; Salvador, 1,35%; Rio de Janeiro, 0,33%; e Florianópolis, 0,08%. Em Belém do Pará foram detectados anticorpos contra o HTLV-1 e 2 em 1,6% de 809 amostras de sangue de doadores. No Rio de Janeiro, foi encontrada soroprevalência de 13% para o HTLV-1 e 2 entre indivíduos pertencentes à grupos de risco para adquirir a infecção pelo HIV. Em São Paulo, entre 17.063 doadores, 0,15% foram soropositivos para o HTLV-1 e 2, valor este que foi de 0,41% entre 961 amostras de doadores de sangue, em outro estudo. Em Minas Gerais, a soroprevalência para o HTLV-1 e 2 foi de 0,32% entre 1.877 doadores. Em Belo Horizonte, soroprevalência de 4,9% para o HTLV-1 e 2 foi encontrada entre 148 hemofílicos (CATALAN SOARES *et al.*, 2000).

Inicialmente foram utilizados testes de ELISA com lisados virais, que possuíam baixa sensibilidade e especificidade para a detecção de anticorpos contra o HTLV-1 e 2, e superestimavam a soroprevalência para o vírus. Os testes de triagem utilizados, sem outros testes complementares e específicos, não permitiam discriminar entre HTLV-1 e HTLV-2. Quando esses estudos eram suplementados usualmente por Western blot discriminatório ou imunofluorescência, a soropositividade era devida à presença de anticorpos anti-HTLV-1, que é o vírus mais prevalente em todo o mundo. A falta de uma padronização e de uniformidade da metodologia utilizada para o diagnóstico, tanto na triagem quanto para os testes suplementares para o HTLV-1 e 2, dificulta um estudo comparativo entre os trabalhos realizados em momentos diferentes e em áreas diversas do mundo (CATALAN SOARES *et al.*, 2000).

A história natural da infecção pelo HTLV-1 e 2 não foi ainda completamente elucidada em parte devido ao longo período de tempo decorrente entre a infecção e o surgimento da sintomatologia, o que parece estar relacionado com a via de transmissão do vírus. Esta pode ocorrer de forma vertical, pelo aleitamento materno, e de forma horizontal através de contato sexual, principalmente do homem para a mulher; também pela transfusão de sangue e hemoderivados e através de seringas e agulhas contaminadas com sangue. Em todos estes casos existe a dependência da transmissão célula à célula (CATALAN SOARES *et al.*, 2000; revisado por FRANCHINI *et al.*, 2000).

## **5. Doenças associadas ao HTLV-1**

A porta de entrada da infecção juntamente com fatores do hospedeiro, do vírus e do ambiente determinam as células alvo e o tipo de resposta imune desenvolvida e, portanto se os indivíduos infectados irão permanecer assintomáticos durante anos ou desenvolver alguma doença (revisado por GRANT *et al.*, 2002).

As doenças mais comumente associadas com o HTLV-1 são a Leucemia/Linfoma de Células T do Adulto (ATL) e a Paraparesia Espástica Tropical / Mielopatia Associada ao HTLV-1 (TSP/HAM). No Japão, estima-se que, nos indivíduos infectados pelo HTLV-1, o risco de desenvolvimento de ATL seja de 1/10.000 e o risco de HAM/TSP de 1/1.500 a 1/2.000 (TAKAYANAGUI, 2000).

Ainda no Japão, a presença de anticorpos contra o HTLV-1 foi associada com o quadro clínico de uveíte intermediária idiopática. Este estudo sugeriu que as citocinas produzidas pelas células infectadas com o HTLV-1 são responsáveis pela inflamação intraocular nos pacientes com uveíte por HTLV-1 (SAGAWA *et al.*, 1995) Existem também relatos de alveolite por células T que acomete pacientes com TSP/HAM e dados sobre a infecção de células epiteliais das glândulas sudoríparas que sugerem uma associação entre ATL e a Síndrome de Sjögren associada ao HTLV-1 (SETOYAMA *et al.*, 1998).

Estudos em pacientes da Bahia demonstraram que 7,3% dos linfomas/leucemias linfocíticas não Hodgking e 33,3% dos linfomas de células T estão associados ao HTLV-1. Outro estudo revelou que 20% dos linfomas de células T diagnosticadas no Rio de Janeiro foram positivos para o HTLV-1 (BITTENCOURT, 1998).

A infecção pelo HTLV-1 tem sido considerada a causa indireta ou um fator que contribui para o desenvolvimento de várias outras doenças como por ex., infecções

pulmonares oportunistas, cânceres, doenças crônicas pulmonares, gamopatia monoclonal, comprometimento renal crônico, estrogiloidíase, dermatomicoses, linfadenites associada as HTLV-1, artropatia crônica, poliomiosite, foliculite decalvans, e dermatite infecciosa. A associação da infecção pelo HTLV-1 com estas doenças se deve, em parte, à imunodeficiência induzida por este vírus (BITTENCOURT, 1998).

De grande interesse também é o fato de que, algumas pessoas que apresentam alto risco para desenvolverem infecção pelo HTLV-1, têm sido dupla ou triplamente infectadas com HTLV-1, HTLV-2 e HIV-1. Este fenômeno é conhecido como interferência de receptores entre retrovírus relacionados (EHRlich *et al.*, 1989).

Tem sido relatado o envolvimento do HTLV-1 com a esclerose múltipla, uma doença similar em natureza à HAM/TSP (KAPROWSKI *et al.*, 1995).

### **5.1. Leucemia/ Linfoma de Células T do Adulto (ATL)**

ATL, uma agressiva doença linfoproliferativa, foi descrita pela primeira vez por UCHYIAMA *et al.* (1977). Evidências para a associação etiológica entre o HTLV-1 e ATL vieram da demonstração da presença de anticorpos anti-HTLV-1 em pacientes com ATL e da integração monoclonal de DNA proviral nas células leucêmicas. Desta forma foi confirmado que ATL surgiu da transformação maligna de uma célula previamente infectada pelo HTLV-1 (HINUMA *et al.*, 1981; YOSHIDA *et al.*, 1982). Assim, na oncogênese da ATL, o grau de infecção pelo HTLV-1 (carga proviral) e a clonalidade das células infectadas podem estar intimamente relacionados com a progressão da doença e a resposta imunológica do hospedeiro. Em portadores, o HTLV-1 se integra de forma policlonal, ou seja, diferentes clones de células são infectados e em pacientes com ATL, apresentando variadas formas da doença, tais como: pré-ATL, “smoldering”, crônica, aguda e a de linfoma, ocorre integração monoclonal do HTLV-1 em suas células tumorais, e uma cópia, raramente duas, do provírus por célula. (TAKATSUKI *et al.*, 1985; revisado por JOHNSON *et al.*, 2001).

O risco estimado de um portador do HTLV-1 desenvolver ATL é de 5%. ATL freqüentemente se apresenta como quadro leucêmico e menos comumente como linfoma. Quimioterapia convencional não cura pacientes com linfomas associados ao HTLV-1, e recaídas são rápidas e freqüentes. A maioria dos casos de ATL resulta da transmissão vertical por aleitamento materno, apesar desta doença não ter sido muito relatada em crianças (BITTENCOURT, 1998). A forma leucêmica, que representa 65% dos casos de ATL, pode

evoluir de forma aguda, crônica ou “smoldering”. A faixa etária de maior frequência da enfermidade é a quarta década, ocorrendo em menor proporção em indivíduos mais jovens, principalmente em nosso meio. Ambos os sexos são igualmente afetados (POMBO DE OLIVEIRA *et al.*, 2000; revisado por JOHNSON *et al.*, 2001).

As manifestações clínicas mais frequentes da ATL são: linfadenopatia, hipercalcemia, lesão de pele, hepatomegalia e esplenomegalia. Linfadenopatia é o achado mais comum. A hipercalcemia é característica da ATL e rara em outros tipos de linfoma. A hipercalcemia pode estar presente na apresentação da doença ou surgir no decorrer da mesma. Ocorre comumente em pacientes com leucocitose e raramente está associada a lesões osteolíticas. As lesões de pele são encontradas e associadas mais comumente com a forma “smoldering” e crônica da ATL. Comprometimento do sistema nervoso central pode ocorrer, embora pouco frequente. Lesões pulmonares foram descritas de modo frequente nos pacientes japoneses, ocorrendo em todos os subtipos clínicos, incluindo ATL crônica e “smoldering” (POMBO DE OLIVEIRA *et al.*, 2000; revisado por JOHNSON *et al.*, 2001).

A forma leucêmica aguda é a mais frequente, com início súbito, evolução aguda, organomegalias e prognóstico sombrio. A média de sobrevida após o diagnóstico da forma aguda é de 11 meses. A leucocitose pode ocorrer com a presença de células linfóides muito atípicas, e é um dado fortemente sugestivo, assim como a hipercalcemia. Já a forma crônica é caracterizada por persistente linfocitose devido a células T, com pouco ou nenhum envolvimento de órgãos e infiltrado pulmonar intersticial. Podem ser observadas lesões de pele. Ocorre leucocitose moderada a estável com cerca de 5% de linfócitos atípicos (“flower cells”); não há hipercalcemia e a dehidrogenase láctica (LDH) pode estar levemente elevada. A forma crônica ocorre em 10% dos casos de ATL, e pode evoluir para aguda em meses ou anos (POMBO DE OLIVEIRA *et al.*, 2000; revisado por JOHNSON *et al.*, 2001).

Na ATL do tipo pré-ATL e “smoldering”, os pacientes são em geral assintomáticos e a contagem de leucócitos é normal, com menos de 3% de “flower cells”. Clinicamente ela é caracterizada por lesões de pele que respondem a esteróides tópicos e que são similares às encontradas em outros portadores do HTLV-1. Linfadenopatia pode estar presente e os níveis de cálcio estão normais. Aproximadamente a metade dos indivíduos pré-leucêmicos regride espontaneamente, enquanto alguns progridem para as formas “smoldering” e crônica (POMBO DE OLIVEIRA *et al.*, 2000; revisado por JOHNSON *et al.*, 2001).

A forma linfomatosa é indistinguível dos outros tipos de linfoma não-Hodgkin nos aspectos clínico e histopatológico, representando 25% dos casos de ATL. O aspecto da lesão é

tumoral; podem ocorrer lesões de pele; o nível de cálcio pode estar normal ou elevado e observa-se menos de 2% de “flower cells” no sangue periférico (POMBO DE OLIVEIRA *et al.*, 2000).

Por causa da superposição clinicopatológica com outras doenças de células T maduras, o diagnóstico de ATL deverá ser baseado sempre em um conjunto de parâmetros considerados característicos: hipercalcemia, células pleomórficas no sangue com núcleos convolutos ou “flower cells” e usualmente um fenótipo de células T maduras (CD2+, CD3+, CD4+, CD8-, CD25+, HLA-DR+) e o agrupamento desta doença em regiões endêmicas para HTLV-1. Demonstração de anticorpos para o HTLV-1 no soro dos pacientes é um teste confirmatório essencial, assim como a análise de DNA demonstrando a integração clonal do DNA proviral nas células (revisado por JOHNSON *et al.*, 2001).

No Brasil, a distribuição dos subtipos clínicos varia de região para região. Dentre todos os 195 casos estudados desde 1990, há predominância do subtipo agudo, seguido pelo subtipo linfoma. As formas “smoldering” e crônica são menos reconhecidas, pois dependem de testes moleculares pouco disponíveis em várias regiões do país (POMBO DE OLIVEIRA *et al.*, 2000).

### **5.1.1. Patogênese da ATL**

O processo de transformação e de oncogênese pelo HTLV, são processos distintos porém relacionados. O HTLV-1 não possui um oncogene e a integração monoclonal é feita de forma randômica, diferentemente de outros retrovírus, que têm um sítio específico de integração onde seu oncogene atua. Acredita-se que o mecanismo de transativação por **tax** seja o responsável por iniciar este processo. A infecção inicial pelo HTLV resulta na transformação de vários clones de células e um posterior processo de seleção (tanto do indivíduo quanto do vírus) desenvolve somente um clone de células, que por sua vez evoluem para células malignas. Portanto o mecanismo pelo qual o HTLV-1 causa ATL ainda permanece parcialmente desconhecido e deve ser um processo multifatorial (do vírus, do hospedeiro e do ambiente) que envolve várias etapas (POMBO DE OLIVEIRA *et al.*, 2000; revisado por JOHNSON, 2001).

A infiltração de células leucêmicas em vários órgãos tais como linfonodos, fígado, baço, pulmões, trato intestinal e pele é uma manifestação comum na ATL. As metaloproteinases, responsáveis pela degradação da matriz extracelular e da membrana basal,



facilitam a metástase e disseminação dessas células, juntamente com certas quimiocinas, seus receptores e moléculas de adesão (MORI, *et al.*, 2002).

Aberrações cromossômicas ou pontos de fragilidade genética existem, comumente, em células de ATL e o grau destas aberrações está relacionado com a gravidade da doença pela possibilidade de evolução clonal destas células durante sua progressão. Elas são freqüentemente encontradas na forma aguda e são menos vistas nas formas crônicas e “smoldering”. Isto deve ser levado em conta, no caso do prolongado período de latência (de 20 a 30 anos no caso de ATL), decorrido entre a infecção e o início da doença (MORI, *et al.*, 2002).

Existem evidências de comprometimento da resposta celular em pacientes com ATL e em assintomáticos, o que favorece as complicações de infecções por parasitas como o *Strongiloides stercoralis* (POMBO DE OLIVEIRA *et al.*, 2000).

## **5.2. Mielopatia associada ao HTLV-1/Paraparesia espástica tropical (TPS/HAM)**

Em 1985, GESSAIN *et al.*, encontraram anticorpos IgG contra o HTLV-1 no soro de 68% dos pacientes com Paraparesia Espástica Tropical (TSP) na Martinica e sugeriram HTLV-1 como seu possível agente etiológico. Logo em seguida, RODGERS-JOHNSON *et al.* (1985), confirmaram estes achados em pacientes da Jamaica e da Colômbia. Em 1986, OSAME *et al.*, relataram uma doença semelhante no sul do Japão, denominando-a Mielopatia Associada ao HTLV-1 (HAM), considerando inadequada a expressão “tropical” para um país de zona temperada. Posteriormente, RÓMAN & OSAME (1988) concluíram tratar-se da mesma doença, que passou a ser conhecida como TSP/HAM, uma doença inflamatória neurodegenerativa, que pode levar à desmielinização da medula na região torácica e que não apresenta malignidade (TAKAYANAGUI, 2000).

No Brasil, CASTRO-COSTA *et al.* (1989), relataram 10 casos suspeitos de TSP/HAM em Fortaleza, sem terem feito a pesquisa de anticorpos anti-HTLV-1. No mesmo ano, MARTINS-CASTRO *et al.* (1989), detectaram anticorpos anti-HTLV-1 em 37,5% de 16 pacientes atendidos em São Paulo com mielopatias crônicas de origem obscura. Desde então, TSP/HAM tem sido relatado em várias localidades como Ribeirão Preto, São Paulo, Rio de Janeiro, Salvador, Recife, Fortaleza, Vitória, Porto Alegre e Belo Horizonte. A TPS/HAM acomete indivíduos na faixa etária entre 35 e 49 anos, raramente antes dos 20 ou após os 70 anos. Há preponderância do sexo feminino sobre o masculino, na proporção de 2,5: 1 a 3:1 e é

observada com frequência em negros, mulatos e amarelos, embora seja pouco frequente em brancos (TAKAYANAGUI, 2000; RIBAS & NETTO DE MELO, 2002).

O quadro clínico é de início insidioso e de caráter lentamente progressivo, com diminuição gradual da força muscular dos membros inferiores, associado a dores lombares e queixas sensitivas leves do tipo parestesia nas pernas e nos pés. Na evolução surgem queixas do tipo urgência miccional, incontinência ou retenção urinária, constipação intestinal, diminuição da libido e da potência sexual. Apesar de a evolução ser lenta e progressiva, a evolução do comprometimento neurológico não é uniforme ao longo do tempo, ocorrendo predominantemente durante o primeiro ano de doença, tornando-se relativamente estável nos anos subsequentes. Dez anos após a instalação da doença, cerca de 30% dos pacientes estão paraplégicos e confinados ao leito. Pacientes soropositivos para o HTLV, aparentemente assintomáticos, podem apresentar exame neurológico alterado, sugerindo que a TPS/HAM pode se apresentar de forma precoce e mais frequente do que o esperado no curso da infecção (RIBAS & NETTO DE MELO, 2002).

A principal via de transmissão na TSP/HAM é a transfusão sanguínea. Menos de 1% dos indivíduos infectados desenvolvem TSP/HAM. Alguns destes pacientes podem apresentar associação com várias doenças autoimunes como: uveítes, dermatites infecciosas, vasculite necrotizante, alveolite linfocitária, poliartropatias, e outras (TAKAYANAGUI, 2000).

O diagnóstico laboratorial é feito pela detecção de anticorpos anti-HTLV-1 ou de antígenos do HTLV-1 no sangue e no líquido. O líquido pode apresentar um número aumentado de linfócitos pleomórficos e alguns lobulados. O isolamento viral pode ser feito a partir do sangue e/ou do líquido (TAKAYANAGUI, 2000; RIBAS & NETTO DE MELO, 2002).

### **5.2.1. Patogênese da TSP/HAM**

Vários fatores estão implicados na patogênese da TSP/HAM, coexistindo uma teoria citotóxica e outra inflamatória e imunológica ou o que é mais provável uma variante destas duas. Anticorpos intratecais foram encontrados indicando que os vírus infectam o sistema nervoso central, e ao exame histológico um infiltrado inflamatório peri-vascular de linfócitos T na medula espinhal e estruturas cerebrais superiores foi encontrado. A presença aumentada de provírus nos linfócitos do sangue e do líquido foi confirmada por PCR e a integração do vírus é policlonal (TAKAYANAGUI, O. M., 2000; RIBAS & NETTO DE MELO, 2002).

Em um estudo realizado por YAMANO *et al.* (2002), foi demonstrado o aumento de mRNA de *tax* e da razão entre mRNA de *Tax* e a carga de DNA proviral no sangue de pacientes com TSP/HAM, o que suporta a idéia de que a expressão aumentada do HTLV-1 é parte importante no desenvolvimento da patogênese da TSP/HAM.

A TSP/HAM não é consequência do desenvolvimento excessivo de um clone maligno de células, mas, como alguns autores concluíram, a replicação ativa do vírus é um fator importante na patogênese, o que não ocorre com o estado quase de repouso do vírus na ATL. Nenhuma variante de isolados virais de pacientes com TSP/HAM está envolvida. Altos níveis de linfócitos T-citotóxicos, CD8+, são encontrados. Mais do que na ATL, ocorrem altos níveis de anticorpos circulantes anti-HTLV-1, principalmente IgG e IgA, e a presença de IgM. A ativação imune de células T em TSP/HAM pode representar uma fase autócrina viral dirigida pela transativação e expressão coordenada de IL-2 e dos genes virais *tax/rex*. A regulação alterada de genes celulares por **tax** inicia o processo de ativação e proliferação de células T e subsequentes eventos mediados por citocinas: IL-2, IL-6, IL-10, INF- $\gamma$  (interferom  $\gamma$ ), TNF- $\alpha$  ( fator de necrose tumoral  $\alpha$ ); quimiocinas e seus receptores, e moléculas de adesão: LFA-1, VLA-4 (antígeno tardio), ICAM-1, VCAM-1 (molécula de adesão vascular 1), que culminam com lesões inflamatórias no sistema nervoso. Um aumento da carga viral deve exacerbar estes sintomas por ruptura na imunoregulação levando à autoimunidade. Além do papel das moléculas de adesão, as metaloproteinases e seus inibidores (TIMPs) também contribuem com a patogenia de patologias associadas com a degradação tecidual. Citocinas secretadas por células mononucleares infectadas e células gliais infectadas aumentam a produção de MMP-3, MMP-9 (gelatinase B) e TIMP-3 o que promove a degradação da barreira hematoencefálica, a quebra de constituintes da mielina e a conversão da forma inativa do TNF para a sua forma ativa (revisado por CASSEB & PENALVA-DE-OLIVEIRA , 2000; revisado por GRANT *et al.*, 2002).

Existe uma associação entre TSP/HAM e certos haplotipos de HLA, o que não foi observado em ATL. A ocorrência de desmielinização primária e posterior mielinização por oligodendrócitos em lesões de medula de pacientes com TSP/HAM e os fatos citados acima são baseados na hipótese da teoria autoimune (revisado por CASSEB & PENALVA-DE-OLIVEIRA, 2000; revisado por GRANT *et al.*, 2002).

### **5.3. Manifestações oculares**

Vários estudos clínicos, soropidemiológicos e virológicos têm apontado uma uveíte endógena como a terceira entidade clínica associada ao HTLV-1. Esta uveíte pode estar associada a portadores de doença neurológica, ou apresentar-se isolada em portadores do HTLV-1 sem comprometimento sistêmico. Lesões atróficas retinocoroidianas, alterações vasculares da retina, exsudatos cotonosos, doença de Behçet, ceratoconjuntivite sicca e uveíte anterior são relatados em pacientes com TPS/HAM (PINHEIRO, 2000).

As complicações oculares no paciente infectado pelo HTLV-1 foram descritas em 1988, no Japão, quando foi relatado o caso de um paciente com retinite necrosante por citomegalovírus, que estava imunodeprimido devido a ATL. A prevalência das manifestações oculares associadas ao HTLV-1 está relacionada à soroprevalência do HTLV-1 na região. Em áreas endêmicas no Japão, como na região sudoeste, a soroprevalência varia de 35,4% a 44,8% (PINHEIRO, 2000).

No Brasil, a frequência das manifestações oculares associadas ao HTLV-1 ainda é pouco conhecida. Em um estudo com 351 doadores de sangue em Minas Gerais, foram encontrados apenas 2 pacientes com uveíte intermediária entre os portadores do HTLV-1 (PINHEIRO, 2000).

Os sinais e sintomas das uveítes variam de acordo com as formas anátomo-clínicas existentes. As queixas mais frequentes são: dor ocular, fotofobia, embasamento visual e hiperemia ocular. As moscas volantes são a principal queixa das uveítes associadas ao HTLV-1, ocorrendo também visão borrada ou embaçada, de início agudo ou subagudo. Os olhos são geralmente brancos e sem dor. O curso clínico das uveítes pode ser lentamente progressivo e persistir por longos períodos a menos que tratadas (PINHEIRO, 2000).

### **5.4. Manifestações dermatológicas associadas ao HTLV-1**

As manifestações dermatológicas podem ocorrer relacionadas a doenças associadas ao HTLV-1, como ATL, TSP/HAM e dermatite infecciosa (ID). Ocorrem também como formas associadas à imunossupressão, como escabiose crostosa, herpes zoster ou uma infecção cutânea extensiva por dermatófitos e como doenças não específicas, tais como a dermatite seborréica, o eritroderma e a dermatite exfoliativa generalizada (LA GRENADE, 2000).

Uma das manifestações freqüentes na ATL é a infiltração de células leucêmicas em vários órgãos tais como: linfonodos, fígado, baço, pulmão, pele e trato intestinal. O padrão e o grau de infiltração variam de caso a caso e constitui um sério problema clínico, pois afeta o prognóstico da doença. Infiltrações linfomatosas de pele são um sinal definitivo de ATL, estando presente em 40 a 50% dos pacientes como finas pápulas e nódulos generalizados. Estas lesões devem ser distinguidas das manifestações cutâneas da Hanseníase lepromatosa em áreas endêmicas (LA GRENADE, 2000).

As anormalidades cutâneas observadas na TPS/HAM são a xerodermia e a ictiose adquirida. Outras manifestações cutâneas relacionadas ao comprometimento neurológico foram observadas, como, por exemplo, candidíase perineal em pacientes com incontinência de urina/fezes e calosidades na sola dos pés em pacientes com dificuldade para deambular.

No Brasil, CARNAÚBA *et al.* (1996), avaliaram a freqüência de manifestações dermatológicas em pacientes com TPS/HAM e observaram que 54.4% deles apresentavam alterações dermatológicas que coincidiam com o início do aparecimento das manifestações neurológicas. Sugeriram que as enfermidades dermatológicas poderiam ser indicadores presuntivos do comprometimento imunológico. Mesmo pacientes infectados pelo HTLV assintomáticos podem apresentar manifestações cutâneas como psoríase, eczema seborreico e “rash” ictiosiforme (LA GRENADE, 1998 e 2000).

Ainda no Brasil, no estado da Bahia, BARBOSA *et al.*, 1999, estudando 28 casos de ATL, constataram que 20% desses casos ocorreram em adultos jovens com menos de 30 anos (um caso com 13 anos,) sendo 47 anos a idade média de acometimento e que 5 indivíduos apresentaram lesões cutâneas de longa duração na época do diagnóstico. No Rio de Janeiro, um adolescente de 15 anos de idade com infecção pelo HTLV-1, desenvolveu linfoma cutâneo de células T e leucemia ao mesmo tempo (VALLE *et al.*, 2001).

Em um estudo realizado com 110 crianças de baixo nível sócio-econômico de uma unidade de saúde pública governamental em Minas Gerais, Brasil, entre várias manifestações dermatológicas foi encontrado somente um caso de dermatite infecciosa (ID) e que era o único com sorologia positiva para o HTLV-1 e 2. (CARNEIRO-PROIETTI *et al.*, 1999).

GONÇALVES *et al.* (2000), em Belo Horizonte, Minas Gerais, descreveram o caso de uma mulher de 28 anos de idade, soropositiva e com “nested” PCR positiva para o HTLV-1 na biópsia de pele, com ID desde a infância e agora associada a ATL. A imunohistoquímica desta mesma biópsia revelou linfócitos atípicos, com fenótipo T e 25% de antígeno Ki-67 (células em ciclo mitótico). Estes autores sugeriram então que a ID não seria somente um

precursor da ATL, mas uma doença maligna, um linfoma cutâneo indolente com uma fase leucêmica tardia.

A associação entre a dermatite infecciosa (ID) e a infecção pelo HTLV-1 foi demonstrada por LA GRENADE (1990). A dermatite infecciosa foi descrita como um quadro de dermatite que estaria associada à infecção refratária por *Streptococcus sp* (beta hemolítico) e *Staphylococcus aureus*. As características clínicas e bacteriológicas da enfermidade foram documentadas em 25 crianças jamaicanas. Os locais mais acometidos foram couro cabeludo, pescoço, ouvido externo, áreas retroauriculares, axilas e região anterior do nariz na forma de crostas ou secreção nasal associada a um “rash” papular.

Posteriormente relatos de ID ocorreram no Japão, Colômbia, Trinidad & Tobago e entre crianças imigrantes haitianas que viviam em Miami. Em 1998 a ID foi definida como uma doença pré-ATL. Considerando a faixa etária acometida, supõe-se que esta manifestação resulte de infecção congênita ou perinatal pelo HTLV-1 e 2, levando à imunossupressão precoce, com possível desenvolvimento de ATL no futuro (LA GRENADE, 1998 e 2000).

## 6. Diagnóstico laboratorial do HTLV-1 e 2

### 6.1. Testes sorológicos

Os testes sorológicos baseiam-se na demonstração de anticorpos contra antígenos virais no soro do indivíduo. São antígenos do HTLV-1, as proteínas ou glicoproteínas de **gag**: p53 (precursor), p24/26 (core ou capsídeo), p19 (matriz), p15 (nucleocapsídeo), p26, p28, p32 (intermediários do gag); de **env**: gp61/68 (precursor de env), gp46 (externa), p21 (transmembrana) e de **tax**: p40 ou p38 (proteína transativadora) (CANN & CHEN, 1996).

As proteínas do envelope viral, principalmente gp46 e p21, participam de forma importante no desencadeamento da resposta imune. A gp46 contém alguns epitopos imunodominantes e outros neutralizantes (OHARA *et al.*, 1995).

Os produtos de **pol** são antigênicamente pouco importantes, mas o gene *tax* dá origem a produtos que parecem ter importante papel como antígenos de valor prognóstico (revisado por GRANT *et al.*, 2002).

Anticorpos contra antígenos do HTLV geralmente não apresentam reação cruzada com antígenos do HIV, exceto com os do capsídeo, especialmente p24. As proteínas virais p19, p24 e p15 são muito utilizadas como antígenos nos diferentes reativos comerciais, além

das proteínas recombinantes derivadas dos genes *env* (rp21 e gp46) e *gag* (p24) (CANN & CHEN, 1996; FERREIRA & MARTINS, 2000).

As reações de diagnóstico sorológico da infecção pelo HTLV-1 e 2 se dividem em reações de triagem sorológica e em reações complementares. As reações de triagem não diferenciam o HTLV-1 do HTLV-2 devido à presença de reação cruzada, sendo, portanto referidos como testes para HTLV-1 e 2. As seqüências dos genomas do HTLV-1 e HTLV-2 têm similaridade de aproximadamente 65%, resultando, como esperado, em produtos protéicos relacionados. No entanto os vírus contêm alguns antígenos diferentes que permitem distinguí-los, como proteínas recombinantes do envelope e da região transmembrana (rgp21 ou p21 env r) (FERREIRA & MARTINS, 2000).

Em geral as reações de triagem são mais sensíveis e as complementares, mais específicas. As reações de triagem mais conhecidas são a aglutinação de partículas em látex ou gelatina e o Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). As reações de aglutinação baseiam-se no princípio de que as partículas sensibilizadas com o vírus inativado se aglutinam na presença de anticorpos anti-HTLV que se encontram no soro ou no plasma do indivíduo. Devido às limitações da técnica, reações cruzadas e ao baixo título de anticorpos em algumas amostras, podem ocorrer resultados falso-positivos e falso-negativos. É uma técnica sensível, rápida, prática e econômica, e amplamente utilizada em estudos epidemiológicos em grupos populacionais (FERREIRA & MARTINS, 2000).

O ELISA (LAIRMORE & QUINN, 1991), é o teste de triagem mais utilizado. Apresenta sensibilidade de 97,3% a 100% e especificidade de 99,8% a 99,9%. A limitação da técnica ELISA está principalmente situada na fase inicial de soroconversão, em que pode ocorrer um baixo nível de anticorpos. Os “kits” de ELISA recentes têm uma grande capacidade discriminatória, pois são constituídos de lisados virais completos, proteínas recombinantes, ou peptídeos sintéticos derivados de regiões não homólogas de HTLV-1 e HTLV-2. Um epitopo antigênico determinante dentro da região central da glicoproteína externa do envelope, a gp46, possui seqüências diferentes de aminoácidos que permite a discriminação sorológica entre HTLV-1 e HTLV-2. Variações genéticas nas regiões próximas a esse epitopo podem dificultar o acesso dos anticorpos, isto é, alterar a afinidade de ligação dos anticorpos monoclonais com as proteínas do envelope *in vitro*, dificultando esta identificação. Com base em dados epidemiológicos, o comitê de consenso em saúde pública dos EUA (PHSCC), estabeleceu como critério positivo para HTLV-1, um ELISA reativo, em duplicata e a subsequente confirmação com testes sorológicos mais específicos, que seriam

capazes de identificar os genes gag e env do genoma do HTLV-1 (FERREIRA & MARTINS, 2000).

As reações sorológicas complementares utilizadas são a imunofluorescência indireta (IFI), radioimunoprecipitação em gel de poliacrilamida (RIPA/PAGE) e o Western blot (WB) que é o teste complementar mais usado (revisado por FRANCHINI *et al.*, 2000).

A técnica de imunofluorescência (COONS e KAPLAN, 1950) emprega uma lâmina de microscópio contendo células infectadas com os vírus HTLV-1 ou HTLV-2. No soro dos indivíduos se encontram os anticorpos que irão se ligar aos antígenos na lâmina. Um segundo anticorpo anti-IgG humana marcado com um fluorocromo é então adicionado. A positividade da reação é detectada pela fluorescência sob luz UV. É um método que possui alta sensibilidade e especificidade, baixo custo, é simples e rápido. A reação deve ser padronizada, tendo um bom microscópio de fluorescência e profissionais bem treinados, para distinguir a positividade, de interferências que podem ocorrer na mesma. Os controles devem incluir lâminas com células não infectadas e soros reativos e não reativos (FERREIRA & MARTINS, 2000).

O teste de Western Blot (WB) é um ensaio qualitativo, realizado com uma proteína recombinante do envelope do vírus HTLV-1 (rgp46) e/ou um epitopo comum ao HTLV-1 e ao HTLV-2; uma proteína recombinante da região transmembrana (rgp21 ou p21env r), além dos demais antígenos virais. A interpretação das bandas de reatividade deve seguir critérios pré-estabelecidos. O critério de positividade requer reatividade para p19 ou p24 e também para o antígeno do envelope viral (gp46 ou gp68). Um resultado indeterminado pode, por exemplo, apresentar reatividade somente para p19 ou p24 (FERREIRA & MARTINS, 2000; revisado por FRANCHINI *et al.*, 2000).

Alguns autores sugerem a possibilidade de distinção entre o HTLV-1 e HTLV-2 na reação de WB. Alguns “kits” de WB têm sugerido que a reatividade para p19 é maior do que para p24 na infecção pelo HTLV-1, enquanto que a reatividade para p24 é maior do que para p19 na infecção pelo HTLV-2. Entretanto, os resultados obtidos devem ser interpretados com cautela, pois esta distinção nem sempre se comprova em casos conhecidos. Reações inespecíficas em indivíduos não infectados podem ocorrer particularmente com reatividade para p19 e rgp21. A reatividade para rgp46 é muito específica para HTLV-1 nos indivíduos com perfil de soroconversão. O critério adotado pelo FDA (Food and Drug Administration, EUA) para a positividade requer a presença de bandas de dois ou três genes (*gag*, *env* e *tax*), sendo classificadas como indeterminadas outras combinações de reatividade. A ausência de



bandas constitui-se em resultado negativo. A OMS (Organização Mundial de Saúde) adotou critério que inclui a reatividade para uma proteína da região do *gag* (capsídeo ou matriz) e uma proteína antigênica do envelope viral (precursora ou processada). Amostras indeterminadas pelo WB devem ser testadas por outro teste, como IFA ou RIPA. Algumas pesquisas sugerem que grande número dos indivíduos classificados como indeterminados podem realmente estar infectados. Além disso, indivíduos que tiveram resultados positivos para HTLV-1 pela técnica de PCR apresentavam perfis no WB que não incluíam as bandas p24 ou rgp21, sugerindo que reações falso-negativas podem ocorrer no WB (FERREIRA & MARTINS, 2000).

Semelhante à técnica de WB temos a metodologia de RIPA, uma reação complementar muito confiável. Esta técnica permite identificar anticorpos contra proteínas de alto peso molecular, especialmente glicoproteínas frágeis, que nem sempre são encontradas no WB. Apesar de ser uma técnica de alta sensibilidade e especificidade, é muito trabalhosa e há reação cruzada entre HTLV-1 e HTLV-2. Na reação de RIPA incuba-se o vírus purificado e desintegrado, que tenha crescido em meio de cultura contendo aminoácido radioativo, com a amostra de soro a ser testada. Caso estejam presentes os anticorpos contra as proteínas virais, são formados complexos que são em seguida precipitados e fracionados por eletroforese em gel de SDS-PAGE e então submetidos à autoradiografia (FERREIRA & MARTINS, 2000).

## **6.2. PCR (Reação em cadeia da polimerase)**

É o teste complementar mais específico, e também bastante sensível. A PCR é capaz de detectar um único fragmento de DNA e amplificar esta seqüência várias vezes, até ela poder ser facilmente identificada. A PCR é o único teste que permite uma distinção mais apurada entre o HTLV-1 e o HTLV-2. A identificação das infecções por HTLV através da PCR baseia-se na escolha dos iniciadores de uma região altamente conservada e espécie-específica. A “nested” PCR consiste de duas reações consecutivas com a utilização de iniciadores internos à região inicialmente amplificada. Esta técnica, por ser muito sensível, requer muitos cuidados no que diz respeito à contaminação das amostras em teste com os DNAs amplificados de outras amostras, evitando os resultados falso-positivos. (FERREIRA & MARTINS, 2000).

A expressão dos genes do HTLV-1 é medida através da detecção de mRNAs pelo método da RT-PCR. Após uma extração de RNA das células ou tecidos é feita uma

transcrição reversa com a finalidade de se obter o cDNA, que é então amplificado pela PCR (SAGAWA *et al.*, 1995; COSCOY *et al.*, 1997).

## 7. Métodos de estudo do HTLV-1 na pele

A pele representa o maior órgão, em peso, do corpo humano e possui um importante papel na montagem da resposta imunológica do indivíduo aos agentes externos e internos de agressão. Todas as células presentes, tanto na derme como na epiderme, participam da iniciação, desenvolvimento, sustentação e/ou resolução desta resposta imune local através da mediação de citocinas e quimiocinas liberadas pelas células ativadas constitutivamente ou que foram ativadas por agentes externos e/ou por outras células. A maioria das células T residentes transitórias da pele expressam o fenótipo CD45RO+, ou seja, são células T de memória imediata que já foram primadas por um antígeno. Estas células apresentam receptores aos antígenos evolucionários conservados, comuns aos microorganismos da flora comensal da pele, que podem ser apresentados pelas células de Langerhans. Como a nossa pele é um alvo em potencial de microagressões, estas células T podem ser ativadas e ativar outras células através de uma estimulação parácrina (revisado por SPELLBERG, B., 2000). Assim a pele apresenta um microambiente propício à replicação do HTLV-1, uma vez que esta multiplicação se torna mais produtiva em células que se encontram ativadas (revisado por GRANT *et al.* 2002).

Através da Microscopia Eletrônica de Transmissão podemos visualizar as partículas virais do HTLV e em quais tipos celulares ou compartimentos da pele ele estaria se multiplicando. Por ser uma técnica muito trabalhosa e que requer uma grande experiência do analisador, geralmente não são observadas partículas virais em células do sangue circulante ou menos freqüentemente ainda, em tecidos frescos, como, por exemplo, em biópsias de pele, principalmente em pacientes com ATL. Assim em várias circunstâncias, a identificação das partículas de HTLV-1, deve ser realizada através da imunohistoquímica, e/ou da imunomicroscopia eletrônica (IME), e de análises biomoleculares mais sofisticadas como a PCR seguida de Southern Blot, para detectar DNA proviral e da Hibridização *in situ*, que permite que estes genes sejam localizados antes mesmo de estarem sendo expressos (HADDAD *et al.*, 1998; PANCAKE *et al.*, 1995).

## 7.1. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

POEISZ *et al.* (1980), descreveram a partícula viral ao microscópio eletrônico, pela primeira vez, e logo em seguida, HINUMA *et al.* (1981), descreveram um retrovírus, isolado de uma linhagem de células de paciente com ATL. As partículas virais foram vistas em linfócitos cultivados e a maioria delas estava localizada fora do citoplasma. Foi realizado um exame ultraestrutural de células de infiltrado linfomatoso em biópsias de diferentes tecidos de casos típicos de ATL mas não foi encontrada nenhuma partícula viral (SHAMOTO *et al.*, 1981).

Posteriormente, em células linfomatosas de biópsia de uma paciente com ATL/Linfoma analisadas em nível ultraestrutural, foi detectada a presença de estruturas arredondadas, de 50 a 90 nm de diâmetro, semelhantes às partículas virais, com um nucleóide central e espículas em volta do envelope, dentro de vacúolos citoplasmáticos. Não foram observadas partículas extracelulares (CLAUDE VITAL *et al.*, 1993).

MET também é utilizada quando os testes sorológicos convencionais não detectam os anticorpos contra um provável variante do vírus, ou quando os níveis dos anticorpos estão muito baixos, como na maioria dos casos de Micosse Fungóide. Em alguns isolados virais de cultura de células mononucleares do sangue periférico de pacientes com Micosse Fungóide foi constatada a presença de partículas virais sem o nucleóide, vazias (PANCAKE *et al.*, 1995).

O uso da microscopia eletrônica de transmissão (MET) convencional após o co-cultivo de células supostamente infectadas pelo HTLV-1 com linfócitos do sangue periférico, tem como objetivo verificar se estes vírus isolados são competentes na sua replicação, isto é, se não são provírus defectivos. Isto é confirmado através da presença de partículas virais maduras íntegras (RENU *et al.*, 1994).

A inclusão de vermelho de rutênio na fixação química para MET promove a preservação de detalhes ultraestruturais das espículas dos vírus de três diferentes retrovírus do tipo C, incluindo o HTLV-I (FASSEL, *et al.*, 1998).

A imunomicroscopia eletrônica (IME), usando o soro do próprio paciente ou anticorpos monoclonais contra as proteínas do envelope, gp46 e gp63, mostrou reação com as próprias partículas virais e também com áreas da membrana citoplasmática, retículo endoplasmático e membrana nuclear das células infectadas. O método de IME pode ser útil no estudo da interação entre as células e o HTLV e pode ajudar a elucidar sua patogênese. No caso de infecções por mais de um agente viral, por exemplo, HTLV-1 e 2, não é possível

distinguir pela morfologia das partículas, devendo-se utilizar a IME, onde são usados anticorpos monoclonais específicos contra antígenos do envelope de HTLV-1 e HTLV-2 (ZUCKER-FRANKLIN *et al.*, 1992; KUBOTA *et al.*, 1995; OHARA *et al.*, 1995).

Existem muito poucos estudos publicados sobre a ultra-estrutura dos vírus do gênero “BLV-HTLV”. Em 1995, TAFFAREL *et al.*, realizaram um estudo sobre os aspectos ultraestruturais das partículas do HTLV-1, após co-cultura de linfócitos de um paciente brasileiro com ATL. Foram empregadas as técnicas MET, IME e imunofluorescência indireta (IFI) utilizando um soro humano anti-HTLV-1 e 2 purificado, como anticorpo primário policlonal contra antígenos do HTLV-1 em culturas de células de animais.

## **7.2. Imunohistoquímica**

O princípio básico da imunohistoquímica é detectar a presença de um antígeno, utilizando anticorpos marcados contra este antígeno ou sítios antigênicos, e obter a sua localização no tecido com a melhor resolução possível. Os complexos antígeno-anticorpo formados são revelados por um fluoróforo (imunofluorescência), ou por métodos enzimáticos que desenvolvem uma coloração, e podem ser observados em microscópio ótico, ou por microscopia eletrônica de transmissão, quando os anticorpos estão ligados a marcadores eletrodensos de pequena dimensão (5-10 nm), como o ouro coloidal. Os principais fatores que interferem no resultado da imunohistoquímica são a qualidade do anticorpo utilizado, que deve ser específico para o antígeno pesquisado, e os cuidados com a preservação do antígeno durante o processamento do espécime biológico. Os fixadores químicos tradicionais podem alterar a estrutura tridimensional e conformacional dos epitopos que são reconhecidos pelos anticorpos monoclonais específicos para esta região, levando a uma perda da reatividade antígeno-anticorpo (HADDAD *et al.*, 1998).

## **7.3. Crioultramicrotomia**

O método da crioultramicrotomia consiste na obtenção de cortes ultrafinos de material congelado, sem passar por processos químicos. Esta técnica facilita o acesso de sondas macromoleculares (anticorpos, oligonucleotídeos, lecitinas, etc.) a estruturas intracelulares. Com a utilização da microscopia eletrônica convencional, os procedimentos de pós-fixação, desidratação e inclusão podem levar a uma perda da atividade biológica, e a um deslocamento

de compostos solúveis da célula, limitando as reações químicas e imunológicas. Com o uso da crioultramicrotomia isto pode ser evitado. É uma técnica trabalhosa, que exige muita experiência do operador e só deve ser utilizada quando as demais técnicas convencionais já tenham sido esgotadas (HADDAD *et al.*, 1998).

#### **7.4. Hibridização *in situ***

Pelo princípio da hibridização, o alvo, uma fita única de DNA ou RNA, é revelado por uma sonda complementar de 50 a 300 pares de base, formando uma fita dupla. Através da hibridização *in situ* (ISH) é possível a localização de genes em nível celular ou subcelular, dependendo da técnica empregada, seja ela a revelação do híbrido sonda-DNA ao microscópio ótico, com um fluorocromo ou por métodos enzimáticos, ou ao microscópio eletrônico, com um elemento eletrodense, o ouro. A ISH foi usada inicialmente para localização de seqüências de DNA. Recentemente está sendo aplicada para localização de DNA virais, mRNA e mapeamento dos genes em cromossomos. As técnicas de imunohistoquímica permitem a localização das proteínas que são o resultado da expressão destes genes; já a ISH permite que estes genes sejam localizados antes mesmo de estarem sendo expressos (HADDAD *et al.*, 1998).

## II. JUSTIFICATIVA

A infecção pelo HTLV-1 apresenta na maioria das vezes uma característica lenta e progressiva, que leva ao aparecimento de doenças degenerativas incapacitantes, e raras vezes fatais. Não há vacinas, nenhum tratamento satisfatório e nenhuma maneira de se prever o risco do desenvolvimento de uma doença ou o prognóstico em pessoas infectadas assintomáticas ou oligossintomáticas (com poucos sintomas). Estudos recentes de virologia molecular do HTLV-1 e imunologia têm mostrado a importância da resposta imune do hospedeiro na redução dos riscos destas doenças e tem começado a explicar porque algumas pessoas infectadas desenvolvem doença e outras não.

A pele é um órgão que tem participação ativa na elaboração da resposta imune aos agentes nocivos externos. No micro-ambiente da pele são encontrados linfócitos T residentes, dentre estes, o linfócito T CD4+, que é uma célula alvo do HTLV-1, e uma sub-população destes linfócitos tem grande afinidade de migração para a pele. Outros tipos celulares necessários ao processamento da resposta imune, como os linfócitos T CD8+, as células dendríticas de Langerhans e também as citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão produzidas por estas células, se encontram presentes na pele, que é um órgão frequentemente acometido na infecção pelo HTLV-1 (DUMMER *et al.*, 2000; VALLE *et al.*, 2001).

Muito pouco se sabe a respeito das lesões dermatológicas encontradas em portadores do HTLV-1. Investigando-se a pele e as lesões dermatológicas de 211 indivíduos candidatos à doação de sangue da Fundação HEMOMINAS em Belo Horizonte, foi verificado que entre os soropositivos para o HTLV-1, 49,2% apresentaram lesões, sendo que dos indeterminados (ELISA positivo e WB indeterminado), 21,4% apresentaram lesões e os soronegativos não apresentaram lesão, exceto três casos de tinea pedis. Ictiose (pele seca) e vitiligo só foram detectados em pacientes soropositivos. No grupo soropositivo a análise histológica (HE) de biópsias de pele, revelou a presença de infiltrado linfocitário em 75% das lesões e em 17% da pele normal destes mesmos pacientes. Este estudo demonstrou, que até o momento, em nenhuma destas lesões foi comprovado o fator causa-efeito para o HTLV-1 (GONÇALVES *et al.*, 1999).

No Brasil, uma área endêmica para o HTLV-1, onde esta infecção acomete indivíduos cada vez mais jovens e em que as lesões dermatológicas associadas a este vírus são prevalentes, tornam-se importante e necessário a identificação e a caracterização molecular do HTLV-1.

O estudo das alterações morfológicas *ex vivo* na pele dos indivíduos portadores do vírus com lesões dermatológicas, pode nos ajudar a compreender o que está ocorrendo *in vivo* em nível celular e subcelular com relação à interação vírus-célula hospedeira. A realização de estudos mais aprofundados na pele destes indivíduos torna-se de grande importância na busca de um valor prognóstico para a infecção pelo HTLV-1

Estes resultados poderão contribuir para um melhor entendimento da patogênese do HTLV-1 em nosso meio.

### III. OBJETIVOS

#### 1. Objetivo Geral

- ✓ Identificar e caracterizar filogeneticamente o HTLV-1, em biópsias cutâneas de pacientes oligossintomáticos com sorologia positiva para o HTLV-1 da Fundação HEMOMINAS de Belo Horizonte, Minas Gerais.

#### 2. Objetivos Específicos

- Padronizar a técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) em biópsia de pele desde a coleta do material clínico até a análise ao microscópio eletrônico.
- Pesquisar, através da MET, a presença de partículas virais, íntegras ou não, e a sua localização celular e subcelular, descrevendo as células envolvidas, avaliando e documentando as possíveis alterações morfológicas que possam ocorrer nas células da derme, epiderme, glândulas e matriz extracelular.
- Padronizar a técnica da “nested” PCR para detecção da região do gene *env* do HTLV-1 em biópsia de pele de indivíduos oligossintomáticos com sorologia positiva para o HTLV-1.
- Pesquisar, através da “nested” PCR, a presença do HTLV-1 na forma de provírus integrado ao genoma da célula infectada.
- Seqüenciar os produtos de PCR e fazer análise filogenética.
- Construir árvore filogenética a partir das seqüências de nucleotídeos da região amplificada do HTLV-1 por “nested” PCR.



## IV. MATERIAIS E MÉTODOS

### 1. Indivíduos participantes: Triagem e seleção

**Indivíduos HTLV-1 positivos:** Biópsias de pele foram coletadas de 10 indivíduos soropositivos para HTLV-1 e/ou 2, que foram detectados empregando-se o método de ELISA (Abbot Laboratories, North Chicago, IL,USA) e confirmados pelo método de Western Blot (HTLV BLOT 2.4, Genelabs Diagnostics, USA) como sendo soropositivos para o HTLV-1 e que pelo método de “nested” PCR nos seus respectivos sangues periféricos obtiveram resultados positivos para o HTLV-1.

Os doadores soropositivos, após passarem por avaliação epidemiológica e clínica e terem sido encaminhados pelo médico ao Serviço de Dermatologia da UFMG, foram convidados a participar deste projeto. Eles receberam explicações claras e concisas sobre os objetivos, a metodologia simplificada, os riscos e benefícios da sua participação na pesquisa. Após autorizarem sua participação, documentada no consentimento pós-informado (Anexo 1), a biópsia de pele foi feita por profissionais qualificados e competentes para realizar tal procedimento, minimizando os riscos para os participantes e mantendo as condições de sigilo e confidencialidade. Foram excluídos indivíduos com lesão dermatológica por trauma. Todas as faixas etárias e ambos os sexos foram incluídos no estudo.

**Indivíduos controles:** Os dois indivíduos doadores de pele normal foram selecionados como indivíduos clinicamente saudáveis por terem sido submetidos à cirurgia reparadora de mama (cirurgia eletiva que requer um risco cirúrgico), pelo cirurgião plástico Dr. Roberto Zimmer Prados, na Maternidade Otaviano Neves, em Belo Horizonte.

### 2. Coleta das amostras de pele

**Indivíduos HTLV-1 positivos:** Biópsias da pele com manifestação clínica do tipo eritrodermia inespecífica foram feitas pelo Dr. Antônio Carlos Martins Guedes, na sala de pequenas cirurgias do serviço de Dermatologia do Hospital das Clínicas da UFMG. Os indivíduos foram anestesiados no local da biópsia com xilocaína injetável e as amostras de pele retiradas utilizando-se bisturi “punch” de 4 mm de diâmetro. Após a biópsia, a ferida cirúrgica foi suturada para aceleração da cicatrização.

**Controles negativos:** Amostras de pele normal foram utilizadas como controle negativo nos experimentos.

**Acondicionamento e transporte das biópsias:** As amostras de pele foram fragmentadas com auxílio de bisturi e pinça estéreis. Os fragmentos que foram empregados para as técnicas moleculares foram transferidos imediatamente para criotubos (NUNC, Dinamarca), congelados em nitrogênio líquido em recipiente térmico apropriado, e transportados para o Laboratório de Vírus onde foram armazenados em botijão de nitrogênio líquido. Os fragmentos para as técnicas de microscopia foram acondicionados em frascos e microtubos contendo os fixadores apropriados para cada caso. Para a microscopia ótica foi utilizada a formalina (formol a 10%) e para a microscopia eletrônica, o glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4. O tamanho do fragmento para a microscopia eletrônica foi de 3 mm x 2 mm por 1 mm de espessura.

Os indivíduos HTLV-1 e 2 positivos foram orientados quanto ao estado de portador ou doente e aconselhados a adotar os seguintes procedimentos :

1. Manter o acompanhamento médico;
2. Não doar sangue, sêmen, órgãos ou tecidos do corpo;
3. Não compartilhar agulhas e seringas;
4. Usar preservativos nas relações sexuais;
5. Não amamentar.

### **3. Delineamento do estudo**

As biópsias foram analisadas por:

- 1) “nested” PCR, para clonagem do DNA e seqüenciamento parcial do gene *env*.
- 2) Microscopia ótica (MO): O material da biópsia foi processado para avaliação histológica, utilizando a microscopia ótica através da técnica de coloração Hematoxilina-Eosina (HE). Foram então classificadas como pele normal quando encontradas até 10 células monocíticas na região perivascular da derme superior, em aumento de 400x (GONÇALVES, D. U., 2000). Acima deste valor, considerou-se o diagnóstico de dermite crônica, definida como um infiltrado inflamatório mononuclear perivascular leve na derme superior. A dermoepidermite crônica foi definida como a soma dos achados histológicos da dermite crônica, com a presença de agressão à epiderme. Foram então classificadas como pele

“lesada”. Estas técnicas foram realizadas no laboratório do Anexo da Dermatologia (Ambulatório) do Hospital das Clínicas da UFMG, e as lâminas histológicas analisadas pelo Prof. Antônio Carlos Guedes.

3) Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), (ver item 5.1 de Materiais e Métodos).

### **3.1 Controles**

Como controle positivo foram utilizadas células MT-2, linhagem de células de cordão umbilical co-cultivadas com células infectadas pelo vírus HTLV-1 proveniente de uma paciente com ATL (MYOSHI *et al.*, 1981).

Como controle negativo foram empregadas biópsias de pele de indivíduos saudáveis com PCR negativa para o HTLV-1 (não foi possível a realização da sorologia nestes indivíduos).

## **4. Cultura de Células MT-2**

As células MT-2 usadas como controle positivo para as técnicas realizadas foram cultivadas em meio RPMI com 10% de soro fetal bovino e 0,4 µl/ml de penicilina G e 2,0 µl/ml de gentamicina, incubadas a 37°C em atmosfera umidificada com CO<sub>2</sub> 5% e repicadas a cada 3 dias, quando as células atingiam a contagem de 1 x 10<sup>6</sup> células por ml em 20 ml do meio de cultura.

## **5. Processamento do material selecionado**

### **5.1. Microscopia Eletrônica de Transmissão**

#### **5.1.1. Processamento das biópsias de pele**

A fixação primária das biópsias de pele foi feita no momento da coleta, em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4, por 6 h à temperatura ambiente. Foram feitas três lavagens, de 10 min cada uma, em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,4. Em seguida foi feita a pós-fixação em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,4 com 0,05% de vermelho de rutênio (VR) por 3 h à 4°C.

Seguiram-se três lavagens com tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,4 com VR 0,05% à temperatura ambiente. A desidratação foi feita em álcool com 0,05% VR, série crescente: com álcool a 50%.por 10 min, duas vezes; a 70% por 15 min, duas vezes; a 95% por 15 min, três vezes; a 100% por 15 min e desidratação com acetona PA duas vezes, por 15 min.

A infiltração das biópsias foi feita em 1 parte de acetona para 1 parte de resina Eponato de sódio, sem DMP-30, em frascos tampados “overnight” em temperatura ambiente. Após foi feita nova infiltração das biópsias em 1 parte de acetona e 2 de resina , com DMP-30, em frascos abertos 24 horas em temperatura ambiente. Na próxima etapa a infiltração foi feita em resina Eponato de sódio plena (com DMP-30) por 8 h em temperatura ambiente ou até que os fragmentos estivessem no fundo do frasco. A inclusão em resina plena foi feita à 40°C por 1 h, passando para 60°C por 72 h. Foram feitos cortes semifinos (espessura de 200 nm) no ultramicrótomos SORVALL MT2-B (Du Pont Instruments, France). Os cortes semifinos foram feitos para escolha da área de microtomia dos cortes ultrafinos (espessura de 60 nm) feita a seguir. A contrastação das telinhas contendo os cortes ultrafinos foi feita em acetato de uranila a 2% e solução de Reynold’s (citrato de chumbo). A observação foi feita no microscópio eletrônico, EM10A (ZEISS, GERMANY) e as fotomicrografias foram obtidas conforme HADDAD *et al.*, 1998 e CAMARGOS, 2000.

### **5.1.2. Escolha da área nos cortes semi-finos:**

Os cortes semi-finos obtidos de toda a área das biópsias incluídas foram analisados ao microscópio ótico para identificar a região da epiderme e da derme superior. Concomitantemente foram escolhidas as regiões que apresentavam um infiltrado de células mononucleares, tendo em vista uma padronização das áreas a serem observadas nas diferentes biópsias e uma maior probabilidade de se observarem partículas virais.

### **5.1.3. Processamento das células MT-2 para MET (MIYOSHI *et al.*, 1981).**

Aproximadamente  $3 \times 10^6$  células MT-2 foram centrifugadas por 15 minutos a 4000 g para obtenção de um sedimento firme . Foram feitas várias inclusões deste sedimento em ágar bacteriológico a 4% p/v tomando-se o cuidado de não espalhar o sedimento. Após solidificação do ágar, foi feita a retirada do excesso de ágar bem próximo ao sedimento. Os sedimentos incluídos em ágar foram imediatamente fixados em glutaraldeído a 3% em tampão

cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4 por 3 horas a 4°C. Foram feitas três lavagens de 10 minutos cada uma, no mesmo tampão e a seguir foi feita a fixação em tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4 por 1 hora a 4°C seguida de três lavagens no mesmo tampão. A desidratação foi feita em série crescente de álcool e em acetona como descrito acima. A infiltração foi feita em uma parte de acetona e duas partes de resina sem DMP-30 em frascos abertos, “overnight”, em temperatura ambiente. A inclusão, a microtomia e a contrastação foram feitas como descrito acima. Depois de prontas, as telinhas com os cortes ultrafinos foram observadas no microscópio eletrônico para análise e obtenção das fotomicrografias.

## **5.2. Extração do DNA genômico das biópsias de pele (LAIR *et al*, 1991 mod.)**

As biópsias de pele congeladas foram transferidas para um microtubo de 1,5 ml contendo 0,5 ml da solução de lise: 5 ml de tampão Tris.HCl 1M pH 8,5; 0,5 ml de EDTA 0,5M pH 8,0; 0,5 ml de SDS 20%; 5 ml de NaCl 2M; e 39 ml de água esterilizada acrescida de 500 µg de proteinase K. A seguir os tubos com as biópsias foram mantidos sob agitação constante no Mixer (Eppendorf) a 55°C, 40 rpm durante 24 hs. A proteinase K foi inativada a 95°C durante 10 minutos. As amostras foram homogeneizadas por 30 segundos e centrifugadas a 12.000 g por 10 minutos a 15°C. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e foi acrescentado isopropanol (0,8 x o volume) com leve homogeneização seguida de centrifugação a 10.000 g por 5 minutos a 15°C. O sobrenadante foi desprezado e ao sedimento foi acrescentado etanol a 95% gelado (v/v) e colocado a -20°C “overnight” e depois centrifugado a 10.000 g por 2 minutos a 15°C. O sobrenadante foi novamente desprezado e os tubos com os sedimentos obtidos foram invertidos em lenço de papel para secar. O DNA extraído foi homogeneizado em 20 µl de água esterilizada, durante 3 horas por agitação a 300 rpm, 55°C. A concentração do DNA foi estimada por espectrofotometria em UV(260 nm) no espectrofotômetro UV-240 SHIMADZU. O DNA foi estocado a -20°C.

## **5.3. Extração de DNA genômico de células MT-2**

O conteúdo de 2 garrafinhas de cultivo celular, ou seja,  $3 \times 10^6$  células, foi centrifugado para formar um sedimento que depois de lavado em PBS foi submetido a lise celular para extração do DNA total.

A técnica utilizada foi a mesma descrita acima para as biópsias de pele (item 5.2) com exceção da fase de lise onde foram feitas algumas modificações. A saber: a quantidade da proteinase K foi de 50µg para 0,5ml do tampão de lise e a etapa de agitação no Mixer (Eppendorf) foi de 180 rpm por 3 horas a 37°C.

### 5.3.1. Controle da extração do DNA das biópsias de pele

A espectrofotometria em luz UV, foi utilizada para o controle da extração e para quantificação do DNA. Foram considerados representativos de uma boa extração os valores da relação entre a absorbância em 260 nm e 280 nm iguais ou acima de 1,7.

O controle da extração de DNA das biópsias de pele foi também realizado através da PCR para a amplificação do gene HLA-DQ $\alpha$  (Antígeno de histocompatibilidade humana-DQ $\alpha$ ), um gene muito conservado do genoma humano. Para esta reação foram utilizados 1 µg de DNA de pele humana e os seguintes reagentes: 2 µl de tampão de Taq DNA polimerase 10X; 1,25 mM de MgCl<sub>2</sub>; 25 mM dos nucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 10 pMoles de cada iniciador e 0,5 U de Taq DNA polimerase num total de 20 µl de reação. As reações foram cobertas com óleo mineral esterilizado e processadas no aparelho Perkin Elmer Cetus (Perkin, USA), modelo N 801-150.

Os oligonucleotídeos usados como iniciadores na reação de amplificação do gene HLA-DQ $\alpha$  através de PCR, segundo seqüência depositada no GenBank, descrita em 2002 por INIGUEZ *et al.* (dado não publicado; acesso no BLAST: AF126253) foram descritos na tabela abaixo (TABELA 2). O estudo destes iniciadores foi feito utilizando o programa BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)).

**TABELA 2:** Iniciadores, localização no gene HLA-DQ $\alpha$  e as seqüências de bases.

Denominação	Posição no genoma	Seqüência
206	1-26	'5 GTGCTGCAGGTGTAAGCTTGTACCAG 3'
207	215-242	'5 CACGGATCCGGTAGCGGTACAGAGTTG 3'

([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)).

As condições da PCR para amplificação do gene HLA- DQ $\alpha$  foram as seguintes: 1 ciclo: 94°C, 5 min, 30 ciclos: 94°C, 45 seg, 58°C, 30 seg, 72°C, 1 min; 1 ciclo: 72°C, 10 min.

Após a PCR, os produtos amplificados foram fracionados em gel de agarose 1,8% p/v em tampão TAE 1X (20,3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10,04 M Tris-acetato, 10 mM EDTA pH 8,0), contendo brometo de etídio(0,5 µg/ml). O fracionamento foi efetuado em 50 V, com tempo de corrida de 40 minutos, em tampão TAE 1X juntamente com um padrão de tamanho molecular de 100 pb (Ladder 100 pb DNA, GIBCO). O gel foi visualizado e digitalizado sob iluminação UV (320nm).

#### 5.4. Amplificação do gene *env* que codifica parte da gp21 e gp46 do HTLV-1 através da “nested” PCR

A “nested” PCR foi feita utilizando os iniciadores (TABELA 3) e condições conforme especificados abaixo.

Os iniciadores foram idealizados segundo seqüência do protótipo japonês ATK-I, descrita por SEIKI, M. *et al.* (1983) (acesso no BLAST: J02029/IM33896). O estudo destes iniciadores foi feito no programa BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)).

**TABELA 3:** Iniciadores, localização no gene *env* que codifica parte da gp21 e gp46 do HTLV-1 e as seqüências de bases.

Denominação	Posição no genoma	Seqüência
Env-eF	5692-5716	‘5 CTAGTCGACGCTCCAGGATATGACC 3’
Env-eR	6512-6488	‘5 TGTGAGACGCCAAGGTCCCAGTTAA 3’
Env-iF	57265751	‘5 TCCTTAATACCGAACCCAGCCAACCTG 3’
Env-iR	6037-6012	‘5 GGTCAAAGCAGTGGGTCCAGTTAAAT 3’

([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)).

As reações da PCR externa foram realizadas tendo como molde 1µg de DNA por reação, a saber, dos DNAs extraídos das biópsias e do DNA extraído da célula MT-2, que foi utilizado como controle positivo da reação. Como controle negativo das biópsias de pele a reação da PCR externa foi feita com 1 µg do DNA extraído de pele normal coletada nas cirurgias plásticas de mama. Duas reações de PCR consecutivas foram feitas: uma externa e outra interna ou “nested”. Os reagentes utilizados para a reação de PCR externa foram: 2 µl de tampão de Taq DNA polimerase 10X; 1,25 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM dos nucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 10 pMoles de cada iniciador e 0,5 U de Taq DNA polimerase para um

total de 20 µl de reação. As reações foram cobertas com óleo mineral esterilizado e processadas no aparelho Perkin Elmer Cetus, modelo N 801-150 (Perkin, USA) (ANDRADA-SERPA *et al.*, 1995, mod.).

As condições da PCR externa foram as seguintes: 1 ciclo a 95°C, 5 min; 35 ciclos a 95°C, 45 seg., 55°C, 1 min., 72°C, 1 min. e 1 ciclo a 72°C, 10 min

Para a reação da PCR interna (“nested” PCR) foram utilizados os mesmos reagentes citados acima para a PCR externa, com exceção da concentração de MgCl<sub>2</sub>, que foi de 1 mM para 20 µl da reação e do molde de DNA que corresponde agora a 2 µl do produto da PCR externa. As condições da PCR interna foram as seguintes: 1 ciclo a 95°C, 5 min; 30 ciclos: 95°C, 30 seg., 60°C, 30 seg., 72°C, 30 seg. e 1 ciclo a 72°C, 7 min.

Após a “nested” PCR, os produtos amplificados de cada amostra foram fracionados em gel de agarose 1,8% p/v em tampão TAE 1X (20,3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10,04 M Tris-acetato, 10 mM EDTA pH 8,0), contendo brometo de etídio (0,5 µg/ml). O fracionamento foi efetuado em 50 V, com tempo de corrida de 40 minutos, em tampão TAE 1X juntamente com um padrão de tamanho molecular de 100 pb (Ladder 100 pb DNA, GIBCO). O gel foi visualizado e digitalizado sob iluminação UV (320nm).

### **5.5. Purificação dos produtos da “nested” PCR**

O maior volume possível dos produtos da “nested” PCR, correspondentes aos fragmentos amplificados do tamanho esperado de 312 pb do gene *env*, de cada amostra, foram fracionados em gel de agarose “low melting” 1% p/v, em tampão TAE 1X (20,3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10,04 M Tris-acetato, 10 mM EDTA pH 8,0), contendo brometo de etídio (0,5 µg/ml). O fracionamento foi efetuado em 50 V, com tempo de corrida de 40 minutos, em tampão TAE 1X juntamente com um padrão de tamanho molecular de 100 pb (Ladder 100 pb DNA, GIBCO). O gel foi visualizado sob iluminação UV de comprimento de onda mais longo. As bandas obtidas do tamanho de 312 pb foram recortadas do gel e purificadas através do sistema Wizard® PCR Preps (Promega, USA). Resumidamente, os fragmentos de gel contendo o DNA de cada amostra foram incubados a 70°C em microtubos de 1.5 ml até dissolução da agarose. Um ml de resina de purificação foi adicionada a cada tubo e homogeneizada por 20 seg. A mistura resina/DNA foi transferida para o corpo de uma seringa conectada com a mini coluna de extração e após a lavagem com isopropanol a 80%,



procedeu-se à eluição do DNA com água deionizada e esterilizada. O DNA obtido foi estocado à -20°C.

## **5.6. Clonagem**

Os produtos da PCR purificados (inserto) foram clonados no vetor pGEM®- T Easy Vector através do sistema pGEM®- T Easy Vector (Promega, USA). Após a quantificação do DNA purificado, em gel de agarose a 1% p/v, foram feitos os cálculos para se encontrar a quantidade do inserto a ser utilizada na reação de ligação com o vetor, numa proporção molar de 3:1. A reação de ligação foi a seguinte: 5 µl do tampão de ligação; 1 µl do vetor (50 ng); de 0,8 µl a 3,0 µl do DNA (produto purificados da PCR); 1 µl de T4 DNA ligase e água deionizada para um volume final de 10 µl. Após homogeneizadas, as reações foram incubadas a 4°C “overnight”. Os insertos de 312 pb do gene *env* do HTLV-1 foram utilizados para a transformação das bactérias competentes, *Escherichia coli* DH5α.

## **5.7. Transformação bacteriana**

Foi pipetado 50 µl da bactéria competente descongelada no gelo e 5 µl do vetor com o inserto e incubados no gelo por 30 minutos. Após, foram incubados em Banho-maria a 37°C por mais 15 minutos.

Respectivamente 30 µl e 20 µl de bactérias transformadas foram plaqueadas em meio LB-ágar contendo 50µg/ml de ampicilina e as placas de cultura foram incubadas a 37°C por 18 horas. Paralelamente, foram feitos controles de crescimento de bactérias competentes não transformadas, em placas contendo ágar-LB com ampicilina ou não, uma vez que este plasmídeo contém um gen de resistência à ampicilina.

## **5.8. Obtenção do DNA plasmidial para o seqüenciamento**

As colônias de bactérias transformadas (clones recombinantes) foram repicadas em 10 µl de meio LB com ampicilina e incubadas a 37°C por 3 horas. Um µl da cultura foi utilizado na PCR para verificar a presença e o tamanho do inserto, com os iniciadores específicos para o HTLV-I. Os clones de bactérias contendo o inserto foram cultivados em 10 ml de meio LB com ampicilina, por 12-16 horas a 37 °C. A obtenção do DNA plasmidial foi feita através do

sistema Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, USA). O sedimento de células bacterianas foi lisado com tampão de lise, na presença de protease alcalina para inibição de endonucleases e obtenção de um lisado claro. O lisado foi transferido para uma mini-coluna de ligação do DNA plasmidial que foi purificado por duas centrifugações após adição de solução de lavagem contendo etanol. O DNA foi eluído para um microtubo estéril com a adição de água livre de nuclease e estocado a -20°C.

Após a extração do DNA plasmidial, foi feito o cálculo da concentração aproximada de DNA por visualização das bandas em gel de agarose 1%.

### **5.9. Seqüenciamento dos clones**

O DNA dos clones obtidos foi seqüenciado no Núcleo de Análise de Genoma e Expressão Gênica (NAGE) na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) com os seguintes reagentes e aparelhos: kit “DyEnamic™ ET Dye Terminator” e seqüenciador automático capilar Mega BACE 1000™ (AMERSHAM BIOSCIENCES) sequencing system. O seqüenciamento foi feito segundo o método descrito originalmente por SANGER et al., (1977), que emprega o método de terminação em cadeia por dideoxi. Cada amostra foi seqüenciada, no mínimo, três vezes, empregando-se os iniciadores universais pUC/M13 senso e anti-senso.

### **5.10. Análise das seqüências de DNA**

A busca de similaridade entre as seqüências de nucleotídeos obtidas com o DNA do gene *env* de amostras isoladas foi feita pela comparação com seqüências da mesma região depositadas no banco de dados “GenBank” do National Center for Biotechnology (ALTSCHUL *et al.*, 1997) usando o BLASTn (pacote BLAST 2.0 - BASIC ALIGNMENT SEARCH TOOL) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), como descrito na tabela nº. 4. Os valores de corte utilizados para a análise foram os seguintes: valor de “score” maior que 100 e P (probabilidade) menor que 0.005 ou um valor de P menor que  $10^{-5}$  independente do valor de “score”. As seqüências mais confiáveis foram selecionadas e alinhadas/ editadas com o programa MEGA Molecular Evolutionary Genetics Analysis versão 3.1 (KUMAR *et al.*, 2001) para correção das ambigüidades e construção da árvore filogenética

(<http://www.megasoftware.net/>). O nível de reprodutibilidade da árvore foi garantido pela análise de “Bootstrap” de 1000 repetições.

**TABELA 4:** Isolados clínicos utilizados na análise filogenética na região do gene *env* .

Isolado	Origem	Acesso GenBank	Referência
MEL5	Ilhas Salomão	L02534	GESSAIN <i>et al.</i> , 1993
MSHR	Austrália	M92818	BASTIAN <i>et al.</i> , 1993
ATL-YS	USA	U19949	CHOU <i>et al.</i> , 1995
ATK-1	Japão	J02029	SEIKI <i>et al.</i> , 1983
MT-2	Japão	M37747	GRAY <i>et al.</i> , 1990
YL755	Taiwan	U60942	YANG, Y. <i>et al.</i> , 1997
BOI	França	L36905	BAZARBACHI <i>et al.</i> , 1995
Pt8	Brasil	U81868	SCHULZ <i>et al.</i> , 1991
Pt9	Brasil	U81869	SCHULZ <i>et al.</i> , 1991
CAR	Caribe	D13784	MALIK <i>et al.</i> , 1988
GAB	Oeste África	AF092065	MOYNET, <i>et al.</i> , 2001
MAR	Martinica	L760602	BAYLOT <i>et al.</i> , 1996 (unpublished)
COL	Colômbia	AF405343	DOMINGUEZ <i>et al.</i> , 2002
GFR	Guiana Francesa	L76058	BAYLOT <i>et al.</i> , 1996 (unpublished)
GER	Alemanha	AF042071	ELLEBROK <i>et al.</i> , 1998 (unpublished)
EL	Congo	M67514	PAINE <i>et al.</i> , 1991

Para as análises de alinhamento entre as seqüências de nucleotídeos selecionadas foram utilizados os programas MAP - “Multiple sequence alignment” (<http://www.searchlauncher.bcm.tmc.edu/multi-align/multi-align.html>). Após o alinhamento, as seqüências foram utilizadas para a construção de árvores filogenéticas através do programa TREECON for Windows (van der Peer & Wachter, 1994) pelo método de “neighbor-joining” (Minima Evolução).

## V. RESULTADOS

### 1. Análise das biópsias de pele ao microscópio eletrônico

As análises das biópsias de pele normal feitas em aumentos de 4.000x a 7.800x apresentaram padrão morfológico ultraestrutural normal de distribuição celular com a presença de células próprias do tecido. Na epiderme foram vistas as três camadas celulares típicas. A camada basal, mais profunda da epiderme, responsável pela produção constante de queratinócitos, com suas células colunares aderidas à membrana basal por hemidesmossomas, e aderidas às células vizinhas por desmossomas verdadeiros (FIGURA 10 A). Com aumentos em torno de 30.000x estas células apresentaram núcleos arredondados a ovais com nucléolo proeminente e citoplasma rico em ribossomas e mitocôndrias, e apresentando tonofibrilas em pequeno número.

A seguir foi observada a camada de células espinhosas com o formato poliédrico e núcleo arredondado central. Estas células apresentaram muitos tonofilamentos concentrados nas projeções citoplasmáticas que fazem contato com os outros queratinócitos através de um sistema de pontes intercelulares e terminam em junções do tipo desmossomos. Células dendríticas de Langerhans foram vistas em pequeno número na camada espinhosa com os núcleos clivados e irregulares, mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso e ausência de tonofilamentos.

Os queratinócitos da camada granular apresentaram aspecto mais achatado, citoplasma repleto de grânulos de querato-hialina, ausência de organelas e do núcleo nas camadas mais superficiais que formaram o extrato córneo (FIGURA 10 B).

Na camada basal da epiderme foram encontrados melanócitos, em contato com a membrana basal, com o núcleo ovóide, citoplasma abundante, e os característicos grânulos de melanina.

Na derme foi observada a nítida separação entre a derme papilar, uma área mais clara, situada próxima à membrana basal, com uma rede dispersa de colágeno e elastina entremeada pela abundante matriz extracelular e a derme reticular, logo abaixo, com as bandas de colágeno densas entremeadas por fibras espessas de elastina, numa disposição paralela à epiderme.

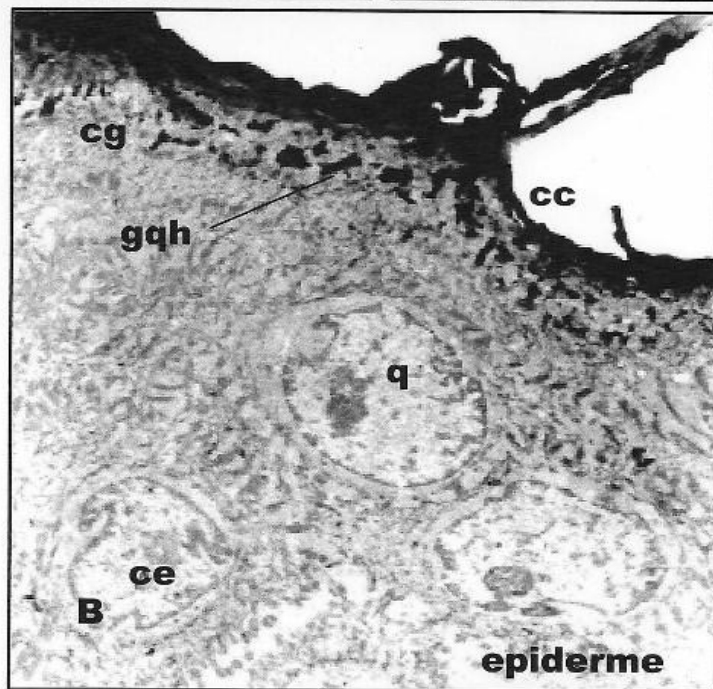
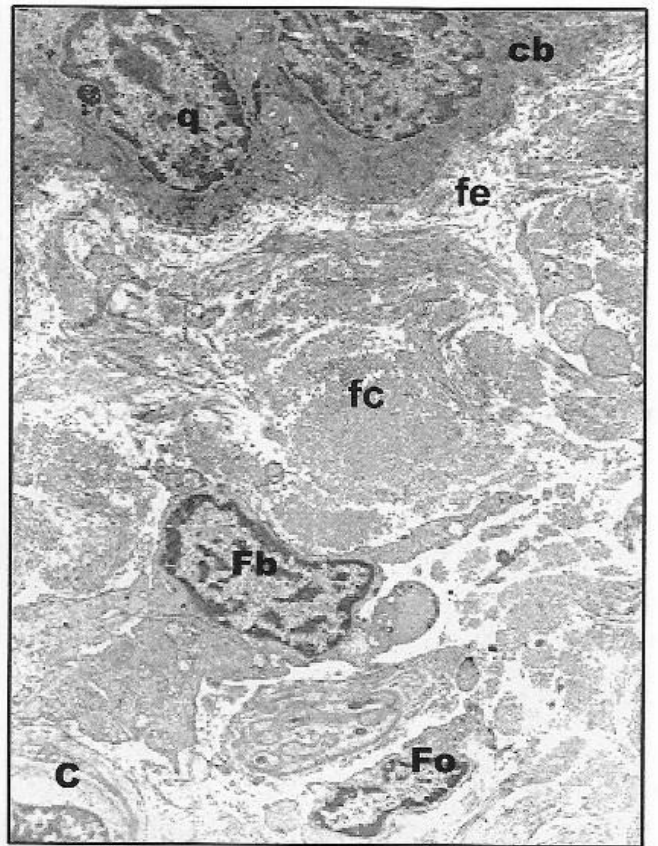
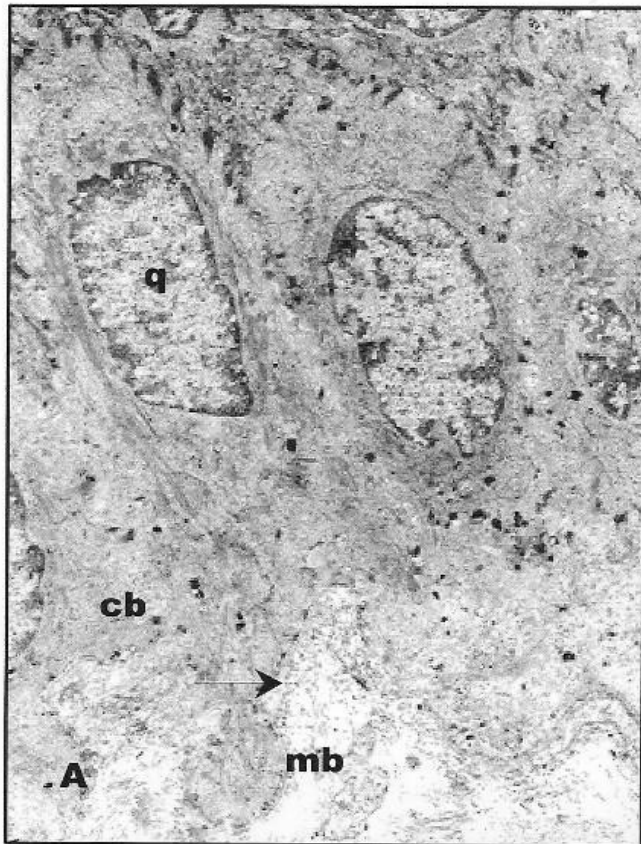
## **FIGURA 10: Características morfológicas ultraestruturais da pele normal (1).**

As análises a seguir foram feitas através da técnica de microscopia eletrônica de transmissão realizada em biópsias de pele normal de indivíduos saudáveis submetidos à cirurgia plástica ou reparadora de mama. Imediatamente após terem sido coletadas, as biópsias foram fixadas em glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4, por 6 horas à temperatura ambiente e pós fixadas em tetróxido de ósmio a 1% ( $\text{OsO}_4$  1%) por 3 h a 4° C (ver item 5.1 em Materiais e métodos). Foram analisados os compartimentos típicos da pele normal. A epiderme, mais superior e a derme logo abaixo, representada pela derme papilar, junto à membrana basal que separa a derme da epiderme, e a derme reticular com seus pequenos vasos.

**Quadro A:** Epiderme e derme com cb- camada basal da epiderme, q- queratinócito, mb- membrana basal, → hemidesmosmosos (7.800x).

**Quadro B:** Epiderme com ce- camadas espinhosa, cg- camada granulosa e cc- camada córnea da epiderme, q- queratinócitos, gq – grânulos de querato-hialina (7.800x).

**Quadro C:** Epiderme, e derme com Fb – fibroblasto, Fo – fibrócito, fe - fibras elásticas e fc – fibras colágenas, cb – camada basal da epiderme ( 5.100x).



Fibroblastos (FIGURA 10 C), células alongadas, com o núcleo retangular de contorno pouco indentado, grande nucléolo, e citoplasma com seus prolongamentos típicos contendo mitocôndrias, ribossomas livres e ligados a um retículo endoplasmático dilatado, e ausência de filamentos de actina, miosina e tonofilamentos, foram vistos dispersos na matriz dérmica. Fibrócitos, que são fibroblastos em repouso, e pequeno número de linfócitos, macrófagos e mastócitos dispersos na matriz, entre fibras elásticas e colágenas da derme também foram observados (FIGURA 11 B). Os linfócitos encontrados apresentaram o núcleo ocupando quase toda a célula, áreas de cromatina condensada e não condensada, citoplasma contendo poucas mitocôndrias e ribossomas livres. Os macrófagos apresentaram núcleo irregular, cromatina mais frouxa e numerosos vacúolos citoplasmáticos e lisossomos. Os mastócitos apresentaram os característicos grânulos de histamina.

Na derme foram vistos pequenos vasos e capilares com sua morfologia ultraestrutural típica apresentando as células endoteliais circundando a luz do vaso, a membrana basal, e os pericitos em volta (FIGURA 11 A).

As análises feitas nas amostras das biópsias de peles lesadas dos indivíduos com dermoepidermite crônica ao HE (400x) (ver item 3 de Materiais e métodos) e sorologia positiva para o HTLV-1, em aumentos de 4.000x a 8.000x, demonstraram a presença de várias células mononucleares infiltrando a derme superior e/ou as papilas dérmicas e migração de células mononucleares para a epiderme em todas as amostras, em maior ou menor grau (FIGURA 12 A e B).

Todas as alterações morfológicas ultraestruturais descritas a seguir foram observadas em maior ou menor grau nas amostras analisadas das biópsias de pele dos indivíduos soropositivos para o HTLV-1 e que apresentaram dermoepidermite crônica ao exame HE. Os itens analisados e o grau de intensidade foram listados nas tabelas 5 e 6. As figuras, constantes deste trabalho, de uma determinada amostra clínica, foram representativas para as demais em que foi observado o mesmo ítem.

Foi também observado um aumento de células mononucleares em torno de capilares e vasos menores da derme, bem como no interior desses vasos, (FIGURA 13 A e B). Nesta região peri-vascular também foram encontrados mastócitos em degranulação em algumas amostras.

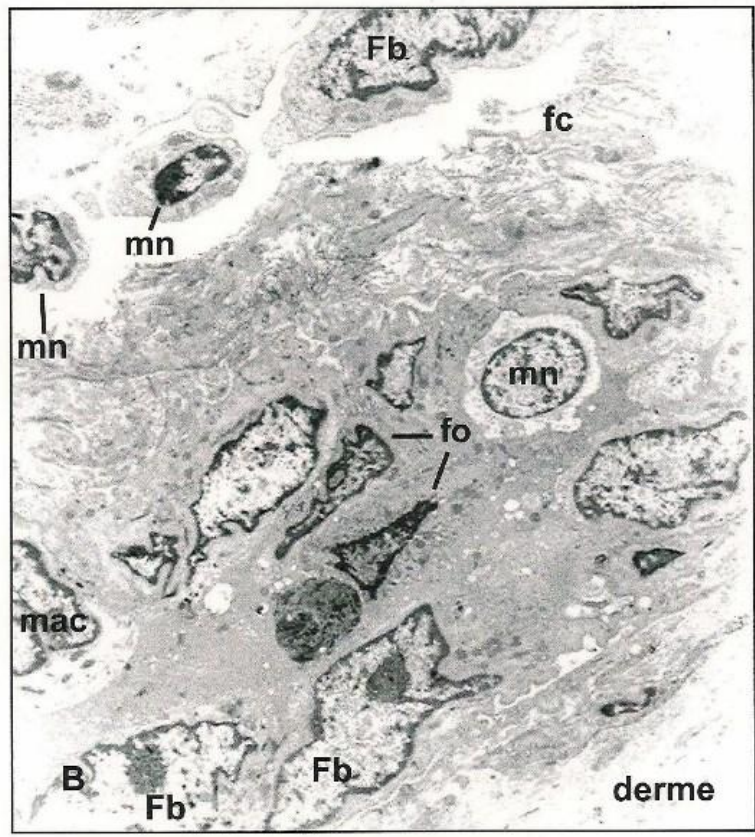
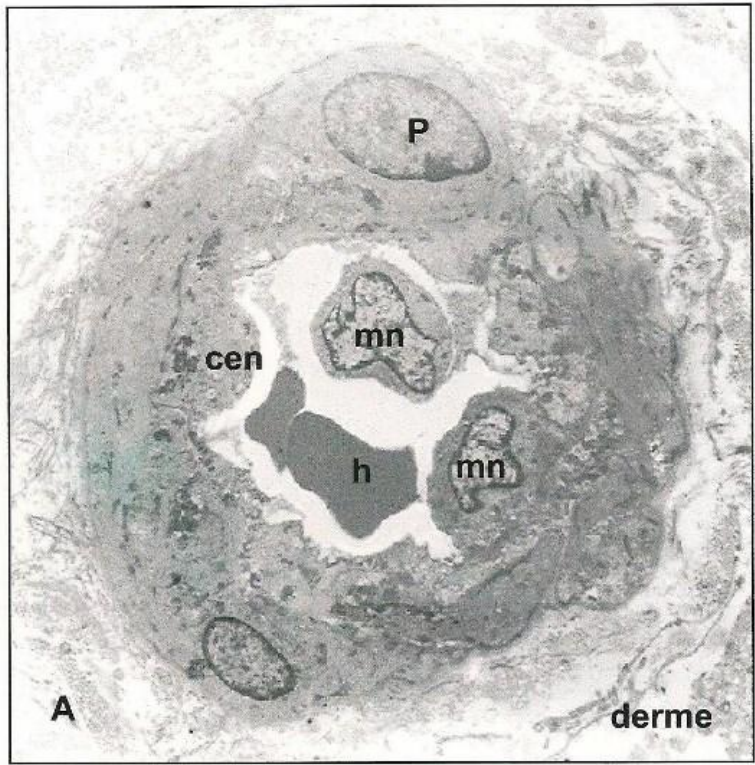
## **FIGURA 11: Características morfológicas ultraestruturais da pele normal (2).**

A derme foi analisada através da técnica de microscopia eletrônica de transmissão realizada em biópsias de pele normal de indivíduos saudáveis submetidos à cirurgia plástica ou reparadora de mama. Imediatamente após terem sido coletadas, as biópsias foram fixadas em glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4, por 6 horas à temperatura ambiente e pós fixadas em tetróxido de òsmio a 1% ( $\text{OsO}_4$  1%) por 3 h a 4° C (ver item 5.1.1 em Materiais e métodos) .

**Quadro A:** Derme papilar apresentou um capilar com parede revestida pelas células endoteliais (cen), com dois pericitos em volta (P) e na sua luz, hemácias (h) e células mononucleares da série linfóide (mn) (4.000x).

**Quadro B:** Células que foram encontradas normalmente na derme reticular tais como os fibroblastos (Fb), os fibrócitos (fo), macrófagos (mac) e células mononucleares da série linfóide (mn). Foram observadas fibras colágenas (fc) preenchendo a matriz dérmica.



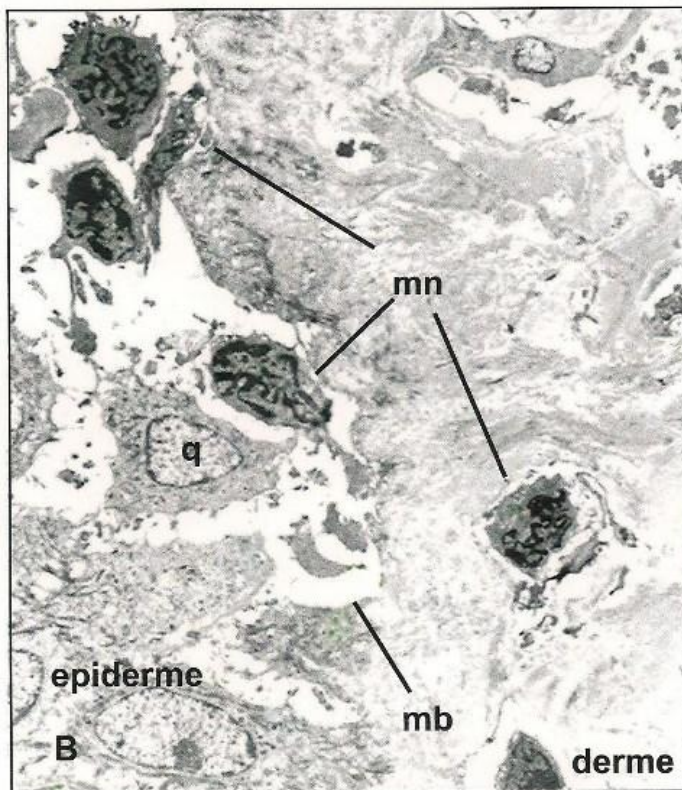


## **FIGURA 12: Características morfológicas ultraestruturais da pele lesada.**

As análises a seguir foram feitas através da técnica de microscopia eletrônica de transmissão realizadas em biópsias de pele de indivíduos com sorologia positiva para o HTLV-1 e que apresentaram lesões compatíveis com dermoepidermite crônica ao exame de HE. Imediatamente após terem sido coletadas, as biópsias foram fixadas em glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4, por 6 horas à temperatura ambiente e pós fixadas em tetróxido de ósmio a 1% ( $\text{OsO}_4$  1%) por 3 h a 4° C (ver item 5.1.1 em Materiais e métodos). Foram analisados os cortes semifinos e selecionadas as áreas do infiltrado inflamatório mononuclear que apresentaram maior celularidade à microscopia óptica.

As fotomicrografias eletrônicas que se seguem e que foram selecionadas para ilustrarem este trabalho foram obtidas do processamento da biópsia de um indivíduo específico, mas foram representativas para as demais em relação ao item analisado.

**Quadros A e B:** Epiderme apresentou espaços aumentados entre os queratinócitos (q) com áreas de destruição das junções celulares e migração de células mononucleares (mn) onde a membrana basal (mb) se encontrava destruída (ambos os quadros 4.500x). Em **A** foi observado um intenso infiltrado de células mononucleares na derme papilar (seta larga: → ).



### **FIGURA 13: Ultraestrutura dos vasos da derme lesada.**

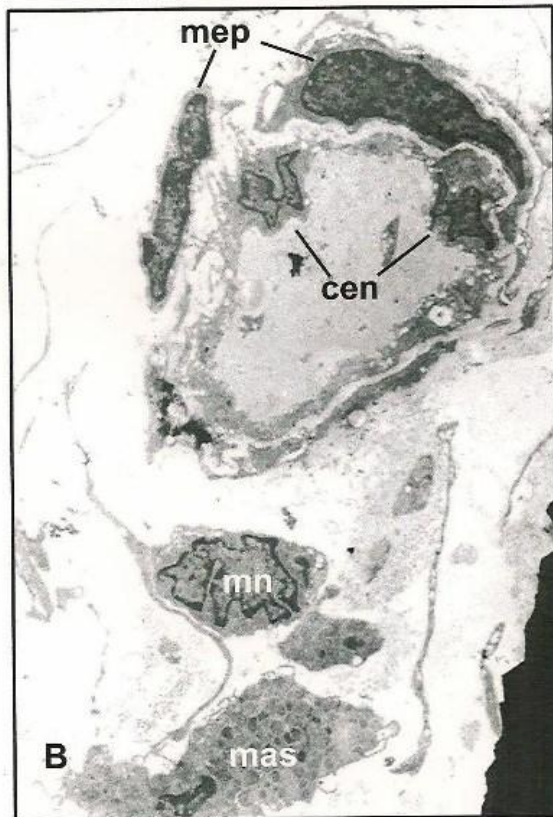
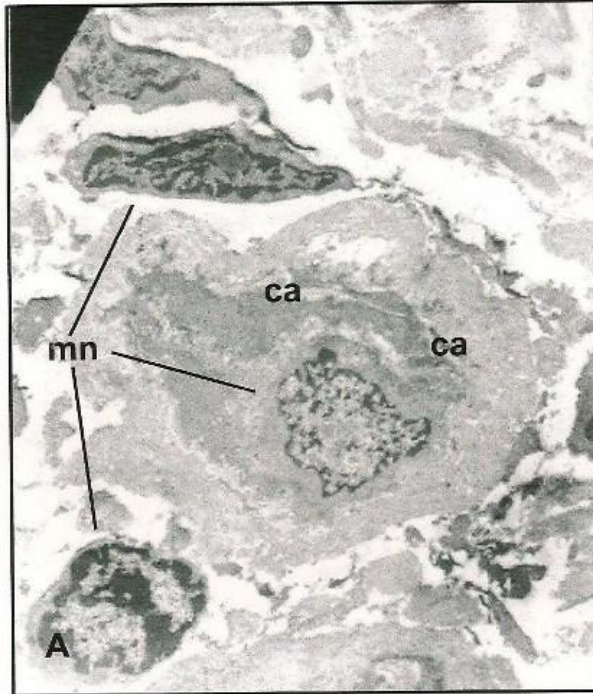
As análises a seguir foram feitas através da técnica de microscopia eletrônica de transmissão realizadas em biópsias de pele de indivíduos com sorologia positiva para o HTLV-1 e que apresentaram lesões compatíveis com dermoepidermite crônica ao exame de HE. Imediatamente após terem sido coletadas, as biópsias foram fixadas em glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4, por 6 horas à temperatura ambiente e pós fixadas em tetróxido de ósmio a 1% (OsO<sub>4</sub> 1%) por 3 h a 4° C (ver item 5.1.1 em Materiais e métodos). Foram analisados os cortes semifinos e selecionadas as áreas do infiltrado inflamatório mononuclear que apresentaram maior celularidade à microscopia óptica.

As fotomicrografias eletrônicas que se seguem e que foram selecionadas para ilustrarem este trabalho foram obtidas do processamento da biópsia de um indivíduo específico, mas foram representativas para as demais em relação ao item analisado.

**Quadro A:** Derme papilar apresentou um aumento de células mononucleares na região perivascular. Capilar (ca) com paredes dilatadas e células mononucleares (mn) na luz e em volta do capilar (7.000x).

**Quadro B:** Derme reticular apresentou pequeno vaso com sua parede formada por células endoteliais (cen) com núcleo endentado e citoplasma vacuolizado. Células mioepiteliais (mep) foram observadas a sua volta. Próximo ao vaso também foram vistos uma célula mononuclear (mn) e um mastócito (mas) (7.000x)



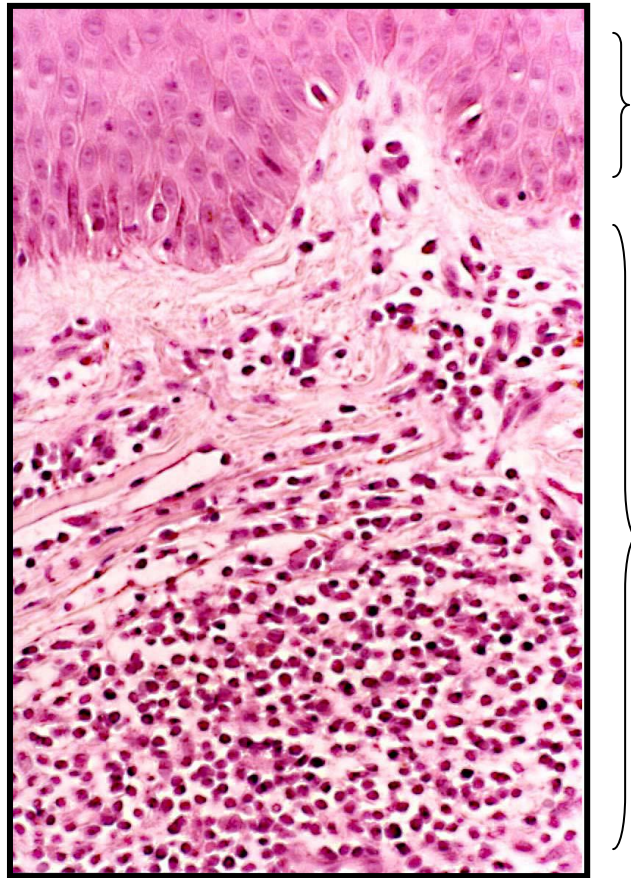


As células endoteliais dos vasos também apresentaram alterações, tais como, núcleos com endentações e citoplasma repleto de vacúolos (FIGURA 13 B).

O tamanho das células mononucleares presentes no infiltrado, variou de 8  $\mu\text{m}$  a 10  $\mu\text{m}$  de diâmetro e a relação núcleo/citoplasma aumentada indicou que estas células poderiam ser da linhagem linfóide. Estes resultados confirmaram os resultados obtidos pela microscopia ótica pelo método de coloração pela hematoxilina-eosina, com aumentos de 400x a 1000x, de dermoepidermite crônica (infiltrado inflamatório de células mononucleares na derme e migração para a epiderme) nas amostras analisadas (FIGURA 14).

Com um aumento em torno de 5.000x foi observada a camada da epiderme, com os espaços intercelulares aumentados e destruição dos desmossomas entre os queratinócitos. Estas células também apresentaram núcleo condensado e citoplasma vacuolizado. Nas amostras em que foram observadas células mononucleares migrando para a epiderme também foram observadas várias áreas de destruição da matriz extracelular e da membrana basal que separa a derme da epiderme e as estruturas de adesão entre as duas, os hemidesmossomas, destruídos (FIGURA 12 A E B).

Aumentos de 10.000x a 36.500x foram utilizados com a finalidade de descrever as alterações morfológicas observadas na matriz extracelular e na maioria das células mononucleares que estavam infiltrando a pele. O que chamou mais a atenção foram as alterações vistas no núcleo destas células. Grande número delas apresentou um núcleo irregular, endentado e lobulado, com a membrana nuclear irregular (FIGURA 15 B, C e D). O padrão da cromatina também apresentou alterações, com uma nítida separação da eucromatina, mais clara, da heterocromatina, mais escura e condensada na periferia do núcleo (FIGURA 15 A, B, C e D). Este tipo de distribuição da cromatina permitiu uma melhor observação dos nucléolos que se tornaram mais evidentes (FIGURA 15 B). Foi observada a formação de agrupamentos (sincícios) de células mononucleares na derme em várias amostras. (FIGURA 15 B).



**FIGURA 14:** Corte histológico de biópsia de pele corado pelo método de HE de indivíduos com sorologia positiva para o HTLV-1 que apresentaram lesão dermatológica compatível com dermoepidermite crônica. À microscopia óptica foi observado um extenso infiltrado de células mononucleares na derme e papilas dérmicas (400x).

**FIGURA 15: Ultraestrutura das células mononucleares que foram vistas infiltrando a derme da pele lesada.**

As análises a seguir foram feitas através da técnica de microscopia eletrônica de transmissão realizadas em biópsias de pele de indivíduos com sorologia positiva para o HTLV-1 e que apresentaram lesões compatíveis com dermoepidermite crônica ao exame de HE. Imediatamente após terem sido coletadas, as biópsias foram fixadas em glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4, por 6 horas à temperatura ambiente e pós fixadas em tetróxido de ôsmio a 1% (OsO<sub>4</sub> 1%) por 3 h a 4° C (ver item 5.1.1 em Materiais e métodos). Foram analisados os cortes semifinos e selecionadas as áreas do infiltrado inflamatório mononuclear que apresentaram maior celularidade à microscopia óptica.

As fotomicrografias eletrônicas que se seguem e que foram selecionadas para ilustrarem este trabalho foram obtidas do processamento da biópsia de um indivíduo específico, mas foram representativas para as demais em relação ao item analisado.

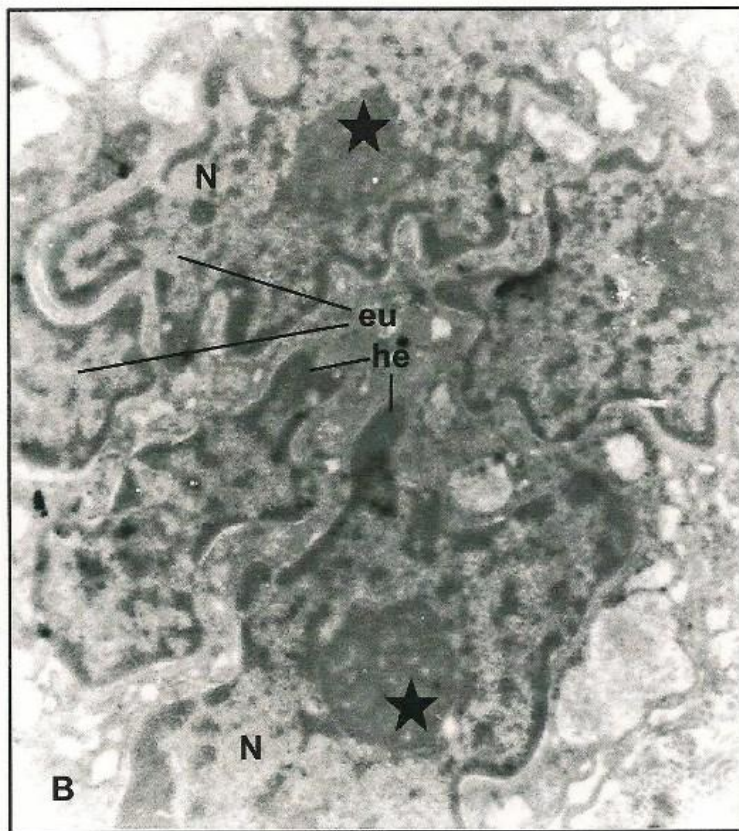
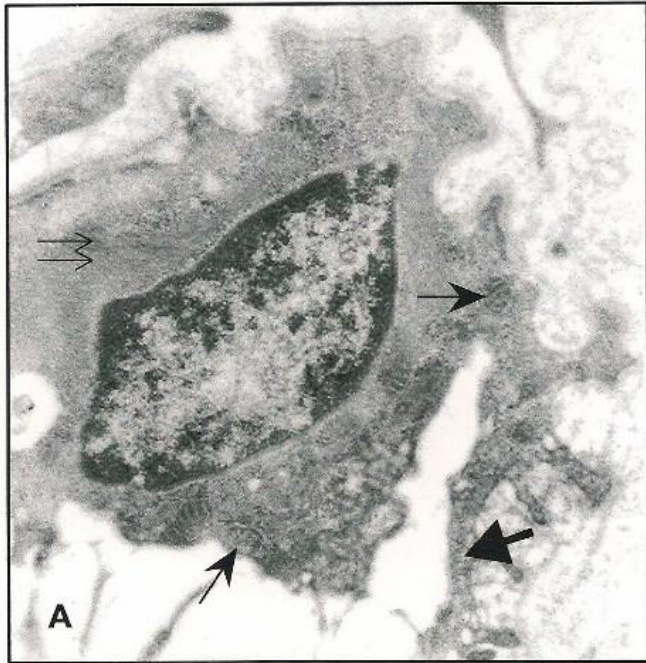
**Quadro A:** Célula mononuclear com morfologia alterada apresentou longos prolongamentos citoplasmáticos (seta larga: →), mitocôndrias ovuladas e arredondadas (seta fina: →) e filamentos intermediários peri-nuclear (duplas setas finas: ⇨).  
(36.500x).

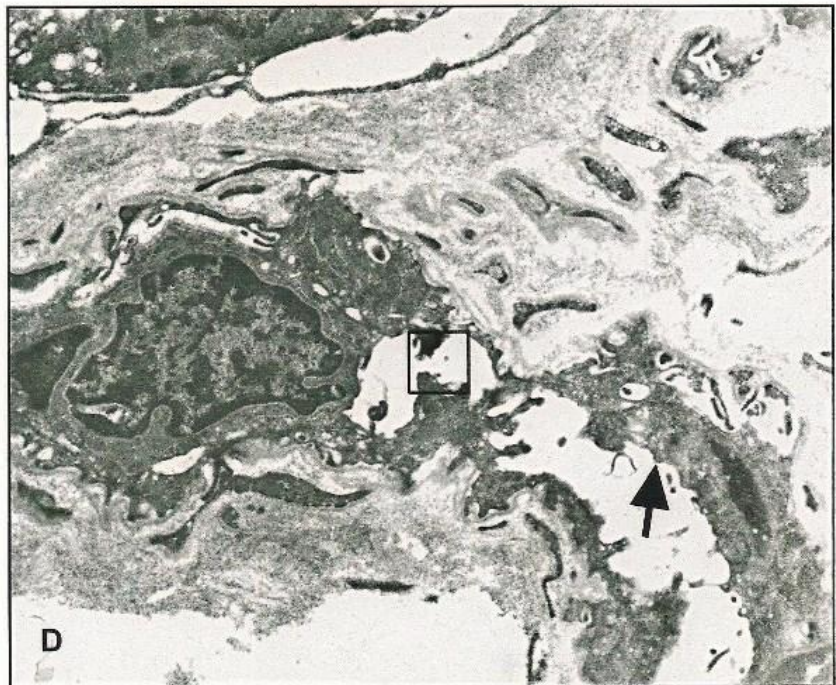
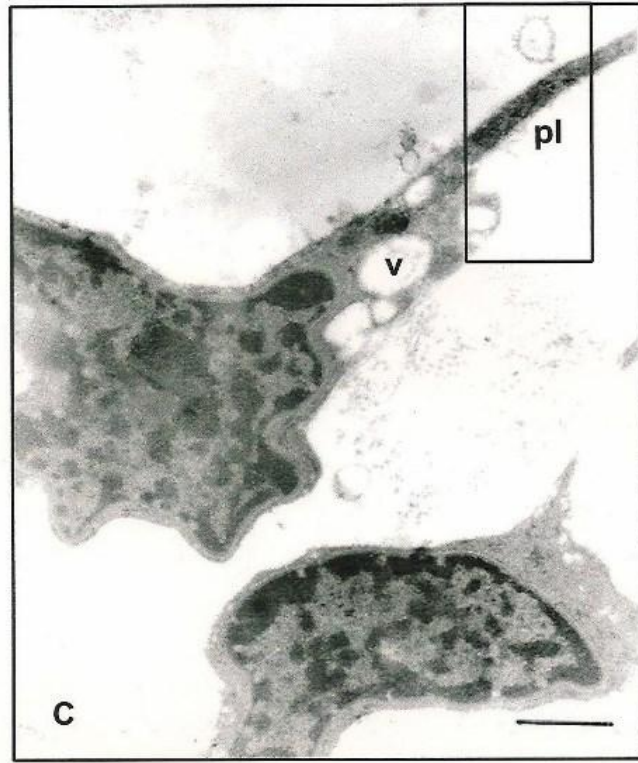
**Quadro B:** Agrupamento de células mononucleares (sinsício) foi observado na derme e estas células apresentaram núcleos endentados, lobulados (N), a eucromatina (eu), mais clara ficou bem separada da heterocromatina (he), mais escura e mais condensada na periferia da membrana nuclear, o que tornou os nucléolos mais evidentes (★) (22.500).

**Quadro C:** Células mononucleares infiltrando a derme apresentaram vacúolos (v) e prolongamentos citoplasmáticos aumentados (pl) (22.000x). Uma estrutura com características morfológicas de uma partícula viral foi demarcada no retângulo e encontra-se aumentada na FIGURA 19 C.

**Quadro D:** Detalhe dos prolongamentos citoplasmáticos de célula mononuclear possivelmente infectada pelo HTLV-1 (seta larga: →) (10.200X).  
Área demarcada aumentada na FIGURA 19 C.







Dentre as alterações citoplasmáticas, foi observado um aumento no número dos prolongamentos citoplasmáticos em várias destas células e um aumento de poliribossomas livres no citoplasma. Foram vistos vacúolos citoplasmáticos (FIGURAS 15 C) que em algumas células foram encontrados em grande número. O aumento de elementos do citoesqueleto e as mitocôndrias com formato ovulado foi observado em várias células. (FIGURAS 15 A),

A matriz extracelular estava bastante alterada e foram observadas áreas de destruição das fibras colágenas e elásticas, principalmente nas papilas dérmicas, próximo à membrana basal e próximo ao infiltrado de células mononucleares. Ao mesmo tempo foram observadas áreas de produção de elastina próximas a estas áreas (FIGURA 16 A e B).

Analisando as fotomicrografias eletrônicas da célula controle positivo MT-2 foram observadas, com um aumento de 45.000x a 80.000x, ultraestruturas que se assemelhavam à estrutura das partículas virais junto à membrana celular. A partícula madura apresentou um nucleóide central condensado, envolvido por uma membrana externa de formato poligonal, e separado desta por uma área lúcida. O tamanho variado das partículas também estava de acordo com o relatado para a partícula viral do HTLV-I, ou seja, de 40 a 200 nm. Estas estruturas, que se assemelhavam com a partícula, foram vistas dentro de vacúolos citoplasmáticos, brotando da membrana celular e próxima à membrana celular (FIGURA 17 A, B e C). Foi observada a presença de um poço de clatrina, representado por uma invaginação com área mais eletrônica-densa na membrana da célula MT-2 (FIGURA 17 A e B), como também documentado por (MIYOSHI *et al.*, 1981; TAFFAREL *et al.*, 1995).

## **FIGURA 16: Áreas de destruição e reconstrução da matriz extracelular.**

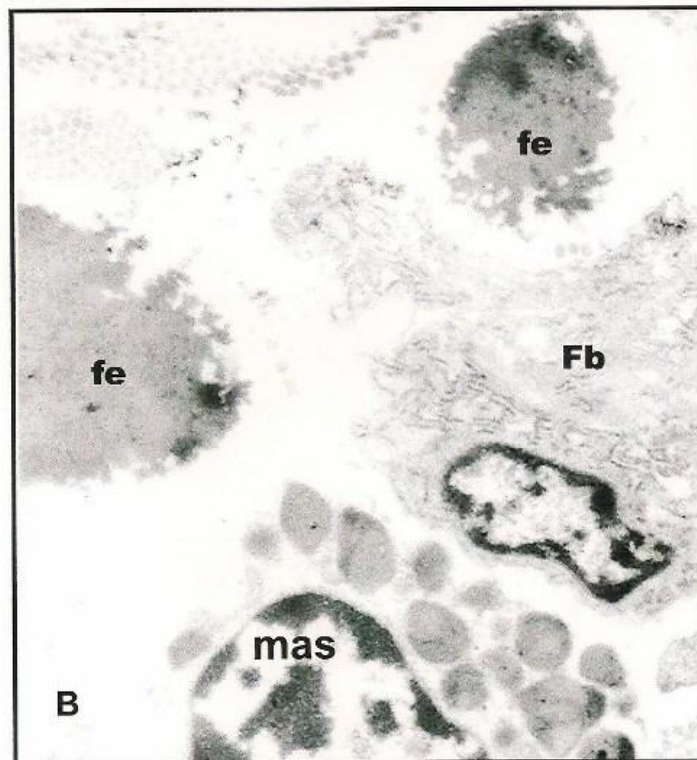
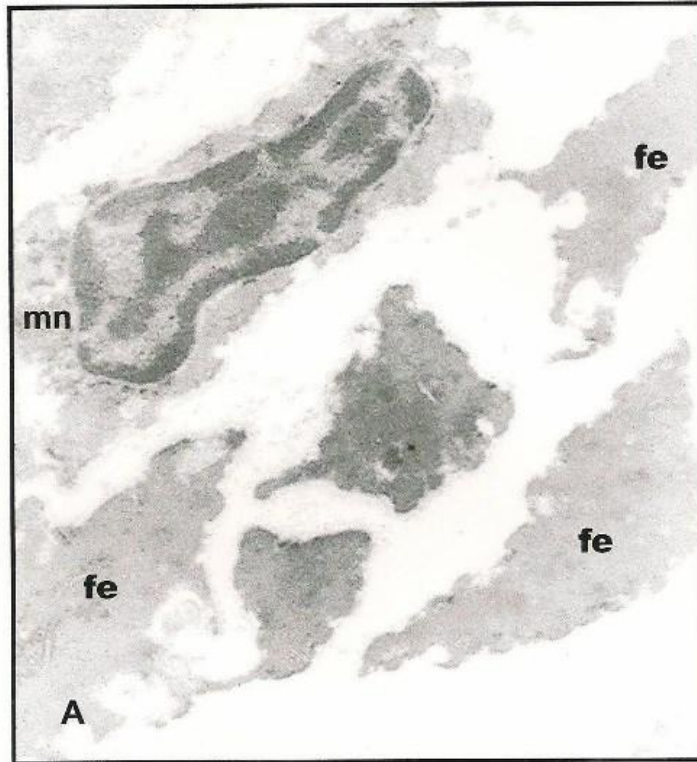
As análises a seguir foram feitas através da técnica de microscopia eletrônica de transmissão realizadas em biópsias de pele de indivíduos com sorologia positiva para o HTLV-1 e que apresentaram lesões compatíveis com dermoepidermite crônica ao exame de HE. Imediatamente após terem sido coletadas, as biópsias foram fixadas em glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4, por 6 horas à temperatura ambiente e pós fixadas em tetróxido de ósmio a 1% (OsO<sub>4</sub> 1%) por 3 h a 4° C (ver item 5.1.1 em Materiais e métodos). Foram analisados os cortes semifinos e selecionadas as áreas do infiltrado inflamatório mononuclear que apresentaram maior celularidade à microscopia óptica.

As fotomicrografias eletrônicas que se seguem e que foram selecionadas para ilustrarem este trabalho, foram obtidas do processamento da biópsia de um indivíduo específico, mas foram representativas para as demais em relação ao item analisado.

**Quadro A:** Fibras elásticas (fe) em reconstrução, célula mononuclear (mn) e espaços vazios na matriz dérmica (20.000x).



**Quadro B:** Fibras elásticas (fe) em reconstrução, fibroblasto (Fb) e mastócito (mas) (14.500x).









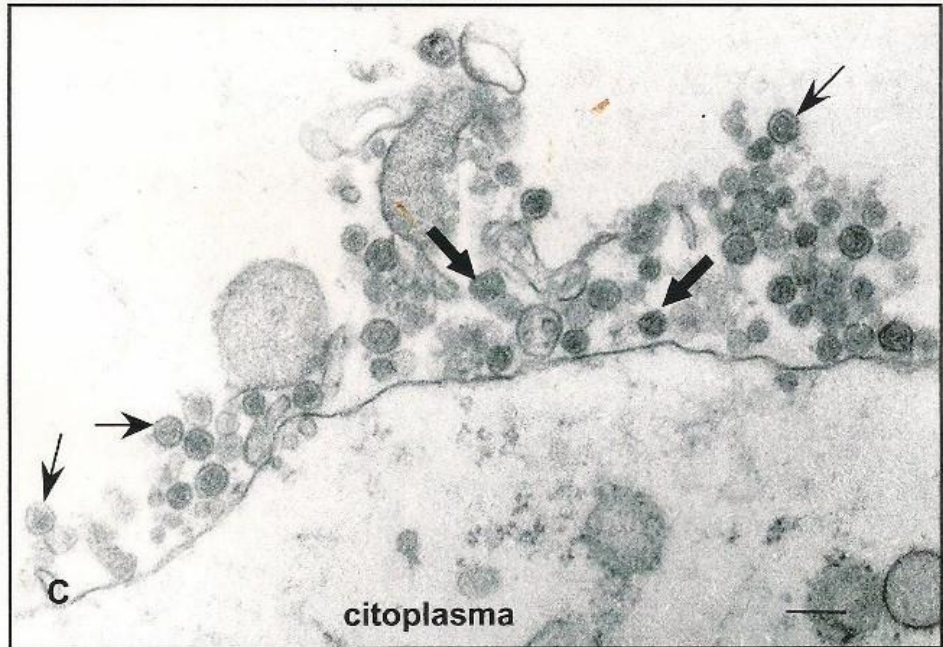
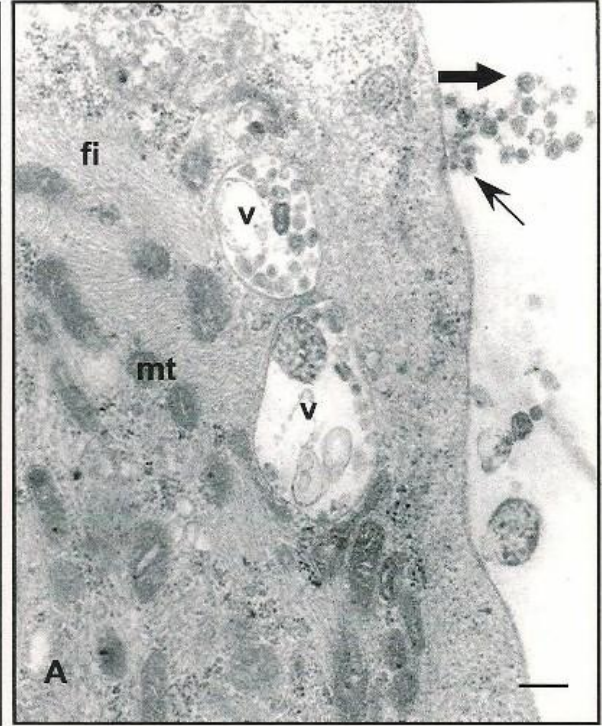
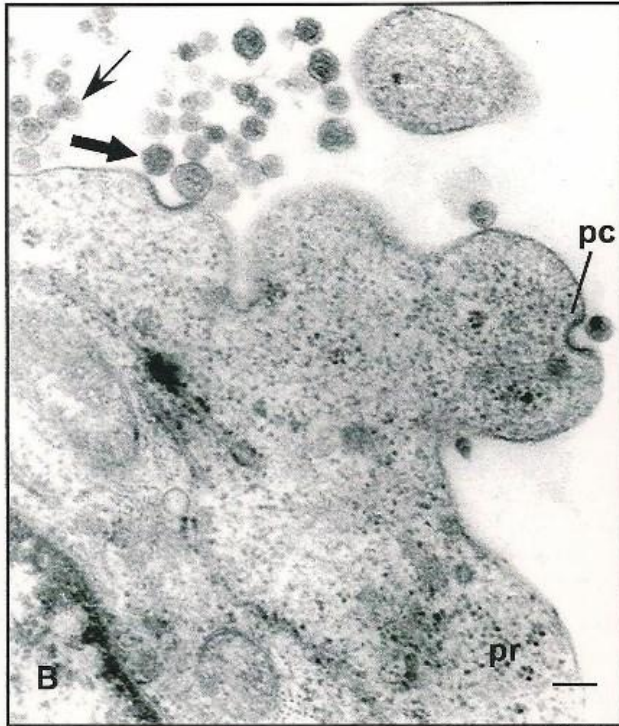
**FIGURA 17: Características morfológicas ultraestruturais das partículas virais do HTLV-1, produzidas por célula MT-2 (utilizada como controle positivo) *in vitro*.**

A célula de linhagem MT-2, proveniente de cordão umbilical é uma célula transformada pelo HTLV-1 após co-cultivo com uma célula infectada proveniente de um paciente com Leucemia/Linfoma de células T do Adulto (ATL). Depois de cultivada em meio RPMI com 10 % de SFB e antibióticos, durante 2 meses, foi realizado o processamento destas células pela técnica de microscopia eletrônica de transmissão da maneira convencional (ver item 5.1.3 em Materiais e métodos).

**Quadro A:** Partículas virais maduras ( seta fina: ) e partículas virais imaturas (seta larga: ) , vacúolos (v), mitocôndrias (mt) e filamentos intermediários (fi) ( barra = 300 nm , 32.000x)

**Quadro B:** Partículas virais maduras (seta fina: ) partículas virais imaturas (seta larga: ) , polirribossoma (pr) e poço de clatrina (pc) (barra = 200 nm, 42.000x)

**Quadro C:** Partículas virais maduras (seta fina: ) e partícula viral imatura (seta larga: ) (barra = 100 nm, 80.000x)



Todas as alterações morfológicas ultraestruturais descritas acima em biópsias de pele lesadas analisadas foram compiladas nas tabelas abaixo (TABELAS 5 e 6).

**TABELA 5:** Alterações morfológicas ultraestruturais na epiderme.

Itens analisados	Epiderme: amostras analisadas									
	25	28	29	60	62	63	64	65	68	pf
camada da epiderme aumentada	++	+	+	++	++	+	+	+	+	+
camada de queratina aumentada	++	+	ni	++	++	+	ni	ni	+	ni
destruição da membrana basal	++	-	+	++	++	+	+	+	+	-
migração de células mononucleares	++	+	+	++	++	+	+	+	+	+
espaços intercelulares aumentados	++	+	-	++	++	+	+	+	+	-
destruição de desmossomos	+	-	-	++	++	+	-	-	-	-
ultraestrutura queratinócitos alterada	+	-	-	++	++	++	-	-	-	-

+: presença aumentada, ++: presença muito aumentada, -: ausência, ni: não identificada.



**TABELA 6:** Alterações morfológicas ultraestruturais na derme.

Itens analisados	Derme: amostras analisadas									
	25	28	29	60	62	63	64	65	68	pf
infiltração células mononucleares	+	++	+	++	++	+	++	++	++	+
ultraestrutura vasos alterada	+	+	nfv	++	++ *	+	++	++	++	+
ultraestrutura células monocíticas e fagocítica alterada	+	++	+	++	++	+	++	++	++	+
degranulação de mastócitos	nfv	+	nfv	++	++	++	+	++	+	nfv
ultraestrutura células linfóide alterada	+	++	+	++	++	+	++	++	++	+
ultraestrutura fibroblasto alterada	nfv	+	nfv	++	++	+	++	++	++	+
áreas de destruição e reconstrução da matriz	+	+	+	++	++	+	++	++	++	nfv

+: presença aumentada, ++: presença muito aumentada, nfv: não foram visualizadas alterações,

\*: hemácias extravasando para a derme.

Observando a tabela 5 verificamos que as amostras 25, 60, 62 e 63 (análise feita no sentido vertical) apresentaram todas as alterações morfológicas analisadas na epiderme e num grau muito maior do que nas outras amostras. As alterações morfológicas que estiveram

presentes em todas as amostras (análise feita no sentido horizontal) foram: a) camada da epiderme aumentada e b) migração de células mononucleares.

Quanto à tabela 6, as amostras 28, 60, 62, 63, 64, 65 e 68 (análise feita no sentido vertical) apresentaram todas as alterações morfológicas analisadas na derme, sendo que nas amostras 60, 62 e 65 elas foram vistas em maior grau. Quando fazemos a análise no sentido horizontal, verificamos que a infiltração de células mononucleares foi um achado comum à todas as amostras e que tanto a ultraestrutura das células monocíticas e fagocíticas quanto a ultraestrutura das células da série linfóide estavam bem alteradas.

Finalmente analisando os cortes ultrafinos das biópsias de pele lesadas com aumentos de 40.000x a 50.000x foram vistas algumas partículas que também se assemelhavam com a ultraestrutura da partícula viral tanto pelas características morfológicas quanto pelo tamanho, conforme descrito por VITAL *et al.* (1993) e KUBOTA *et al.* (1995). (FIGURAS 18, 19 e 20). Na maioria das amostras estas partículas foram vistas brotando esporadicamente da membrana de células com características morfológicas ultraestruturais que se assemelhavam com células da linhagem linfóide, porém também com características de células ativadas, como descrito acima (FIGURA 15 C e 19B). Estas partículas também foram vistas brotando da membrana celular de células com características morfológicas ultraestruturais de um fibrócito ativado, com o retículo endoplasmático rugoso bem aumentado. Próximo a esta célula também foram vistas partículas reunidas entremeadas por restos celulares, conforme documentado por POIEZ *et al.* (1980) (FIGURA 18 A, B, C e 19 A). Um maior número de partículas foi visto brotando e próximo à membrana de células com características de células mais jovens, porém ativadas. Estas células apresentaram a cromatina com áreas mais claras de eucromatina no centro e a heterocromatina, mais condensada, na periferia do núcleo. O núcleo estava aumentado, com nítida visualização do nucléolo, também aumentado e o citoplasma repleto de ribossomos aderidos a um retículo endoplasmático dilatado e anguloso, algumas mitocôndrias e escassos e tênues microfilamentos no citoplasma que projetava prolongamentos na matriz da derme. Estas características ultraestruturais indicaram que estas células poderiam ser classificadas como sendo fibroblastos (FIGURAS 20 A, B, C e D).

Em biópsias de pele normal de indivíduos controle negativo, não foram observadas nenhuma das alterações morfológicas ultraestruturais relatadas acima com um aumento de 45.000x. Tanto a derme quanto a epiderme estavam íntegras, assim como também a membrana basal. As estruturas de adesão entre um queratinócito e outro, os desmossomas, e entre os queratinócitos e a membrana basal e matriz extracelular, os hemidesmossomas,

estavam íntegros. Raras células mononucleares foram vistas na derme e nenhuma na epiderme. As células mononucleares observadas apresentaram tamanho menor, em torno de 7 a 8  $\mu\text{m}$ . Não foram vistos prolongamentos citoplasmáticos aumentados e o núcleo mostrou um padrão de cromatina normal, com a eucromatina e a heterocromatina dispersas uniformemente no núcleo. Tampouco foram vistas estruturas que se assemelhavam às partículas virais.

Todos estes resultados foram compilados, relacionados e discutidos no ítem VI. 1.

**FIGURA 18: Célula com características morfológicas ultraestruturais de um fibrócito ativado produzindo partículas com características morfológicas ultraestruturais de partículas virais do HTLV-1 na derme lesada de indivíduo com sorologia positiva para o HTLV-1.**

As análises a seguir foram feitas através da técnica de microscopia eletrônica de transmissão realizadas em biópsias de pele de indivíduos com sorologia positiva para o HTLV-1 e que apresentaram lesões compatíveis com dermoepidermite crônica ao exame de HE. Imediatamente após terem sido coletadas, as biópsias foram fixadas em glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4, por 6 horas à temperatura ambiente e pós fixadas em tetróxido de ósmio a 1% (OsO<sub>4</sub> 1%) por 3 h a 4° C (ver item 5.1.1 em Materiais e métodos). Foram analisados os cortes semifinos e selecionadas as áreas do infiltrado inflamatório mononuclear que apresentaram maior celularidade à microscopia óptica.

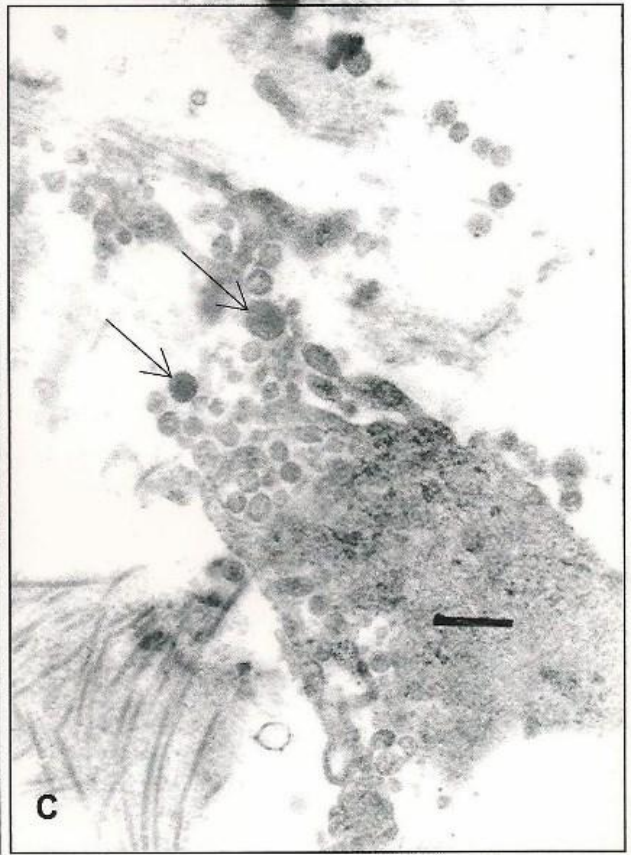
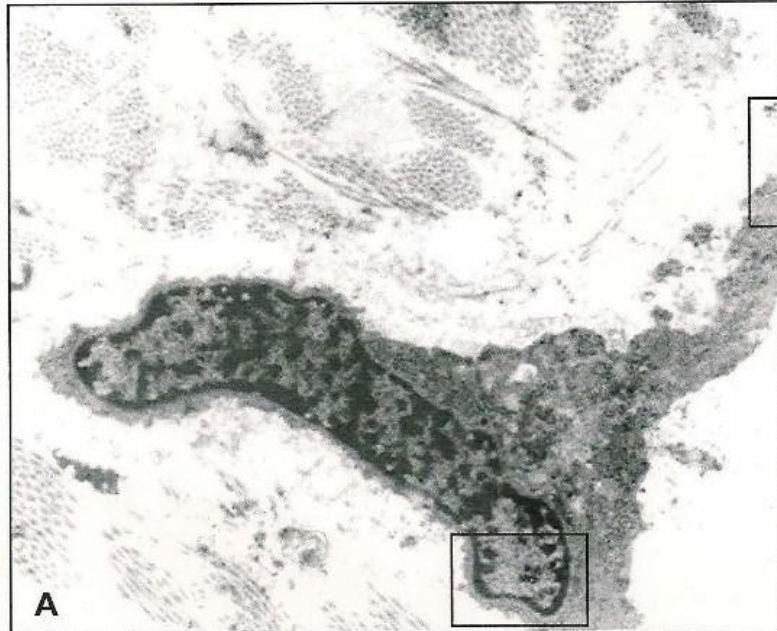
As fotomicrografias eletrônicas que se seguem e que foram selecionadas para ilustrarem este trabalho, foram obtidas do processamento da biópsia de um indivíduo específico, mas foram representativas para as demais em relação ao item analisado.

**Quadro A:** Fibrócito na derme. Região demarcada pelo retângulo na parte inferior do quadro encontra-se aumentada em B e a região demarcada na lateral direita do quadro, encontra-se aumentada em C (17.000x).

**Quadro B:** Provável partícula viral brotando da membrana celular do fibrócito.

Partícula viral (seta fina: →), retículo endoplasmático rugoso aumentado (rer), núcleo (N). (barra = 200 nm, 43.000x).

**Quadro C:** Prolongamento citoplasmático do fibrócito produzindo prováveis partículas virais ( setas finas: → ) (20.000x).



**FIGURA 19: Partícula com características morfológicas ultraestruturais da partícula do HTLV-1 sendo liberada para o meio externo na derme de indivíduos com sorologia positiva para o HTLV-1.**

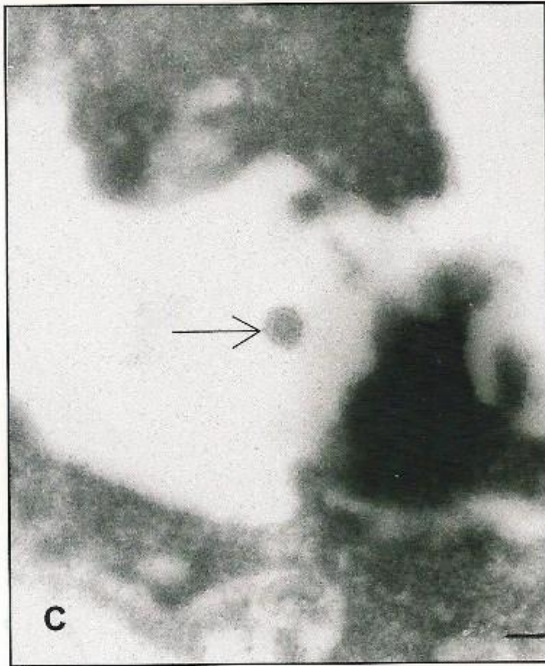
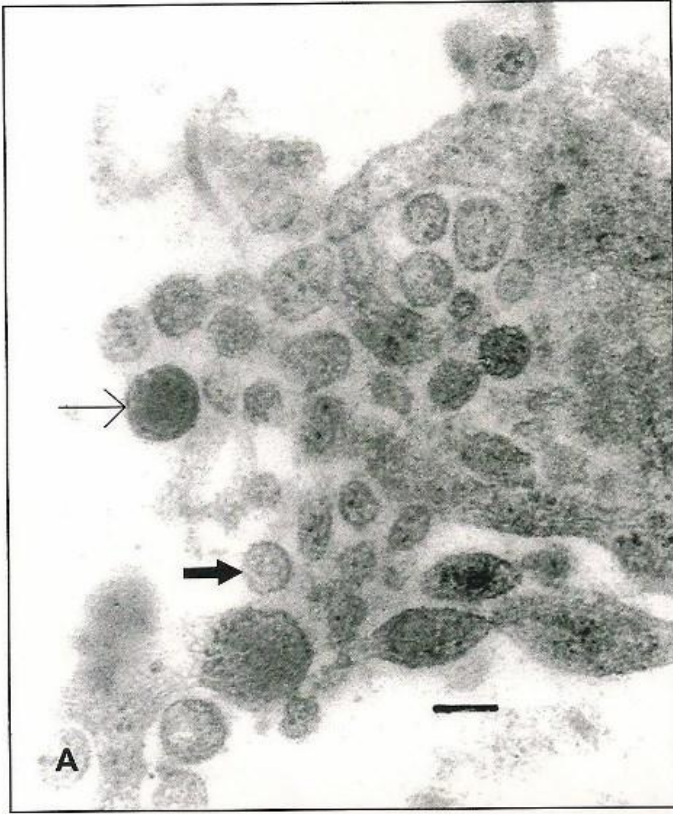
As análises a seguir foram feitas através da técnica de microscopia eletrônica de transmissão realizadas em biópsias de pele de indivíduos com sorologia positiva para o HTLV-1 e que apresentaram lesões compatíveis com dermoepidermite crônica ao exame de HE. Imediatamente após terem sido coletadas, as biópsias foram fixadas em glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4, por 6 horas à temperatura ambiente e pós fixadas em tetróxido de ôsmio a 1% (OsO<sub>4</sub> 1%) por 3 h a 4° C (ver item 5.1.1 em Materiais e métodos). Foram analisados os cortes semifinos e selecionadas as áreas do infiltrado inflamatório mononuclear que apresentaram maior celularidade à microscopia óptica.

As fotomicrografias eletrônicas que se seguem e que foram selecionadas para ilustrarem este trabalho, foram obtidas do processamento da biópsia de um indivíduo específico, mas foram representativas para as demais em relação ao item analisado.

**Quadro A:** Foram observadas prováveis partículas virais sendo liberadas para o meio externo através do prolongamento citoplasmático do fibrócito demarcada na lateral direita do quadro 18 A ; partícula viral madura (seta fina: →) e partícula viral imatura (seta larga: →) (barra = 200 nm, 50.700x).

**Quadro B:** Área aumentada da região demarcada na figura 15 C, com provável partícula viral madura (seta fina: →) com espículas virais, próxima ao prolongamento da célula mononuclear (barra = 400 nm, 42.800x).

**Quadro C:** Provável partícula viral do HTLV-1 próxima aos prolongamentos citoplasmáticos de célula mononuclear (seta fina: →) (barra = 100 nm, 80.000x).



**FIGURA 20: Partícula com características morfológicas ultraestruturais da partícula do HTLV-1, sendo produzida por uma célula com características morfológicas ultraestruturais de um fibroblasto ativado.**

As análises a seguir foram feitas através da técnica de microscopia eletrônica de transmissão realizadas em biópsias de pele de indivíduos com sorologia positiva para o HTLV-1 e que apresentaram lesões compatíveis com dermoepidermite crônica ao exame de HE. Imediatamente após terem sido coletadas, as biópsias foram fixadas em glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4, por 6 horas à temperatura ambiente e pós fixadas em tetróxido de ósmio a 1% (OsO<sub>4</sub> 1%) por 3 h a 4° C (ver item 5.1.1 em Materiais e métodos). Foram analisados os cortes semifinos e selecionadas as áreas do infiltrado inflamatório mononuclear que apresentaram maior celularidade à microscopia óptica.

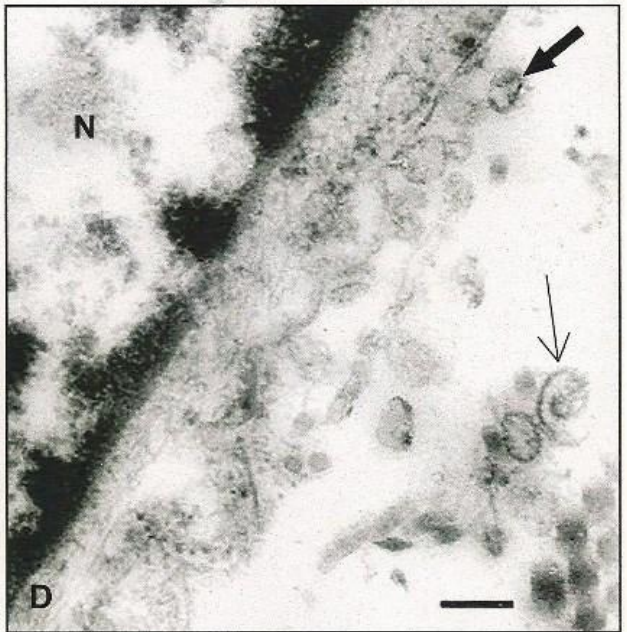
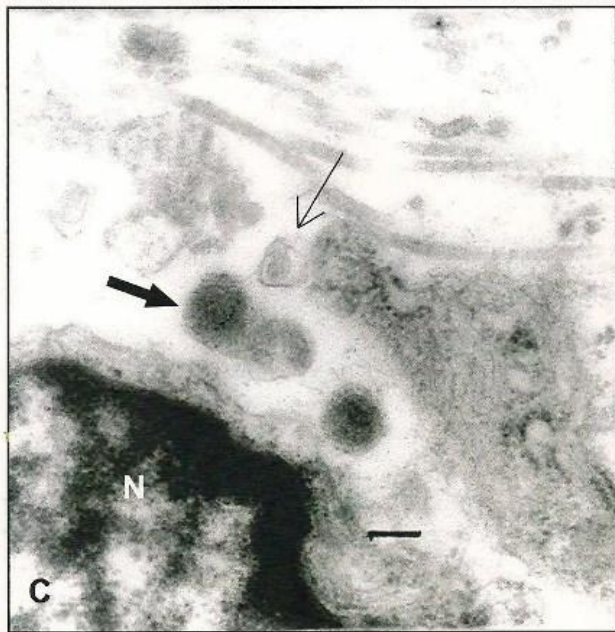
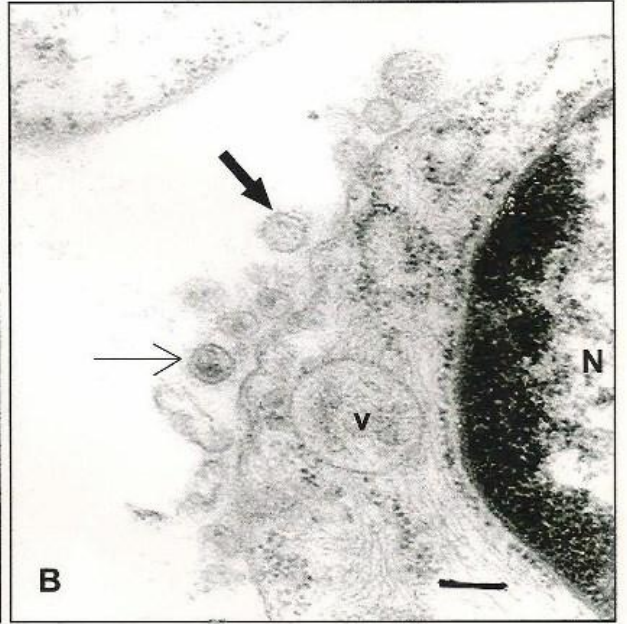
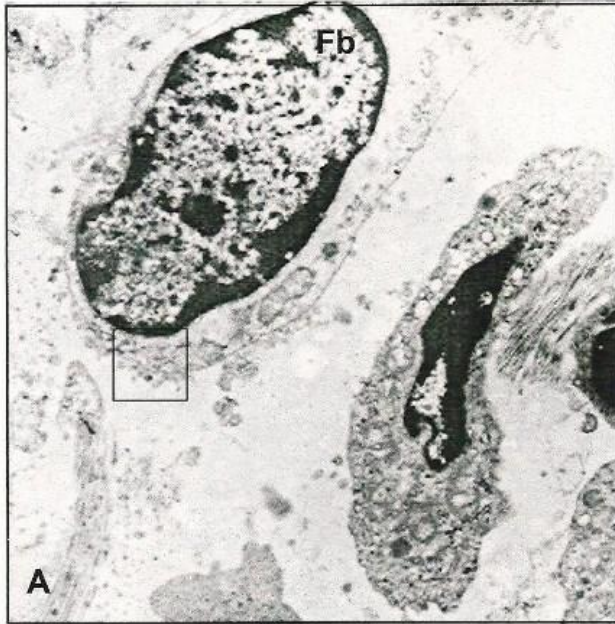
As fotomicrografias eletrônicas que se seguem e que foram selecionadas para ilustrarem este trabalho foram obtidas do processamento da biópsia de um indivíduo específico, mas foram representativas para as demais em relação ao item analisado.

**Quadro A:** Fibroblasto (Fb) produzindo prováveis partículas virais, com região demarcada aumentada em B (17.000x).

**Quadro B:** Área aumentada da região demarcada em A, apresentou vacúolo (v), núcleo (N) e prováveis partículas virais maduras (seta fina: →) e imaturas (seta larga: →) que brotaram da membrana celular (barra = 200 nm, 42.800x).

**Quadros C e D:** Prováveis partículas virais maduras (seta fina: →) e imaturas (seta larga: →) que brotaram da membrana celular (barras = 200 nm, 42.800x).





## **2. Controle da extração e quantificação do DNA obtido das biópsias de pele**

Após quantificação, os valores de DNA extraídos dos fragmentos de pele, variaram de 300 ng a 1µg/µl, exceto para a amostra 25 da qual foi obtido menos de 200 ng/µl. A reação de PCR para o gene HLA-DQ $\alpha$  amplificou um fragmento esperado de 242 pb (FIGURA 21, canaletas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e10) a partir de todas as biópsias de pele coletadas.

## **3. Detecção do HTLV-I nas biópsias de pele através da “nested” PCR**

Em nove das dez amostras de pele coletadas (amostras 28, 29, 60, 62, 63, 64, 65, 68 e PF) foram amplificados fragmentos do gene do env através da “nested” PCR. Os produtos amplificados na reação de PCR demonstraram bandas do tamanho esperado de 312 pb no gel de agarose a 1,8% (FIGURA 22, canaleta 1 a 7). O mesmo padrão de bandas foi visto para o produto da PCR com o DNA extraído da célula controle positivo MT-2 (FIGURA 22, canaleta 9).

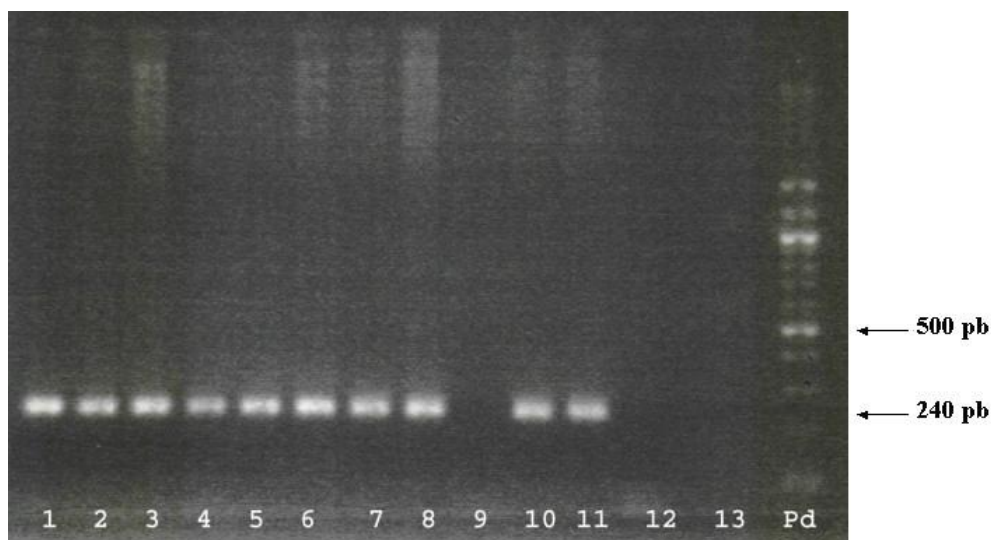
A partir do DNA extraído da amostra 25 não foi detectada nenhuma banda de amplificação (FIGURA 22, canaleta 2).

## **4. Seleção dos clones para seqüenciamento**

Os produtos da PCR realizada com 1 µl da cultura de bactéria contendo o plasmídeo recombinante e com os iniciadores específicos para o HTLV-1 foram fracionados em gel de agarose 1,0% p/v para verificar a presença do inserto esperado de 312pb. Os clones selecionados para o seqüenciamento apresentaram este fragmento de 312 pb no gel de agarose, correspondente ao amplicon esperado (FIGURA 23).

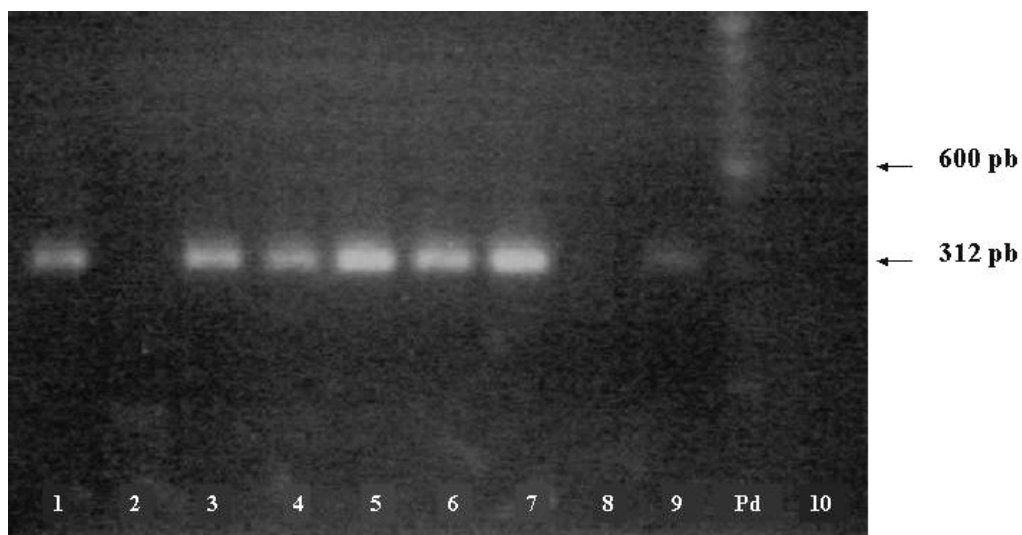
Para as amostras 29 e 60, não foi conseguido DNA suficiente para a clonagem após a purificação pelo método da PCR preps.

Os clones selecionados foram submetidos à extração e posterior quantificação do DNA plasmidial (FIGURA 24), para se proceder ao seqüenciamento automático.

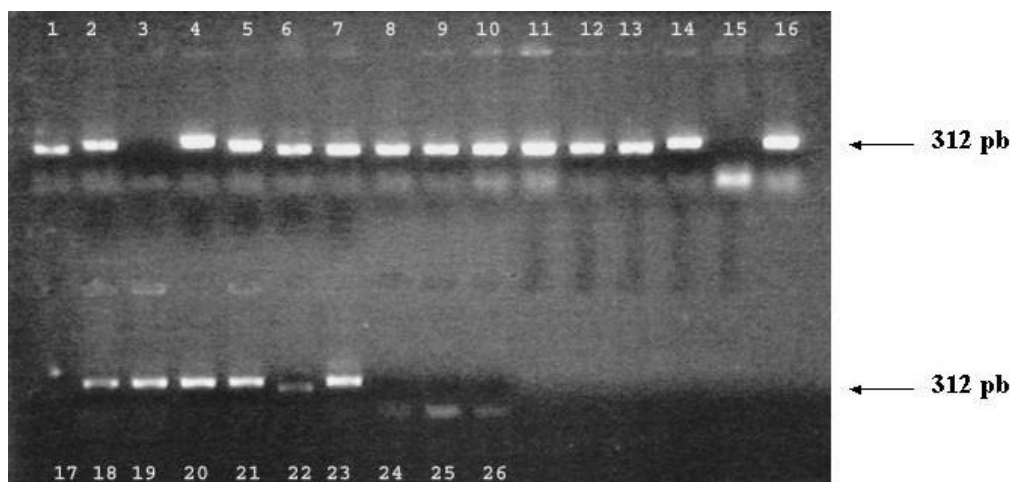


**FIGURA 21: Amplificação da região codificadora do gene HLA-DQ $\alpha$  através da PCR.**

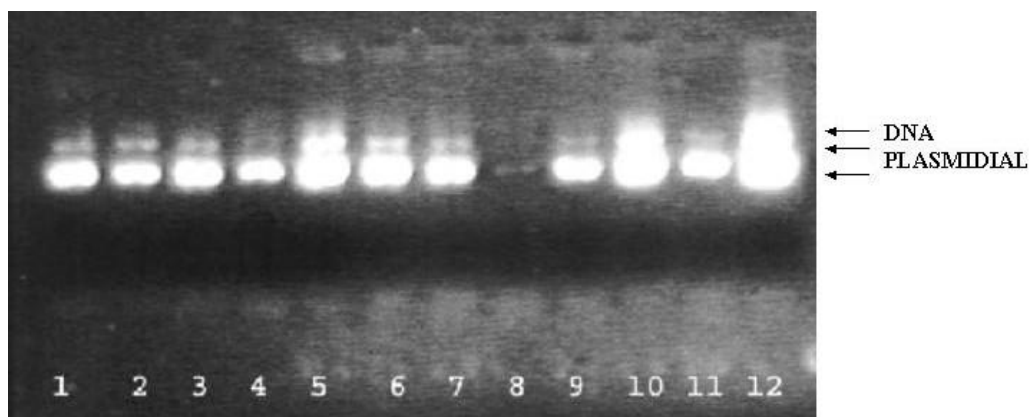
O DNA total extraído dos fragmentos de pele foi utilizado como molde para a amplificação por PCR da região codificadora do gene HLA-DQ $\alpha$ . Sete  $\mu$ l dos produtos da PCR de cada amostra foram fracionados em gel de agarose 1,8% corado com brometo de etídio. Canaletas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 10, amostras clínicas (respectivamente pele lesada: 25, 28, 29, 60, 62, 63, 64, 65, 68 e PF); canaleta 9, vaga; canaleta 11, controle positivo (pele de indivíduo submetido à cirurgia reparadora de mama); canaleta 12, controle negativo (DNA não humano); canaleta 13, controle negativo da reação (sem DNA); canaleta Pd, padrão de tamanho molecular utilizando marcador de 100 pb.



**FIGURA 22: Amplificação da região codificadora de parte do gene *env* do HTLV-1 através da “nested” PCR.** Dois  $\mu\text{l}$  do produto da reação da PCR externa realizada com o DNA extraído dos fragmentos de pele foram utilizados como molde para a amplificação da região codificadora de parte do gene *env* do HTLV-1. Sete  $\mu\text{l}$  dos produtos da PCR de cada amostra foram fracionados em gel de agarose 1,8% corado com brometo de etídio. Canaletas de 1 a 7, amostras clínicas (respectivamente peles lesadas: 28, 25, 29, 60, 65, 68, e PF); canaleta 8, controle negativo da pele (DNA de indivíduo submetido à cirurgia plástica reparadora); canaleta 9, controle positivo (DNA extraído da célula MT-2); canaleta 10, controle negativo da reação (sem DNA) e canaleta Pd, padrão de tamanho molecular utilizando marcador de 100 pb.



**FIGURA 23: Amplificação do inserto de 312pb presente em clones recombinantes de *Escherichia coli* competente.** Um  $\mu$ l de cultura de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  foi utilizado para a amplificação do inserto correspondente à região codificadora de parte do gene *env* do HTLV-1 através dos iniciadores específicos da PCR interna para o HTLV-1. Sete  $\mu$ l dos produtos da PCR de cada clone foram fracionados em gel de agarose 1,8% corado com brometo de etídio. Canaletas 1, 2, 3, 4: clones correspondentes à amostra 28; canaletas 5 e 6: clones correspondente à amostra 62; canaletas 7 e 8: clones correspondentes à amostra 63; canaletas 9 e 10: clones correspondentes à amostra 64; canaletas 11 e 12: clones correspondentes à amostra 65; canaletas 13; 14 e 15: clones correspondentes à amostra 68; canaletas 16, 17, 18 e 19: clones correspondentes à amostra PF; canaletas 20, 21, 22 23: controle positivo (DNA de célula controle MT-2); canaletas 24, 25: controles negativos ((DNA de indivíduo submetido à cirurgia plástica reparadora); canaleta 26: controle negativo da PCR (sem DNA).

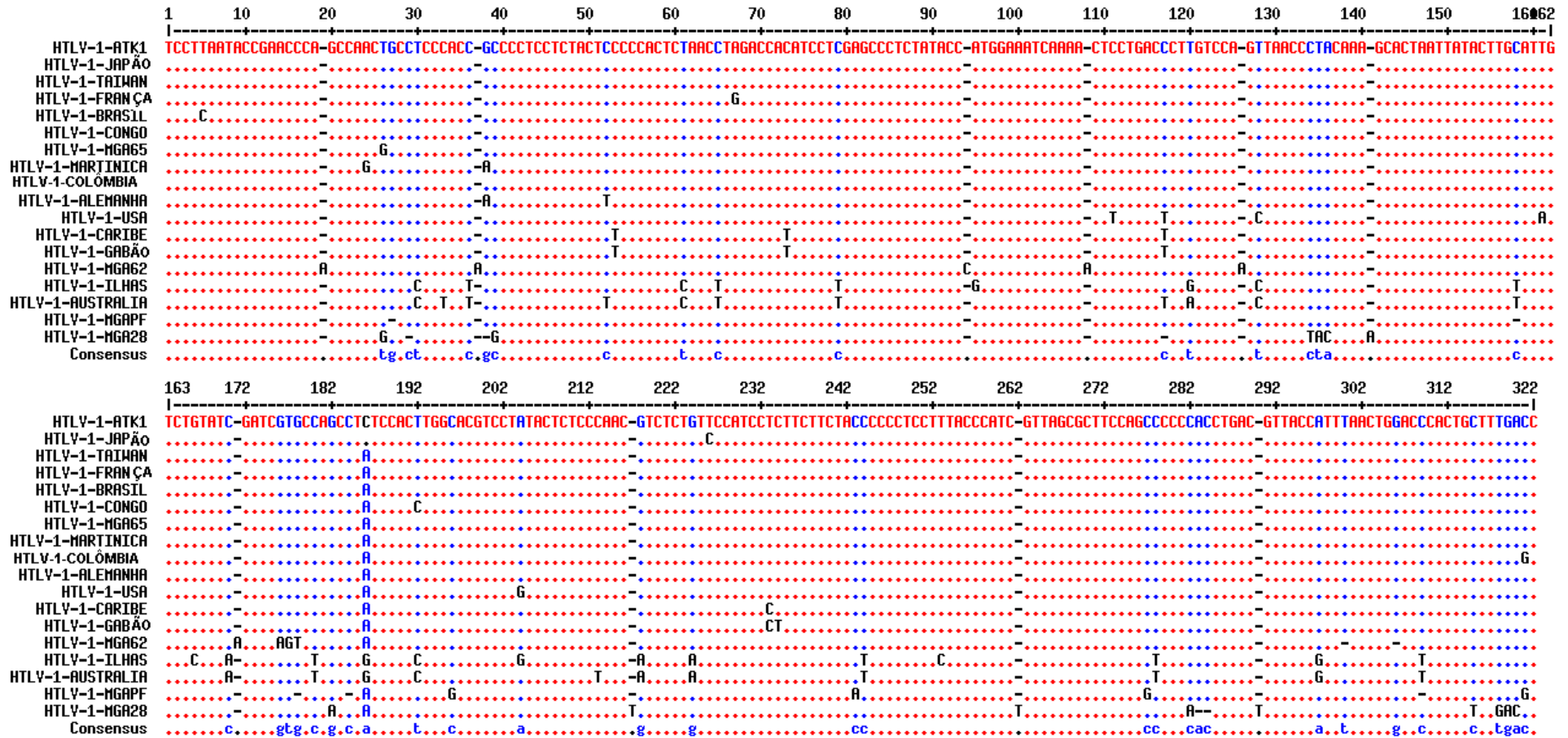


**FIGURA 24: Análise eletroforética em gel de agarose 1,0% para quantificação do DNA plasmidial após extração pelo sistema Wizard® Plus SV Minipreps.** Após a extração do DNA plasmidial dos clones que continham o inserto de 312 pb, foi feito o seu fracionamento em gel de agarose a 1,0% p/v.

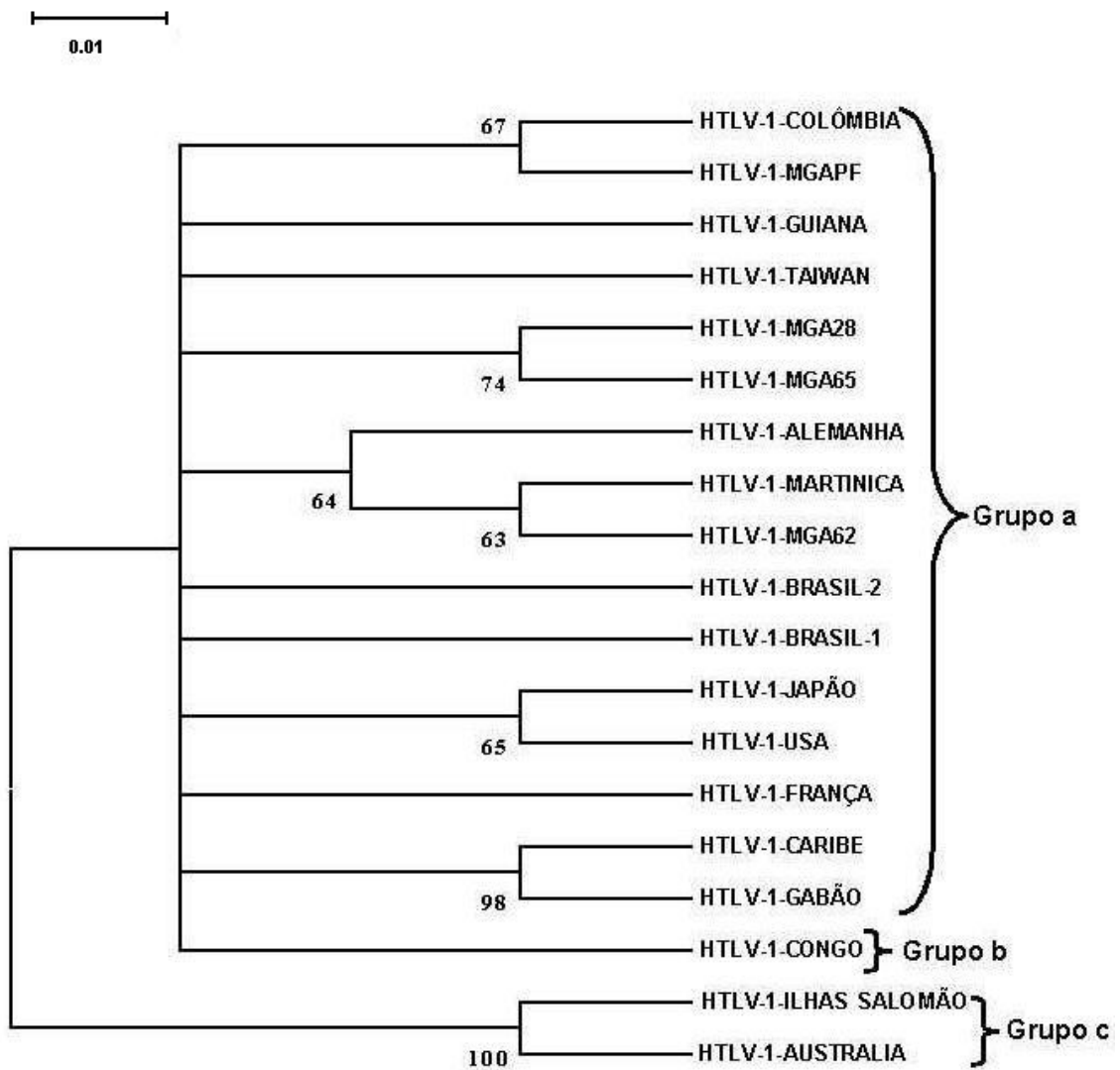
## 5. Seqüências de nucleotídeos, alinhamento, e análise filogenética

As seqüências de nucleotídeos resultantes do seqüenciamento do DNA a partir dos clones obtidos das amostras clínicas n.ºs. 28, 62, 65 e PF, foram alinhadas com seqüências do banco de dados utilizando o programa Mega 3.1, apresentando similaridade com o vírus HTLV-1 entre 96 e 100%, quando comparadas com as seqüências de outros isolados virais depositados no “GenBank”, entre eles a seqüência do protótipo ATK-1. O programa Multalin (<http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>) foi usado para gerar o respectivo alinhamento (FIGURA 25). O resultado deste alinhamento permitiu o agrupamento das amostras de HTLV-1 isoladas neste trabalho dentro grupo cosmopolita **a**. Os parâmetros utilizados para a construção da árvore filogenética (FIGURA 26) foram: o algoritmo de “Neighbor-joining” e o modelo de substituição de nucleotídeos de Kimura 2, implementados no programa Mega (KUMAR *et al.*, 2001).





**FIGURA 25** - Alinhamento entre as seqüências de nucleotídeos de parte do gene *env* (312pb) de quatro amostras de HTLV-1 isoladas durante este trabalho com 15 seqüências do HTLV-1 de diferentes regiões geográficas, depositadas no “GenBank”. Alinhamento feito com o auxílio do programa Multalin (<http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>). Os pontos representam as identidades entre os nucleotídeos, e os traços, inserções.



**FIGURA 26** - Árvore filogenética consenso construída com base no seqüenciamento parcial do fragmento de 312bp do gene *env* de quatro amostras de HTLV-1 isoladas durante este trabalho e com 15 seqüências do HTLV-1 de diferentes regiões geográficas, depositadas no “GenBank”. Para a construção da árvore foi usado o método Neighbor-joining com Bootstrap de 1000 réplicas (indicado em cada um dos principais nódulos). A escala bar representa 0,01 de substituições por sítio.



## VI. DISCUSSÃO

### 1. Microscopia Eletrônica

Para este trabalho foram selecionados indivíduos com sorologia positiva para o HTLV-1 e com queixa dermatológica, porém sem nenhuma outra sintomatologia de doença associada ao HTLV-1. A escolha deste perfil foi feita na expectativa de aumentar as possibilidades de visualização de partículas virais através da microscopia eletrônica e de fornecer dados que poderiam levar a uma possível associação entre a presença deste vírus na pele dos indivíduos com alguma manifestação dermatológica específica.

A infiltração de células mononucleares foi um achado comum na pele lesada de indivíduos soropositivos oligossintomáticos para o HTLV-1, observada tanto na microscopia ótica quanto na microscopia eletrônica (FIGURAS 12 A e B; TABELAS 5 e 6).

O linfócito T CD4<sup>+</sup> é uma célula alvo do HTLV-1 e uma sub-população destes linfócitos T tem grande afinidade de migração para a pele. Como um grande número de células mononucleares foi encontrado infiltrando a pele (FIGURAS 15 A, B, C e D), é de se esperar que parte destas células sejam linfócitos T CD4<sup>+</sup>. A detecção do provírus de HTLV-1 através do método da PCR em praticamente todas as peles coletadas suporta esta hipótese.

A proteína transativadora **tax** produzida pelo HTLV-1 induz vários genes celulares incluindo aqueles que codificam para várias moléculas de adesão e várias quimiocinas e citocinas (YOSHIE *et al.*, 2002). De acordo com uma revisão recente de GRANT *et al.* (2002), **tax** pode atuar como uma citocina extracelular que se liga a um receptor ainda desconhecido na célula alvo e induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  em macrófagos. De acordo com MORI, N. *et al.* 2002, a proteína **tax** também ativa a produção de metaloproteinases-9 pelos linfócitos T e estas proteinases promoveriam a destruição da matriz extracelular e da membrana basal dos órgãos infectados, como os linfonodos, o baço, o fígado e a pele, contribuindo para a disseminação das células transformadas. Sendo assim, as alterações morfológicas observadas na derme e epiderme (FIGURAS 12 A e B; TABELAS 5 e 6), tais como: a destruição de áreas da matriz extracelular na derme, principalmente nas papilas dérmicas próximas a epiderme; a destruição da membrana basal em áreas em que células mononucleares foram vistas invadindo a epiderme; e as alterações observadas nas células endoteliais (FIGURA 13 B), podem ser

devidas à liberação destas substâncias pelos linfócitos transformados e pelas células que foram ativadas por eles.

Dentre as alterações morfológicas ultraestruturais observadas nas células mononucleares, o aspecto endentado e lobulado do núcleo (FIGURAS 15 B e C), na verdade é o resultado de invaginações do citoplasma para dentro do núcleo da célula. Este tipo de alteração encontra-se bem descrito nos trabalhos de ZUCHER-FRANKLIN *et al.*, 1994 em que ela denomina estas células como “células de Sézary”. Provavelmente estas invaginações ocorrem com a finalidade de aumentar a área de contato da membrana nuclear com o citoplasma da célula para facilitar o transporte de proteínas e dos mRNAs, por exemplo. Tanto na célula transformada pelo HTLV-1 quanto na célula ativada por **tax**, a síntese de proteínas se encontra aumentada e, portanto, está havendo uma maior produção de mRNAs que são transportados do núcleo para o citoplasma. A membrana nuclear irregular e o padrão de rearranjo da cromatina também endossam esta hipótese ( FIGURAS 15 B e C).

O aumento dos polirribossomas livres observados no citoplasma das células mononucleares (FIGURAS 15 A e B), presentes no infiltrado, dizem respeito a um aumento da síntese de proteínas.

A área do núcleo em que a cromatina está mais frouxa, a eucromatina, é uma área de intensa atividade de transcrição nuclear e como foi relatado acima, **tax** é uma proteína que regula a transcrição dos genes virais e de vários genes celulares e, portanto, está induzindo estas células a produzirem as proteínas correspondentes aos genes ativados.

Também nas células com características morfológicas ultraestruturais de fibroblastos foram observadas áreas de cromatina mais frouxa, nucléolo evidente e no citoplasma, presença aumentada de retículo endoplasmático rugoso (FIGURA 18 B e 20 B e C), que corroboram com a síntese aumentada de proteínas.

Em volta do núcleo, ainda no citoplasma foi observado um aumento dos elementos do citoesqueleto nas células da linhagem linfóide (FIGURA 15 A). Achado semelhante foi documentado por ZUCKER-FRANKLIN *et al.* (1992), que através da imunohistoquímica constatou serem filamentos intermediários de vimentina. A função destes filamentos em células lesionadas seria conter as proteínas lesadas em um compartimento celular para sofrerem posterior proteólise.

Prolongamentos citoplasmáticos em grande número foram observados provavelmente devido a uma estratégia das células para aumentar a sua superfície de contato com outras

células. Somente através da imunohistoquímica com marcadores específicos seria possível determinar o fenótipo destas células.

Como foi visto anteriormente, a infiltração de células mononucleares com sua ultraestrutura alterada, transformadas e/ou ativadas pelo HTLV-1, foi um achado unânime tanto na derme como na epiderme das amostras de pele analisadas. Alterações morfológicas na derme foram mais frequentes e mais intensas do que na epiderme. Presença de fibroblastos com ultraestrutura alterada, foram vistos em 8 das 10 amostras analisadas. As amostras 60 e 62 foram as que apresentaram mais alterações.

Todos os fatos apresentados acima nos levam a supor que a partícula viral do HTLV-1 e/ou partes do seu genoma estão sendo expressos na pele dos indivíduos com sorologia positiva para este vírus. As células mononucleares residentes, as transitórias, as células mononucleares que estariam infiltrando este órgão, bem como os fibroblastos próprios deste tecido seriam os locais mais prováveis desta ocorrência. Assim sendo, as estruturas observadas próximas à membrana celular das células mononucleares e dos fibroblastos, com tamanho e características ultraestruturais compatíveis com aquelas partículas virais observadas próximas ou brotando da membrana celular da célula MT-2, seriam provavelmente partículas virais de HTLV-1 (FIGURAS 18, 19 e 20). Existem raros trabalhos na literatura descrevendo a presença de partículas virais por meio da microscopia eletrônica em células e tecidos “ex vivo”. VITAL *et al.* (1993), descreveram a presença de numerosas estruturas arredondadas dentro de vacúolos citoplasmáticos de células linfomatosas infiltrando um feixe de nervos periféricos na perna de uma paciente com linfoma por HTLV-1. Estas estruturas tinham de 60 nm a 80 nm de diâmetro com um nucleóide central e um envelope com muitas espículas.

Somente através da imunomicroscopia eletrônica, com anticorpos específicos contra proteínas virais do HTLV-1, e anticorpos específicos para os marcadores celulares, seria possível identificar estas partículas como sendo partículas virais do HTLV-1 e concomitantemente identificar qual o fenótipo das células infectadas.

## **2. Caracterização Molecular do HTLV-1**

Em todas as biópsias de pele, tanto dos indivíduos que apresentavam lesão dermatológica quanto dos indivíduos controle negativos, foram amplificados fragmentos do tamanho esperado de 240 pb na reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os

iniciadores específicos de parte da região codificadora do gene *HLA-DQ $\alpha$* . O padrão das bandas que corresponderam aos fragmentos de 240 pb, após fracionamento em gel de agarose, ficou muito nítido. Como este é um gene muito conservado do genoma humano, o fato de ter ocorrido a amplificação do fragmento esperado demonstrou a eficiência e a confiabilidade das técnicas e dos reagentes utilizados na extração do DNA e na PCR.

A amplificação do fragmento do tamanho esperado de 312 pb, que corresponde a parte da região codificadora do gene *env* do HTLV-1, nas PCRs das biópsias de pele (exceto na amostra 25), confirma a presença do HTLV-1 como provírus integrado ao genoma das células infectadas, que tiveram origem ou migraram para a pele dos indivíduos soropositivos para o HTLV-1 com algum tipo de lesão dermatológica. Em todas as reações de PCR foram realizados controles positivos e negativos para assegurar que o fragmento amplificado, era mesmo correspondente ao do amplicon esperado de 312 pb de parte do gene do envelope. As bandas fracionadas ficaram bem nítidas no gel de agarose (FIGURA 22, canaletas 1, 3, 4, 5, 6 e 7). Já na amostra de pele do indivíduo controle negativo não houve amplificação de nenhum fragmento, o que foi verificado pela ausência de bandas após fracionamento em gel de agarose (FIGURA 22, canaleta 8).

As técnicas de extração do DNA genômico das biópsias de peles e das células MT-2 demonstraram ter sido eficientes, tanto para o gene *HLA-DQ $\alpha$*  quanto para o gene *env* do HTLV-1.

A padronização da técnica de “nested” PCR dentro das condições de trabalho deste estudo, também foi bem sucedida (FIGURAS 21 e 22).

Quanto às análises das seqüências obtidas no seqüenciamento, os clones das amostras clínicas n<sup>os</sup> 28, 62, 65 e PF e da célula controle positivo MT-2 foram alinhados com seqüências de isolados do HTLV-1 depositados no “GenBank”. Com o programa Multalin todas estas seqüências foram alinhadas com o protótipo ATK-1 (o primeiro a ter seu genoma seqüenciado), e posteriormente utilizadas para a análise filogenética (FIGURA 26).

O genoma do HTLV-1 é bem conservado sendo que as regiões dos genes da LTR e *env* são as mais variáveis. As seqüências de nucleotídeos de isolados virais da Melanesia mostraram divergência de 8,0% na região do gen *env* quando comparadas com o protótipo japonês ATK-1. A pressão seletiva do sistema imune, afeta mais a região de *env* do que a LTR (MUIRA *et al.*, 1994; SALEMI *et al.*, 1998). Como as mutações acumulam-se de uma maneira proporcional ao tempo e a uma razão equivalente entre os vários isolados virais, uma análise filogenética baseada no método ME-NJ, tanto na região da LTR como do gene *env* nos

fornece dados satisfatórios sobre a epidemiologia do HTLV-1. Através da análise filogenética baseada na região do gene *env*, verifica-se que a topologia das árvores são diferentes comparadas às obtidas da análise na região da LTR, e os valores de “bootstrap” são bem menores. Quanto maior o valor de “bootstrap” maior é a possibilidade dos isolados de um mesmo grupo terem se agrupado de uma forma mais fidedigna (VAN DOOREN *et al.*, 1998). De acordo com a análise das diversas árvores filogenéticas construídas neste estudo, as seqüências de nucleotídeos correspondentes à região de 312 pb do gene *env* dos isolados de HTLV-1 das amostras n°s 28, 62, 65 e PF (indivíduos portadores do HTLV-1) se agruparam dentro do grupo cosmopolita **a** como esperado (FIGURA 26).

O grupo Cosmopolita **a** tem sido o prevalente em todo mundo, independente do estado clínico dos indivíduos infectados (Yamashita *et al.*, 1999). Este fato foi confirmado por SEGURADO *et al.*(2002), que encontrou o sub-grupo cosmopolita A em 73,8% dos portadores e em 89,3% dos pacientes com HAM/TSP, num estudo realizado em São Paulo, Brasil, baseado na região da LTR.

A análise filogenética dos isolados virais baseada na região de *env* mostra-se eficiente para investigar relações entre isolados heterogêneos, que pertencem a diferentes grupos filogenéticos, mas não se mostra tão eficaz quando isolados virais mais homogêneos são analisados. Apesar da análise filogenética baseada na região do gene *env* não ser capaz de dividir todo o grupo Cosmopolita dentro dos quatro subgrupos, uma análise filogenética de quatro novos isolados virais da Argentina baseada na região de *env* demonstrou que pertenciam ao grupo Cosmopolita a, subgrupo A, da mesma forma que os outros isolados da Colômbia, Chile e Brasil, quando comparados com protótipos de cada um destes subgrupos (LIU *et al.*1996; MIURA *et al.*, 1994; YAMASHITA, *et al.*, 1998).

As seqüências analisadas de parte do gene *env* correspondentes às seqüências flanqueadas pelos iniciadores utilizados são bem conservadas entre os isolados do HTLV-1 e, portanto, são uma importante ferramenta de estudo na confecção de uma provável vacina (YANG *et al.*, 1997). Além disto, estes estudos são um componente crítico na montagem de estratégias de tratamento e de manejo e controle de patógenos virais, como o HTLV-1 .

## VII. CONCLUSÃO

- ✓ As técnicas de extração do DNA genômico através do lisado das peles lesadas e das células MT-2 foram eficientes para o emprego na PCR para o HTLV-1, dentro das condições descritas neste estudo.
- ✓ A técnica de PCR “nested” para o HTLV-1 ficou bem estabelecida e apresentou resultados satisfatórios e reproduzíveis para as condições descritas neste estudo.
- ✓ O HTLV-1 estava presente, na forma de provírus, na pele lesada dos indivíduos oligossintomáticos que participaram deste estudo e, portanto, o HTLV-1 estava infectando este tecido.
- ✓ As alterações morfológicas ultraestruturais observadas tanto na derme como na epiderme das amostras de pele dos indivíduos soropositivos, nos levaram a concluir que a pele é um órgão alvo da infecção pelo HTLV-1.
- ✓ Em geral, a derme apresentou mais alterações morfológicas ultraestruturais do que a epiderme nas amostras de pele analisadas.
- ✓ Parte das células mononucleares presentes na derme e epiderme dos indivíduos participantes deste estudo apresentaram alterações morfológicas ultraestruturais compatíveis de células ativadas por um processo inflamatório/infeccioso.
- ✓ Partículas virais com características ultraestruturais compatíveis com as partículas do HTLV-1 foram vistas próximas e/ou brotando da membrana celular de células com características ultraestruturais da série linfóide.
- ✓ Partículas virais com características ultraestruturais compatíveis com as partículas do HTLV-1 foram vistas próximas e/ou brotando da membrana celular de células com características ultraestruturais de um fibroblasto.

- ✓ Após caracterização filogenética, o HTLV-1 presente na pele dos quatro indivíduos oligossintomáticos com sorologia positiva para o HTLV-I, que fizeram parte deste estudo, foi classificado como pertencente ao grupo Cosmopolita **a**, subgrupo transcontinental **A**.

## VIII. PERSPECTIVAS

- ✓ É necessária a realização da técnica de imunoletromicroscopia para caracterizar as estruturas que se assemelhavam às partículas virais nas peles lesadas, como sendo o HTLV-1 e quais células estão produzindo estas partículas virais.
- ✓ É necessária a realização de testes imunohistoquímicos para a caracterização fenotípica das células envolvidas neste processo.
- ✓ As amostras de pele dos indivíduos soropositivos de identificação 60 e 62 apresentaram alterações morfológicas ultraestruturais em maior número e maior grau do que a dos outros indivíduos que participaram deste estudo e sugere-se que sejam acompanhados no processo de desenvolvimento de alguma manifestação dermatológica mais específica.



## IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J. ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucl. Acids. Res.** v. 25, p. 3389-3402, 1997.

ANDRADA-SERPA, M. J.; ARAÚJO, A.; TAFFAREL, M.; *et al.* Detection and isolation of human T-cell leukemia/lymphoma virus type I (HTLV-I) from cultured lymphocytes of a Brazilian TSP/HAM patient. **Brazilian journal of Medical and Biological Research**, v. 28, p. 51-57, 1995.

ANDREWS, J. M.; OGLESBEE, M.; LAIRMORE, M. D. The effect of the cellular stress response on human T lymphotropic virus type I envelope protein expression. **J. Gen. Virol.**, v. 79, Pt. 12, p. 2905-2908, 1998.

BARBOSA, H. S.; BITTENCOURT, A. L.; DE ARAÚJO, I. B.; *et al.* Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma in Northeastern Brazil: A Clinical, Histopathologic, and Molecular Study. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 21, p. 65-71, 1999.

BASTIAN, I.; GARDNER, J.; WEBB, D.; GARDNER, I. Isolation of a human T-lymphotropic virus type I strain from Australian aboriginals. **Journal of Virology**, v. 67, p. 843-851, 1993.

BAZARBACHI, A.; HUANG, M.; GESSAIN, A.; *et al.* Human T-cell-leukemia virus type I in post-transfusional tropical spastic paraparesis: complete proviral sequence from uncultured blood cells. **International Journal of Cancer**, v. 63, p. 494-499, 1995.

BIGGAR R.J.; GIGASE P.L.; MELBYE, M.; *et al.* ELISA HTLV retrovirus antibody reactivity associated with malaria and immune complexes in healthy Africans. **Lancet**, v. 2, p. 520-523, 1985.

BITTENCOURT, Achiléa L. Vertical transmission of HTLV-I/II: a review. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 40, n. 4, p. 245-51, 1998. Review.

CAMARGOS, E.R. **Técnicas rotineiras de processamento de material biológico em microscopia eletrônica de transmissão**. Belo Horizonte: Centro de Microscopia Eletrônica. Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais, 2002, 59 p.

CANN, A.J. & CHEN, S. Y. Human T-Cell Leukemia Virus Types I and II. In: FIELDS, B.N., KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M. *et al.* **Fields Virology**. 3. ed. Philadelphia: Lippincott – Raven Publishers, 1996. Cap. 59, p. 1849-1880.

CANN, A.J. **Principles of Molecular Virology**. Academic Press, 2ed., 1997, pp310.

CARNAUBA ET AL, 1996. Manifestações dermatológicas em pacientes com mielopatia associada ao HTLV-I. In: **SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE HTLV-I/II NO BRASIL, BELO HORIZONTE**. Resumos dos trabalhos apresentados. Belo Horizonte: [s.n.], p.49, 1996.

CARNEIRO-PROIETTI, A.B.F.; GROSSI, M. A. F., GONÇALVES, D.U. e GIPH. HTLV-I/II prevalence among children in a dermatological unit for impoverished children in Minas Gerais, Brazil. **NINTH INTERNATIONAL CONFERENCE ON HUMAN RETROVIROLOGY: HTLV- APRIL 5-9, 1999, Kagoshima, Japan**.

CASSEB, J.; PENALVA-DE-OLIVEIRA, A. C. The pathogenesis of tropical spastic paraparesis/human T-cell leukemia type I-associated myelopathy. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 12, p. 1395-1401, 2000.

CASTRO-COSTA, C.M.; SALGUEIRO, M.R.; CARTON, H.; *et al.* Tropical spastic paraparesis in northeastern Brazil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 47, p. 134-138, 1989.

CASTRO, LH. *et al.* HTLV-I associated myelopathy in Brazil: a preliminary report. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 47, n. 4, p. 501-502, 1989.

CATALAN-SOARES, B.; MONTEIRO DE CASTRO, M. S.; PROIETTI, F. A. Epidemiologia do HTLV-I/II . In: PROIETTI, A. B. *et al.* **HTLV-I/II**, 3.ed. Belo Horizonte: Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais, 2000, 208p. Cadernos Hemominas, v. XI, p. 53-75.

CAVALCANTI, M.; FERREIRA, Jr. O.; PUCCIONI, M.; *et al.* HTLV-I associated neurologic manifestations in four generations of Brazilian family. **Journal Acquired Immuno Deficiency Syndromes**, v. 6, p. 213, 1993.

CHOU, K. S.; OKAYAMA, A.; TCHIBANA, N.; *et al.* 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. **International Journal of Cancer**, v. 60, p. 701-706, 1995.

CLAUDE VITAL, M.D.; VITAL, A.; MOYNET, D.; *et al.* The presence of particles resembling human T-cell leukemia virus type I at ultrastructural examination of lymphomatous cells in a case of T-cell Leukemia/Lymphoma. **Cancer**, v. 71, n. 7, p. 2227-2232, 1993.

COFFIN, J. M.; ESSEX, M.; GALLO, R.; *et al.* "BLV-HTLV retroviruses". In: MURPHY *et al.* (eds). **The VI Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)**. Springer, 1995. Disponível em: <<http://www.life.anu.edu.au/viruses/ICTVdB>>. Acesso em: 20 novembro 2002.

COONS, A.N. & KAPLAN, M.H. Localization of antigens in tissue cells. II. Improvement in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. **J. Exp. Med**, v. 91, p.1-7, 1950.

COSCOY, L.; GONZALEZ-DUNIA, D.; BRAHIC, M.; *et al.* Infection of choroid plexus cells by human T cell leukemia virus type I. **Journal of General Virology**, v. 78, p.143-146, 1997.

D'AGOSTINO, D. M.; ZOTTI, L.; FERRO, T.; CAVALLORI, I.; *et al.* Expression and functional properties of proteins encoded in the x-II ORF of HTLV-I. **Virus Research**, v. 78, p. 35-43, 2001.

DE THE, G. Genetic variability and molecular epidemiology of human and simian T cell leukemia/lymphoma virus type I. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.**, 1996; 13 suppl 1:S132-45.

DOMINGUEZ, M. C.; CASTILLO, A. ; CABRERA, J.; *et al.* Envelope sequence variation and phylogenetic relations of human T lymphotropic virus type 1 from endemic areas of Colombia. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 18, n. 12, p. 887-890, 2002.

DUMMER, R.; WILLERS, J.; KAMARASHEV, J.; *et al.* Pathogenesis of cutaneous lymphomas. **Semin. Cutan. Med. Surg.**, v. 19, n. 2, p78-86, 2000.

EHRlich, G.D.; GLASER, J.B.; LA VIGNE, K. *et al.* Prevalence of human T-cell leukemia/lymphoma virus (HTLV) type II infection among high-risk individuals: type-specific identification of HTLVs by polymerase chain reaction. **Blood**, v. 74, p.1658-1664, 1989.

FASSEL, T.A.; RAISCH, K.P.; CHETTY, N.; *et al.* Ruthenium red preserves glycoprotein peplomers of C-type retroviruses for transmission electron microscopy. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 73, n. 4, p. 222-227, 1998.

FERREIRA, O.; MARTINS, M. V. Diagnóstico Laboratorial do HTLV. In: PROIETTI, B. *et al.* **HTLV-I/II**, 3.ed. Belo Horizonte: Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais, 2000, 208p. Cadernos Hemominas, v.XI, p. 37-51.

FRANCHINI, G.; AMBINDER, R. F.; BARRY, M. Viral Disease in Hematology. **Hematology**, v. 1, p. 409, 2000.

GALLO R. C. The human T-cell leukemia/lymphoma retroviruses (HTLV) family: past, present and future. **Cancer Research**, v. 45 (suppl), p. 4524s-4533s, 1985.

GESSAIN, A.; BOERI, E.; YANAGIHARA, R.; *et al.* Complete nucleotide sequence of a highly divergent human T-cell leukemia (lymphotropic) virus type I (HTLV-I) variant from Melanesia: genetic and phylogenetic relationship to HTLV-I strains from other geographical regions. **Journal of Virology**, v. 67, p. 1015-1023, 1993.

GESSAIN, A. ; BARIN, E. ; VERNANT, J. C. ; *et al.* Antibodies to human T-lymphotropic virus type I in patients with tropical spastic paraparesis. **Lancet**, v.2, p. 407-410, 1985.

GESSAIN, A.; MAHIEUX, R. A virus called HTLV-I. Epidemiological aspects. **Presse Med**, v. 29, n. 40, p.2233-2239, 2000.

GONÇALVES, D. U. *et al.* Associate Infective Dermatitis may be an indolent HTLV-1 Associate Lymphoma. **Brazilian Journal of Infectious Disease**, v. 4, n. 2, p. 100-102, 2000.

GONÇALVES, D. U. **Manifestações Dermatológicas em Doadores de Sangue com Sorologia Alterada para o Vírus Linfotrópico Humano de Células T-Tipo 1 em Minas Gerais.** Belo Horizonte: UFMG, 2000. 158 f. Tese (Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.

GRAY, G. S., WHITE, M., BARTMAN, T., MANN, D. Envelope gene sequence of HTLV-1 isolate MT-2 and its comparison with other HTLV-1 isolates. **Virology**, v. 177, p. 391-395, 1990.

GRANT, C., BARMAK, K., ALEFANTIS, T., YAO, J., JACOBSON, ., WIGDAHL, B. 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. **J. Cell Physiol**, v. 190, n. 2, p. 133-159, 2002

GROSSMAN, W.J. & RATNER, L. Cytokine expression and tumorigenicity of Large Granular Lymphocytic Leukemia Cells from mice transgenic for tax gene of human T-cell leukemia virus type I. **Blood**, v.90, n. 2, p. 783-794, 1997.

HADDAD A, SESSO, A., ATTIAS, M., FARINA, M., MEIRELLES, M.N., SILVEIRA, M., BENCHIMOL, M., SOARES, M.J., MONIKA-BARTH, O., MACHADO, R.D., SOUTO-PADRÓN, T., DE SOUZA, W. **Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas**. Editor: Wanderley de Souza, Rio de Janeiro: SBM, 1998, 179p.

HINUMA, Y., NAGATA, K., HANAOKA, M. *et al.* 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, v. 78, p. 6476-6480, 1981.

JOHNSON, J. M., HARROD, R., FRANCHINI, G. Molecular biology and pathogenesis of the human T-cell leukemia/lymphotropic virus Type-1 (HTLV-1). **Int. J. Exp. Path.**, v. 82, p. 135-147, 2001.

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

KAPROWSKI, H. *et al.* Activation of the inducible form of nitric oxide synthase in the brains of patients with multiple sclerosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 26, p. 12041-12045, 1995.

KUBOTA, T., MORISHITA, N., TANAKA, Y., SAWADA, T., MIYAGI, T., OHTSUKI, Y. and MIYOSHI, I. Establishment of novel lymphoid cell lines dually infected with human T-cell lymphotropic virus types I e II. **The J. of Inf. Disease**, v. 172, p. 220-224, 1995.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**. MEGA3: 2001.

LA GRENADE L., HANCHARD B., FLETCHER V., CRANSTON B., BLATTNER W. Infective dermatitis of jamaican children: a marker for HTLV-I infection. **Lancet**, v. 336, p. 1345-1347, 1990.

LA GRENADE, LOIS. Manifestações dermatológicas do HTLV-I. In: PROIETTI, AB. *et al.*, **HTLV-I/II**, 3.ed. Belo Horizonte: Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais, 2000. 208 p. Cadernos Hemomonas, v.XI, p. 139-146.

LAIRD, P.W., ZIJDERVELD, A., LINDERS, K., RUDNICK, M. A., JAENISCH, R., BERNIS, A. Simplified mammalian DNA isolation procedure. **Nucleic Acids Research**, v. 9, n.15, p. 4293, 1991.

LAIRMORE, M. D., QUINN, T. C. Evaluation of enzyme immunoassays for antibody to human lymphotropic viruses type I/II. **Lancet**, v. 337, p. 30, 1991.

LEHKY, TJ., *et al.* Detection of human T-lymphotropicvirus type 1 (HTLV-I) tax RNA in the central nervous system of HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesia patients by in situ hibridization. **Ann Neurol**, v. 37, p.143-145, 1995.

LESSIN, S.R., VOWELS B.R., ROOK A.H. Retroviruses and cutaneous T-celllymphoma. **Dermatol. Clin.**, v. 12, p. 243-253, 1994.

LIU, H. F., PATRICK, G., VAN BRUSSEL, M., VAN LAETHEM, K., CHEN, Y. C., DESMYTER, J., VANDAMME, A. M. The three human T-lymphotropic virus type I subtype arose from three geographically distinct simian reservoirs. **Journal of general virology**, v. 77, p. 359-368, 1996.

MALIK, K. T., EVEN, J., KARPAS, A. Molecular cloning and complete nucleotide sequence of an adult T cell leukaemia virus/human T cell leukaemia virus type I (ATLV/HTLV-I) isolate of Caribbean origin: relationship to other members of the ATLV/HTLV-I subgroup. **Journal of General Virology**, v. 69 (Pt 7), p. 1695-16710, 1988.

MIURA T, FUKUNAGA T, IGARASHI F, IDO E, FUNAHASHI S I, ISHIDA T, WASHIO K, UEDA S, HASHIMOTO KI, YOSHIDA M, OSAME M, SINGHAL BS, ZANINOVIC V, CARTIER L, SONODA S TAJIMA, INA Y, GOJOBORI T, Phylogenetic subtypes of human T-lymphotropic virus type I and their relation to the anthropological background. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, 91, p1124-1127, 1994.

MIYAUCHI, M., MARUYAMA, K. Morphological and antigenic variations of T-cell leukemia virus type I particles in human lymphocytes. **J. Electron Micros.**, v. 3, p. 145-154, 1990.

MORI, N., SATO, H., HAYASHIBARA, T., SENBA, M., HAYASHI, T., YAMADA, Y., KAMIHIRA, S., IKEDA, S., YAMASAKI, Y., MORIKAWA, S., TOMONAGA, M., GELEZIUNAS, R., YAMAMOTO, N. Human T-cell leukemia virus type I Tax transactivates the matrix metalloproteinase-9 gene: potential role in mediating adult T-cell leukemia invasiveness. **Blood**, v. 99, n. 4, p. 1341-1349, 2002.

MOYNET, D., POULIQUEN, J.F., LONDOS-GAGLIARDI, D., BUIGUES, R.P., MOREAU, J.F., BEDJABAGA, I., GEORDES, M.C., TALARMIN, A. , JOUBERT, M., FLEURY, H., VINCENDEAU, P., GUILLERMAIN, B. High variability of HTLV-I in a remote population of Gabon as compared to that of a similar population of French Guiana. **Virus Genes**, v. 23, n. 3, p. 257-261, 2001.

MURPHY, E. L. "BLV-HTLV retroviruses". In: MURPHY et al. (eds). **The VI Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)**. Springer, 1995. Disponível em: <<http://www.life.anu.edu.au/viruses/ICTVdB>>. Acesso em: 20 novembro 2002.

MYOSHI, I., KUBONISHI, I., YOSHIMOTO, S., AKAGI, T., OHTSUKI, Y., SHIRAISHI, Y., NAGATA, K., HINUMA, Y. Type C virus particles in a cord T-cell line derived by co-cultivating normal human cord leukocytes and human leukaemic T cells. **Nature**, v. 294, n. 24, p. 770-771, 1981.



NICOT, C., MULLOY, J. C., FERRARI, M. G., JOHNSON, J. M., FU, K., FUKUMOTO, R., TROVTO, R., FULLEN, J., LEONARD, W. J., FRANCHINI, G. HTLV-I p12<sup>I</sup> protein enhances STAT5 activation and decreases the interleukin-2 requirement for proliferation of primary human peripheral blood mononuclear cells. **Blood**, v. 98, n. 3, p. 823, 2001.

OHARA N, HAYASHI K., MIYAMOTO, K., TAKAHASHI, K., OHTSUKI, Y., AKAGI, T. Immunoelectron microscopic study of HTLV-II producing cells with an anti-envelope gp46 monoclonal antibody. **Arch Virol**, v. 140, p. 1291-1295, 1995.

OSAME, M., USUKU, K., IZUMO, S., UICHI, N., AMITANI, H., IGATA, A., MATSUMOTO, M., TARA, M. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. **Lancet**, v. 1, p. 1031-1032, 1986.

PAINE, E., GARCIA, J., PHILPOTT, T. C., SHAW, G., RATNER, L. Limited sequence variation in human T-lymphotropic virus type 1 isolates from North American and African patients. **Virology**, v. 182, n. 11, p. 111-123, 1991.

PANCAKE BA, ZUCKER-FRANKLIN D, COUTAVAS EE.- The cutaneous T-cell lymphoma, mycosis fungoides, is a human T-cell lymphotropic virus-associated disease. **J. Clin. Invest.**, v. 95, p. 547-554, 1995.

PINHEIRO, S. R. Manifestações Oftalmológicas Relacionadas ao HTLV. In: PROIETTI, A. B. *et al.* **HTLV-I/II**. 3.ed. Belo Horizonte: Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais, 2000. 208p. Cadernos Hemominas, v.XI, p.131-137.

POIESZ, B.J., RUSCETTI, F.W., GAZDAR, A.F., BUNN, P.A., MINNA, J.D., GALLO, R.C. 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**, v.77, p. 7415-7419, 1980.

POMBO DE OLIVEIRA, M.S., & CARVALHO, S.M. Leucemia/Linfoma de células T do adulto (ATL): Características clinicopatológicas e Apresentação no Brasil. In: PROIETTI, A.

B. *et al.* **HTLV-I/II**. 3.ed. Belo Horizonte: Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais, 2000. 208p. Cadernos Hemominas, v. XI, p. 76-77

POPOVIC M., REITZ M.S., SARNAGADHARAN M.G., ROBERT-GUROFF M., KALYANARAMANN V.S., NAKAO, Y., MIYOSHI, I., MINOWADA, J., YTO, Y., GALLO, R.C. The virus of Japanese adult T-cell leukemia is a member of the human T-cell leukemia virus group. **Nature**, v. 300, p. 63-66, 1982.

PROIETTI, A. B. F. C., MARTINS, M. L. Características bilógicas do vírus HTLV-I/II. PROIETTI, A. B. *et al.* In: **HTLV-I/II**, 3.ed. Belo Horizonte: Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais, 2000, 208p. Cadernos Hemominas, v..XI.

RENU B, OWEN, S.M., RUDOPH, D., LEVINE, P.H. Sequence Variaton within the immunodominant epitope-coding region from external glycoprotein of human T-lymphotropic virus type II in isolates from seminole indians. **The Journal of Infectuous Diseases**, V.169, p. 407-411, 1994.

RODGERS-JOHNSON, P., GAJDUSEK, D. C., MORGAN, O., C., ZAMINOVIC, V., SARIN, P., S., GRAHAN, D., S. HTLV-I and HTLV-III antibodies and tropical spastic paraparesis. **Lancet**, v. 2, p1247-1248, 1985.

RIBAS, J. G., NETTO DE MELO, G. C. Human T-dell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) associated myelopathy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 4, p. 377-384, 2002.

RÓMAN, G., C., OSAME, M. Identity of HTLV-I associated tropical spastic paraparesis and HTLV-I associated mielophaty. **Lancet**, v.1, p 651, 1988.

SAGAWA, K., MOCHIZUKI, M., MASUOKA, K., KATAGIRI, K., KATAYAMA, T., MAEDA, T., TANIMOTO, A., SUGITA, S., WATANABE, T., ITOH, K. Immunopathological mechanisms of human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) uveitis. **J. Clin. Invest.**, v. 95, p. 852-858, 1995.

SALEMI, M., VAN DOOREN, S., AUDENAERT, E., DELAPORTE, E., GOUBAU, P., DESMYTER, J., VANDAMME, A-M. Two New Human T-Lymphotropic Virus Type I Phylogenetic Subtypes in seroindeterminates, a Mbuti Pygmy and a Gabonese, Have Closest Relatives among African STLV-I Strains. **Virology**, v. 246, p. 277-287, 1998.

SANGER, F., NICKLEM, S., COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-termination inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 74, p. 54-63, 1977.

SANTOS I., DOS SANTOS I.B., DOS SANTOS PEREIRA T. *et al.* Sarna crostosa em paciente portador do retrovírus HTLV-I. **Anais Bras. Dermatol.**, v. 70, p. 49-51, 1995.

SARNGADAHARAN, M.G., MARKHAM, P. D. , GALLO, R. C. Human T-cell leukemia viruses – In: **Fundamental Virology**. Fields, B.N. and Knipe, D.M.(eds) Raven Press, NY, 1996, p. 681-707.

SEGURADO A, BIASUTTI C, ZEIGLER R, RODRIGUES C, DAMAS C, JORGE AL, MARCHIORI P. Identification of Human T-lymphotropic Virus Type I (HTLV-I) Subtypes Using Restricted Fragment Length Polymorphism in a Cohort of Asymptomatic Carriers and Patients with HTLV-I associated Myelopathy/tropical spastic Paraparesis from São Paulo, Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97(3), p.329-333, 2002.

SETOYAMA M., KERDEL F.A., ELGART G., KANZAKI T. and BYRNES J.J. Detection of HTLV-I by in situ hybridization in Adult T-cell Leukemia/Lymphoma. **American Journal of Pathology**, v. 152, n. 3, p. 683-689, 1998.

SLATTERY JP, FRANCHINI G., GESSAIN A. Genomic evolution, patterns of global dissemination, and interspecies transmission of human and simian T-cell leukemia/lymphotropic viruses. **Genome Res**, v. 9, n. 6, p. 525-540, 1999.

SPELLBERG, BRAD. The cutaneous citadel – A holistic view of skin and immunity. **Life Sciences**, v. 67, p. 477-502, 2000.

SHAMOTO M, MURAKAMI S, ZENKE T. Adult T-cell leukemia in Japan: an ultrastructural study. **Cancer**, v. 47, p.1804-1811, 1981.

SCHULZ, TF *et al.* HTLV-1 envelope sequences from Brazil, the Caribbean, and Romania: clustering of sequences according to geographic origin and variability in an antibody epitope. **Virology**, 1991 Oct; 184(2):483-91.

SEIKI, M., HATTORI, S., HIRAYAMA, Y., YOSHIDA, M. Human adult T-cell leukemia virus: completed nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 80, p. 3618-3622, 1983.

SUZUMIYA J., SUMIYOSHI A., KUROKI, Y. *et al.* Crusted scabies with adult T cell leukemia. **Arch. Dermatol.**, p. 121, p. 903-4, 1985.

TAFFAREL M., ANDRADA-SERPA, M.J., MONIKA-BARTH, O. Ultrastructural aspects of the human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) in Brazil. **Ciência e Cultura**, v.47, n. 3, p. 146-200, 1995.

TAKATSUKI *et al.* Clinical diversity in adult T-cell leukemia-lymphoma. **Cancer Res**, v. 45, p. s4644-s4645, 1985.

TAKAYANAGUI, O.M. Mielopatia Associada ao HTLV-I/Paraparesia Espástica Tropical(HAM/TSP). In: PROIETTI, A. B. *et al.* **HTLV-I/II**, 3.ed. Belo Horizonte: Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais, 2000. 208p. Cadernos Hemominas, v. XI, p. 109-129.

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

VALLE, A. C., GALHARDO, M. C., LEITE, A. C., ARAÚJO, A. Q., CUZZI-MAIA, T., MACIEIRA, J. P., DOBBIN, J. A. Adult T-cell Leukemia/Lymphoma associated with HTLV-1 infection in a Brazilian adolescent. **Rev. Inst. Med. Trop. S.Paulo**, v. 43. n. 5, p. 283-286, 2001.

VANDAMME, A.-M., SALEMI, M. , DESMYTER, J. The simian origins of the pathogenic human T-cell lymphotropic virus type I. **Trends in Microbiology**, v. 6, n. 12, 1998.

VAN DOOREN, S., GOTUZZO, E., SALEMI, M., WATTS, D., AUDENAERT, E., DUWE, S., ELLERBROK, H., GRASSMANN, R., HAGELBERG, E., DESMYTER, J., VANDAMME, A.-M. Evidence for a post-Columbian introduction of human T-cell lymphotropic virus I Latin America. **Journal of General Virology**, v. 79, p 2695-2708, 1998.

VITAL, C., VITAL, A., MOYNET, D., BROUSTET, A., MASCAREL, A., BLOCH, B., GUILLEMAIN, B. The presence of particles resembling human T-cell Leukemia Virus Type I at Ultrastructural Examination of Lymphomatous Cells in a case of T-Cell Leukemia/Lymphoma. **Cancer**, v. 71, n. 7, 1993.

WATANAB, E. T. , SEIKI M. , YOSHIDA, M. HTLV type I (US isolate) and ATL (Japanese isolate) are the same species of human retrovirus. **Virology**, v. 333, p. 238- 241, 1984.

WHITTAKER, S. J., RUSTIN, M., NG, Y. L., LEVENE, G., MCGIBBON, D. H., SMITH, N. P. HTLV-1 associated cutaneous disease: a clinicopathological and molecular study of patients from the U.K. **British journal of dermatology**, v. 128, p. 483-492, 1993.

YAMADE Y, ISONO T, ISHIGURO T, YOSHIDA Y. Comparative study of human and rabbit cell infection with cell-free HTLV-I. **J. Med. Virol.**, vol. 39, p. 75-79, 1993.

YAMANO, Y et al. Correlation of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) mRNA with proviral DNA load, virus-specific CD8+ T cells, and disease severity in HTLV-1-associated myelopathy (HAM/TSP). **Blood**, 2002; vol.99, n°1: 88, 1994.

YAMASHITA, M., IDO, E., MIURA, T., HAYAMI, M. Molecular epidemiology of HTLV-I in the world. **J. Acquir Immune Defic Syndr Hum retrovirol**, v. 13, suppl.1:S p.124-131, 1996.

YAMASHITA, M., PICCHIO, G., VERONESI, R., OHKURA, S., BARE, P., HAYAMI, M. HTLV-Is in Argentina are phylogenetically similar to those of other South American countries, but different from HTLV-Is in Africa. **Journal of Medical Virology**, v. 55, p. 152-160, 1998.

YAMASHITA M, VERONESI, R, MENNA-BARRETO M, HARRINGTON WJ, SAMPAIO C, BRITES C, BADARO R, ANDRADE-FILHO AS, OKHURA S, IGARASHI T, TAKEHISA J, MIURA T, CHAMONE D, BIANCHINI O, JARDIM C, SONODA S, HAYAMI M. Molecular epidemiology of human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) in Brazil: the predominant HTLV-Is in South America differ from HTLV-Is of Japan and Africa as well as those of Japanese immigrants and their relatives in Brazil. **Virology**, 261 (1): 59-69, 1999.

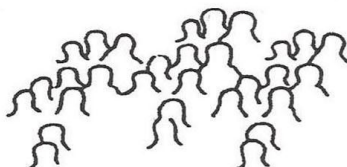
YANG, Y., HSU, T., LIU, M., LIN, M., CHEN, J., YANG, C. Molecular Subtyping of Human T-Lymphotropic Virus Type I (HTLV-I) by a Nested Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the Envelope Gene: Two Distinct Lineages of HTLV-I in Taiwan. **Journal of Medical Virology**, v. 51, p. 25-31, 1997.

YOSHIE, O., FUJISAWA, R., NAKAYAMA, T., HARASAWA, H., TAGO, H., IZAWA, D., HIESHIMA, K., TATSUMI, Y., MATSUSHIMA, K., HASEGAWA, H., KANAMARU, A., KAMIHIRA, S., YAMADA, Y. Frequent expression of CCR4 in adult T-cell leukemia and human T-cell leukemia virus type 1-transformed T cells. **Blood**, v. 99, n. 5, p. 1505-1511, 2002.

YOSHIDA, M., MIYOSHI, I., HINUMA, Y. Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, v. 79, p. 2031-2035, 1982.

ZUCKER-FRANKLIN D., HOOPER C., EVATT B.L. Human lymphotropic retroviruses associated with mycosis fungoides: evidence that human T-cell lymphotropic virus type II (HTLV-II) as well HTLV-I may play a role in the disease. **Blood**, v. 80, n. 6, p. 537-545, 1992.

## ANEXO 1 – Termo de consentimento pós-informado para biópsia.



FUNDAÇÃO CENTRO  
DE HEMATOLOGIA E HE-  
MOTERAPIA DE MINAS  
GERAIS  
**HEMOMINAS**  
ALAMEDA EZEQUIEL DIAS, 321 - SANTA EFIGÊNIA  
CEP 30 130-110 - BELO HORIZONTE - MG  
FONE 273-3377

**GIPH – Grupo Interdisciplinar de Pesquisa em HTLV**

### TERMO DE CONSENTIMENTO PARA BIÓPSIA

A pesquisa intitulada “Pesquisa do vírus HTLV-I na pele de indivíduos oligossintomáticos de uma coorte da Fundação Hemominas em Belo Horizonte”, cuja sorologia é positiva para o HTLV-I, visa detectar a presença deste vírus na pele destes sujeitos através de técnicas diversas, e comparar a eficácia destas técnicas. Embora o HTLV-I não seja um vírus novo, sua descoberta é recente e muitos aspectos precisam ser esclarecidos. Sabe-se que ele pode ser transmitido através de relações sexuais, agulhas e sangue contaminados e aleitamento materno.

Eu,.....  
abaixo assinado, fui esclarecido pela Dra. Olga Maria Carvalho Pfeilsticker sobre o objetivo da biópsia para utilização na pesquisa descrita acima, assim como os benefícios que o estudo pode proporcionar. Estou ciente que os resultados deste estudo serão publicados de forma a manter sigilosa a minha identificação pessoal. Foi garantido o retorno destes resultados à minha pessoa no término dos exames. Também fui esclarecido sobre eventuais desconfortos que poderei sofrer após o procedimento da biópsia. Foi-me assegurado que não serei privado de qualquer medicação e não terei meu tratamento interrompido para satisfazer os critérios da referida pesquisa e terei o acompanhamento do Serviço de Dermatologia da UFMG até a resolução do processo cirúrgico referente à biópsia. Concedo meu acordo de participação, de livre e espontânea vontade, e declaro que foi-me dado o direito de abandonar o estudo a qualquer momento, se eu assim o desejar, sem prejuízo para a continuidade do meu tratamento e da minha participação no projeto do GIPH.

Assinatura:..... Data ...../...../.....

Testemunha:.....

Nome do paciente:.....

Idade:..... IDN:..... Estado Civil:.....

Nº prontuário:..... Nº Pesquisa:.....

Naturalidade:..... Procedência:.....

Escolaridade:..... Profissão:.....

Endereço Residencial ou Profissional:.....

Rua:..... Nº.....

Bairro:..... Cidade:.....

Telefone:.....

**Anexo 1- Termo de consentimento pós-informado dos indivíduos soropositivos para HTLV-1**

## ANEXO 2a – Parecer consubstanciado do CEP Hemominas.

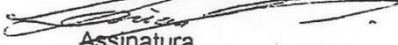
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
 Conselho Nacional de Saúde  
 Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP  
 Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hemominas

### PARECER CONSUBSTÂNCIADO

1. Título do Projeto de Pesquisa: "Pesquisa do vírus HTLV-I na pele de indivíduos oligossintomáticos de uma coorte da Fundação Hemominas em Belo Horizonte".		
<b>SUJEITOS DA PESQUISA</b>		
2. Número de sujeitos No Centro: 30 Total: 32	3. Grupos Especiais: Menor de 18 anos <input type="checkbox"/> Portador de deficiência mental <input type="checkbox"/> Embrião/feto <input type="checkbox"/> Relação de dependência (militares, presidiários...) <input type="checkbox"/> Outros <input checked="" type="checkbox"/> Não se aplica <input type="checkbox"/>	
<b>PESQUISADOR RESPONSÁVEL</b>		
4. Nome: Olga Maria Carvalho Pfeilsticker		
5. Instituição a que pertence: Universidade Federal de Minas Gerais		
<b>INSTITUIÇÃO (ÕES) ONDE SERÁ REALIZADO</b>		
6. Nome: Fundação Hemominas		
7. Unidade/Órgão: Pesquisa		
8. Participação Estrangeira: Sim <input type="checkbox"/> Não <input checked="" type="checkbox"/>		
9. Projeto Multicêntrico: Sim <input type="checkbox"/> Não <input checked="" type="checkbox"/> Nacional <input checked="" type="checkbox"/> Internacional <input type="checkbox"/>		
<b>PATROCINADOR NÃO SE APLICA <input checked="" type="checkbox"/></b>		
10. Nome:		
<b>COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP</b>		
11. Data de Entrada: 17/12/2001	12.Registro no CEP: 080	13. Data de análise: 17/12/2001
14. <b>Objetivos:</b> Verificar se o vírus HTLV-1 está presente ou não nas biópsias cutâneas de portadores do HTLV-1.		
15. <b>Sumário do Projeto:</b> Para análise das amostras será usado o PCR "nested", da expressão dos mRNA virais através da RT-PCR, de antígenos e/ou partículas virais do HTLV-1, por meio da imunohistoquímica e da microscopia eletrônica convencional. Concomitantemente pretende-se descrever ao nível ultraestrutural, as partículas virais que possam estar presentes e as alterações morfológicas que se apresentarem nas lesões, em decorrência da instalação ou não do vírus HTLV-1 na pele destes portadores. A casuística proposta é de 30 biópsias de pele, colhidas de doadores soropositivos para HTLV-1. Estes sujeitos fazem parte do Projeto GHIP da Fundação Hemominas e serão encaminhados para atendimento no Departamento de Dermatologia da UFMG. Serão recrutados 2 indivíduos doadores de pele normal utilizadas como amostras controle negativos nos experimentos. As amostras serão colhidas de indivíduos submetidos a cirurgia plástica ou reparadora na Maternidade Otaviano Neves e/ou no Hospital da Baleia.		



**ANEXO 2b – Parecer Consubstanciado do CEP Hemominas.**

<p><b>16. Análise:</b></p> <p>Após análise das respostas dadas às pendências citadas em pareceres anteriores este Comitê considera que o projeto pode ser aprovado.</p> <p>Cabe apenas uma sugestão quanto ao título do projeto. O CEP Hemominas sugere que o título seja melhorado: Prevalência do vírus HTLV-I em biópsias de pele de indivíduos portadores do vírus.</p> <p>A Folha de Rosto deve ter a assinatura do responsável pela instituição no item Termo de Compromisso do responsável pela instituição.</p>	<p><b>17. Parecer:</b></p> <p><b>APROVADO</b></p> <p>Data: 07 de junho de 2002</p>
<p><b>18. Encaminho a CONEP:</b></p> <p>Os dados acima para registro <input type="checkbox"/></p> <p>O projeto para apreciação <input type="checkbox"/></p> <p>Data:</p>	<p><b>19. Coordenador</b></p> <p>Lúcia Efigênia Gonçalves Nunes</p> <p></p> <p>Assinatura</p>

