



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ



Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana

TESE DE DOUTORADO

**ORIGEM DO HTLV-1AA NO BRASIL: CONTRIBUIÇÃO DA
POPULAÇÃO AFRICANA NA INTRODUÇÃO DO VÍRUS**

ADJILE EDJIDE ROUKIYATH AMOUSSA

Salvador – Bahia

2018

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana

**ORIGEM DO HTLV-1AA NO BRASIL: CONTRIBUIÇÃO DA
POPULAÇÃO AFRICANA NA INTRODUÇÃO DO VÍRUS**

ADJILE EDJIDE ROUKIYATH AMOUSSA

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Júnior
Alcantara

Tese apresentada ao Curso de Pós-
Graduação em Patologia Humana para
obtenção do grau de Doutor.

Salvador – Bahia

2018

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

A525o Amoussa, Adjile Edjide Roukiyath
Origem do HTLV-1aA no Brasil: Contribuição da população africana na
introdução do vírus / Adjile Edjide Roukiyath Amoussa. - 2018.
97 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Júnior Alcantara, Laboratório de
Patologia Experimental.

Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade
de Medicina. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, 2018.

1. HTLV-1. 2. Doadores de Sangue. 3. População negra. 4. Transmissão.
5. Brasil. Título.

CDU 616.98

Título da Tese: " ORIGEM DO HTLV-1aA NO BRASIL: CONTRIBUIÇÃO DA POPULAÇÃO AFRICANA NA INTRODUÇÃO DO VÍRUS."

ADJILE EDJIDE ROUKIYATH AMOUSSA

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 20 de março de 2018

COMISSÃO EXAMINADORA



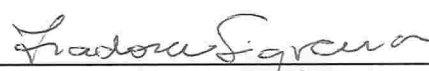
Dr. Antônio Ricardo Khouri Cunha
Pesquisador
IGM/Fiocruz



Dr. Lucas Pedreira de Carvalho
Pesquisador
IGM/Fiocruz



Dra. Joana Paixão Monteiro Cunha
Professora Adjunta
UFBA



Dra. Isadora Cristina de Siqueira
Pesquisadora
IGM/Fiocruz



Dr. Luiz Carlos Junior Alcantara
Pesquisador
IGM/Fiocruz

FONTES DE FINANCIAMENTO

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB).

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Financiadora de Estudo e Projetos (FINEP).

Centre de Prise en Charge Médicale Intégrée du Nourrisson et de la
Femme Enceinte atteints de Drépanocytose (CPMI-NFED).

Agence National de Transfusion Sanguine (ANTS) do Benim.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer em primeiro lugar a Deus. Glorificado e exaltado seja o Senhor do universo, o clemente e o misericordioso, pela minha existência, por ter sido minha fonte de coragem, de inspiração, e por ter estado sempre comigo durante todos os momentos desta caminhada.

Após agradecer a Deus, dirijo os meus calorosos agradecimentos aos meus pais pelo amor, pelo carinho, pelas orações e pelo o apoio necessários durante todo este período. Agradeço pelo suporte para minha educação, porque eles são o reflexo de quem sou hoje. Não há palavras que possam descrever o amor e a gratidão que tenho por eles, com quem quero celebrar e compartilhar também a alegria do encerramento de mais uma etapa da minha vida.

Estendo os meus sinceros agradecimentos, ao meu noivo Aboudou Kowiou que me acompanhou em todos os momentos dessa jornada, me transmitindo força, coragem e confiança, mostrando que quando temos amor podemos realizar tudo.

Especial agradecimento ao meu orientador Dr. Luiz Carlos Junior Alcantara, por ter aceitado me orientar neste trabalho com seu grande conhecimento. Pelos ensinamentos, dedicação, empenho, paciência e disposição que perdurarão para sempre em meus pensamentos. Principalmente pelo estímulo e apoio nos momentos mais difíceis desta caminhada, dando-me também à oportunidade de realizar uma pesquisa interdisciplinar.

Agradeço de todo o meu coração a Professora Marilda de Souza Gonçalves, por facilitar a realização da formação dos estudantes do Benim e Nigéria em programa de pós-graduação no Brasil sobre o projeto CNPq com numero de processo 140152/2014-8. Também pelo amor, carinho, apoio e acolhimento de mãe durante todos estes momentos.

Ao Professor Washington Luis Conrado dos Santos e Dr. Nádia Washington pelo amor, carinho e disponibilidade para ajuda na adaptação desde a chegada no Brasil. Sempre estiveram disponíveis para convidar para uma festa de confraternização. Muito obrigada.

Aos Professores Mohamed Cherif Rahimy e Ambaliou Sanni por contribuírem a realização da formação dos estudantes do Benim em programa de pós-graduação no Brasil. Muito obrigada por acreditar em mim, me dando a oportunidade de participar do programa.

Ao Dr. Tulio de Oliveira e toda sua equipe, pelas orientações no desenvolvimento desta pesquisa durante o período da minha estada na Universidade de *KwaZulu-Natal*,

Durban (África do Sul). Agradecimento especial a Siva Danaviah e Eduan Wilkinson por me receberem de uma forma tão acolhedora e por todos os ensinamentos.

À coordenação do Curso de Pós-graduação em Patologia Humana e Experimental (PGPAT), e aos demais professores pelos ensinamentos muitos valiosos durante toda esta formação.

Aos colegas do Curso de PGPAT pela convivência e amizade durante todo o curso.

A todos os colegas do Laboratório de Patologia Experimental (LAPEX), especialmente Fernanda Amarante, Fernanda Khouri, Jaqueline Góes de Jesus, Inés Restovic, Marta Giovanetti, Marcia Weber, Thessika Hialla, Filipe Rego, Joilson Xavier, Murilo Freire e Vagner Fonseca. Também a Sâncio Santana (LHGB), pelos bons momentos de convivências, aprendizado e apoio durante toda a realização deste trabalho.

Aos meus amigos e colegas do Benim e Nigéria, especialmente Corynne, Francine, Jeanne, Laurence, Modeste, Uche e Bartholomew pelo apoio, estímulo constante, convivência e amizade durante todos estes períodos.

Às secretárias do programa de pós-graduação PGPAT pelo auxílio durante todos estes momentos. Em especial a Jane Monteiro, Taiane, Jurema, Rita, Valdenice e a Dona Eugenia pelo acolhimento de mãe em todos os momentos.

A biblioteca Ciências Biomédicas Eurydice Pires de Sant'Anna do Instituto Gonçalo Moniz (IGM), Fiocruz/Bahia.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudo para a realização deste trabalho.

A todos aqueles que, embora não citados, contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

AMOUSSA, Adjile Edjide Roukiyath. Origem do HTLV-1aA no Brasil: Contribuição da população africana na introdução do vírus. 97 f. il. Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2018.

RESUMO

INTRODUÇÃO: Até o momento quatro tipos de HTLV foram isolados e descritos na literatura, sendo que somente o HTLV tipo 1 foi considerado endêmico em várias regiões do mundo, principalmente na África, Japão, Caribe e em ambos continentes americanos. No Brasil, esta infecção é mais comum entre os descendentes de imigrantes originados dos países endêmicos, por exemplo, o Japão e países da África Subsaariana. O Subgrupo "A" do HTLV-1 subtipo "a" (HTLV-1 aA) é o mais frequente de todos subgrupos e possui disponíveis, um número maior de sequências LTR no Genbank e nos bancos de dados secundários. Para entender a origem do HTLV-1 aA no Brasil vários estudos de análises filogenéticas da região LTR do vírus, juntamente à caracterização dos haplótipos do gene da β -globina dos indivíduos infectados foram realizados. Alguns desses estudos sugeriram que houve múltiplas introduções durante o período pós-colombiano, principalmente, através da migração da população africana para o Brasil. Segundo os dados históricos a maioria dos africanos que foram trazidos para o Brasil são originados da região oeste da África. Portanto para esclarecer a ausência até o momento de agrupamento monofilético dos genótipos "aA" isolados no Brasil com os genótipos isolados na região oeste da África, seria importante a obtenção das sequências isoladas em Benim, um país que participou com muitos africanos trazidos para o Brasil durante o tráfico negreiro de acordo com dados históricos.

OBJETIVO: Investigar as possíveis origens do HTLV-1aA no Brasil a partir da população infectada da África. **MATERIAL E MÉTODOS:** Primeiramente, para confirmar a introdução do HTLV-1aA no Brasil, durante o período pós-colombiano, foram estudadas 390 sequências LTR de diferentes regiões do mundo previamente publicadas no banco de dados: HTLV-1 *Molecular Epidemiology Database*. Em seguida foi realizado a caracterização de novos isolados de HTLV-1 circulando em Salvador, Bahia. Por fim, os doadores voluntários de sangue do Benim foram testados na triagem do HTLV por ELISA para avaliar a soroprevalência da infecção pelo HTLV. **RESULTADO E CONCLUSÕES:** Nosso estudo mostrou que há um agrupamento monofilético entre as sequências isoladas no Brasil com as sequências do sul da África, não sendo observada um agrupamento monofilético entre as sequências isoladas no Brasil e na região oeste da África, como já foi mostrado por estudos anteriores. Todas as sequências do genótipo "aA" se agruparam dentro do subtipo Transcontinental e foram identificados três grupos monofiléticos de interesse com valor de confiabilidade acima de 70%, confirmando a hipótese de múltiplas introduções do HTLV-1aA no Brasil. As análises de datação molecular dos grupos monofiléticos identificados mostraram uma introdução durante o período pós-colombiano do HTLV-1 aA no Brasil no ano de 1500. Neste estudo, 16 novas sequências LTR foram caracterizadas como pertencendo ao subtipo HTLV-1aA e uma introdução do HTLV-1 durante o período pós-colombiano foi confirmada, com o valor do tamanho efetivo da amostragem superior a 200. No total, 2035 doadores de sangue foram testados na triagem do HTLV onde 12 indivíduos foram identificados positivos, que foi estatisticamente significativo (IC95% 0.00259-0.00919; $p < 0.05$) e 7 foram indeterminadas (DO/CO $1 \ll 1.23$) para a infecção pelo HTLV. Nossos achados revelaram também a informação de que o sangue desses indivíduos positivos já foram transfundidos para alguns receptores, devido à falta do teste da triagem para o HTLV nos bancos de sangue em Benim. Os dados de epidemiologia do HTLV em Benim, obtidos neste estudo são extremamente relevantes para gerar as sequências do HTLV-1 isolados no Benim, afim de entender melhor a origem do HTLV-1aA no Brasil. A presença de casos com sorologia

positivos entre os doadores de sangue em Benim, nos chama atenção para a importância da inclusão da triagem do teste para HTLV, buscando evitar a disseminação desta infecção dentro da população deste país.

Palavras-chave: HTLV-1, LTR, Análise Filogenética, Período Pós-Colombiano, Doadores de Sangue, HTLV Transmissão e Prevenção.

AMOUSSA, Adjile Edjide Roukiyath. Origin of HTLV-1aA in Brazil: contribution of the African population in the introduction of the virus. 97 f. il. Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2018.

ABSTRACT

INTRODUCTION: To date, four types of HTLV have been isolated and described in the literature, only HTLV type 1 has been considered endemic in several regions of the world, mainly in Africa, Japan, Caribbean and in both American continents. In Brazil, this infection is most commonly found among the descendants of immigrants from countries where the infection is most endemic, for example, Japan and sub-Saharan Africa countries. The HTLV-1 subgroup "A" subtype "a" (HTLV-1aA) is the most frequent of all subgroups and has a larger number of LTR sequences available in Genbank and in the secondary databases. In order to understand the origin of HTLV-1aA in Brazil, several studies of phylogenetic analyses of the virus LTR region were performed, together with the characterization of the β -globin gene haplotypes of infected individuals. Some of these studies have suggested that there were a multiple introduction during the post-colombian period mainly through the migration of the African population in Brazil. According to historical data, most of the Africans who reached out Brazil are from the West African region. Finally, to clarify the absence of monophyletic grouping of the genotype "a" isolated from Brasil with the genotypes isolated in the West region of Africa, we need to obtain sequences isolated in Benin. According to historical data, Benin is a country that brought many Africans to Brazil during the slave trade. **AIM:** Investigate the possible origins of HTLV-1aA in Brazil from the infected populations of Africa. **MATERIAL AND METHODS:** Firstly, to confirm the introduction of HTLV-1aA in Brazil, during the post-colombian period, we studied 390 LTR sequences from different regions of the world previously published in the HTLV-1 Molecular Epidemiology Database. In a second part, the characterization of new HTLV-1 isolates from Salvador, Bahia was performed. Finally, we evaluated the seroprevalence of HTLV infection in Benin in volunteer blood donors tested on HTLV screening by ELISA. **RESULTS AND CONCLUSIONS:** Our study showed that there is a monophyletic grouping between the sequences isolated in Brazil and those from South Africa, but no a monophyletic grouping was observed between the sequences isolated in West region of Africa and those from Brazil, as already shown in previous studies. All "a" sequences were grouped in the Transcontinental subtype cluster and three subclusters of interest with a bootstrap value above 70% were identified, confirming the hypothesis of the multiple introductions of HTLV-1aA in Brazil. The molecular dating analyses of the identified clusters showed an introduction during the post-columbian period of HTLV-1aA in Brazil in year 1500. In this study, 16 new LTR sequences were characterized as belonging to the subtype HTLV-1aA and an introduction of HTLV-1 during the post-colombian period was confirmed, with an Effective Sample Size value over 200. In total, 2035 blood donors were tested for HTLV screening with 12 individuals were identified as positive, which was statistically significant (95%CI: 0.00259-0.00919; $p < 0.05$) and 7 were undetermined (DO/CO $1 \ll 1.23$) for HTLV infection. Our findings also revealed information that blood of these positive individuals are already being transfused to some recipients because of the lack of the HTLV screening test at blood banks in Benin. The HTLV epidemiology data from Benin, obtained in this study are extremely relevant of generating the HTLV-1 sequences isolated in Benin, in order to better understand the origin of HTLV-1aA in Brazil. In addition, the presence of HTLV positive cases within the donors in Benin, draws attention of the importance of including HTLV screening to prevent the spread of this infection within the population of this country.

Key words: HTLV-1, LTR, Phylogenetic Analysis, Post-Colombian Period, Blood Donors, HTLV Transmission and Prevention.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Classificação taxonômica da família <i>Retroviridae</i> , baseada nas relações de evolução.....	21
Figura 2: Representação esquemática da organização do genoma do HTLV-1	22
Figura 3: Representação esquemática da partícula do HTLV	25
Figura 4: Fluxograma para diagnóstico laboratorial do HTLV-1 e 2	29
Figura 5: Distribuição do HTLV-1 no mundo.	31
Figura 6: Prevalência do HTLV-1/2 em doadores de sangue de capitais de 26 estados e Distrito Federal brasileiro	32
Figura 7: Figura mostrando a prevalência do HTLV-1 na África e em Benim.	34
Figura 8: Figura mostrando a classificação dos subtipos e subgrupos do HTLV-1.....	35
Figura 9: Distribuição geográfica dos subtipos do HTLV-1 no mundo	37
Figura 10: Passos básicos envolvidos em qualquer investigação filogenética.....	44
Figura 11: Representação esquemática de uma árvore filogenética.....	45
Tabela 1: Métodos de construção de uma árvore filogenética.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3'	Região carboxi-terminal do ácido nucléico
5'	Região amino-terminal do ácido nucléico
ATL	Leucemia de Células T do Adulto (<i>Adult T-cell Leukemia</i>)
ATLV	Vírus da Leucemia de Células T de Adultos (<i>Adult T-cell Leukemia Virus</i>)
BLV	Vírus da Leucemia Bovina (<i>Bovine Leukemia Virus</i>)
CA	Capsídeo
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (<i>Enzyme Immune Assay</i>)
env	Envelope
gag	Grupo antigênico
gp21	Glicoproteína Transmembrana
gp46	Glicoproteína de superfície
HAM	Mielopatia Associada ao HTLV (<i>HTLV Associated Myelopathy</i>)
HBZ	HTLV-1 bZIP factor gene
HPD	<i>Highest Posterior Density</i>
HTLV-1	Vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1 (<i>Human T-cell Leukemia Virus type 1</i>)
HTLV-2	Vírus linfotrópico de células T humanas tipo 2 (<i>Human T-cell Leukemia Virus type 2</i>)
HTLV-3	Vírus linfotrópico de células T humanas tipo 3 (<i>Human T-cell Leukemia Virus type 3</i>)
HTLV-4	Vírus linfotrópico de células T humanas tipo 4 (<i>Human T-cell Leukemia Virus type 4</i>)
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana (<i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
IN	Integrase

IFA	Imunofluorescência (<i>Immunofluorescence</i>)
LLTA	Leucemia/linfoma de células T de adultos (<i>Adult T-cell leukemia/lymphoma</i>)
LTR	Extremidades em repetições longas (<i>Long Terminal Repeats</i>)
MA	Proteína da matriz
NC	Nucleocapsídeo
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	Fase de leitura aberta (<i>Open Reading Frame</i>)
PNH	Primatas não humanos (<i>Nonhuman Primates</i>)
P12, p30 e p13	Proteínas acessórias
p15	Proteína do nucleocapsídeo
p19	Proteína da matriz
p24	proteínas do capsídeo
pb	Pares de bases
pol	Polimerase
Pro	Protease
Px	Gene regulatório
PCR	Reação em cadeia da Polimerase (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
PTLV	Vírus Linfotrópico de Células T de Primatas (<i>Primates T-cell Lymphotropic Virus</i>)
PTLV-1	Vírus Linfotrópico de Células T de Primatas tipo 1 (<i>Primates T-cell Lymphotropic Virus type 1</i>)
PTLV-2	Vírus Linfotrópico de Células T de Primatas tipo 2 (<i>Primates T-cell Lymphotropic Virus type 2</i>)
PTLV-3	Vírus Linfotrópico de Células T de Primatas tipo 3 (<i>Primates T-cell Lymphotropic Virus type 3</i>)

Rex	Proteína reguladora da expressão do HTLV
RIPA	Radioimunoprecipitação (<i>Radioimmunoprecipitation</i>)
RNA	Acido ribonucleico (<i>Ribonucleic acid</i>)
STLV	Vírus Linfotrópico de Células T de Símios (<i>Simian T-cell Lymphotropic virus</i>)
STLV-1	Vírus Linfotrópico de Células T de Símios tipo 1 (<i>Simian T-cell Lymphotropic virus type 1</i>)
STLV-2	Vírus Linfotrópico de Células T de Símios tipo 2 (<i>Simian T-cell Lymphotropic virus type 2</i>)
STLV-3	Vírus Linfotrópico de Células T de Símios tipo 3 (<i>Simian T-cell Lymphotropic virus type 3</i>)
SU	Proteína de superfície
Tax	Proteína de transativação
TMRCA	Tempo de divergência em anos do ancestral comum mais recente (<i>Time of most recent common ancestor</i>)
TSP	Paraparesia Espástica Tropical (<i>Tropical Spastic Paraparesis</i>)
TSP/HAM	Paraparesia Espástica Tropical/ Mielopatia Associada ao HTLV-1 (<i>HTLV-1 associated myelopathy/ tropical spastic paraparesis</i>)
TM	Proteína transmembrana
TR	Transcriptase reversa (<i>Reverse transcriptase</i>)
WB	Teste sorológico confirmatório para infecção pelo HTLV-1 (<i>Western Blot</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	PROPRIEDADES GERAIS DO HTLV	16
1.1.1	<i>Descoberta do HTLV.....</i>	16
1.1.2	<i>HTLV e patologias associadas</i>	18
1.1.3	<i>Classificação e taxonomia do HTLV.....</i>	19
1.1.4	<i>Organização genômica do HTLV</i>	21
1.1.4.1	Genes Estruturais.....	22
1.1.4.2	Genes Regulatórios.....	23
1.1.4.3	Região promotora.....	24
1.1.5	<i>Morfologia do HTLV.....</i>	24
1.1.6	<i>Vias de transmissão do HTLV</i>	25
1.2	DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO E MOLECULAR	27
1.2.1	DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO	27
1.2.2	<i>Diagnóstico molecular.....</i>	28
1.3	EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO PELO HTLV-1	30
1.3.1	<i>Distribuição no mundo</i>	30
1.3.2	<i>Distribuição no Brasil e em Salvador</i>	31
1.3.3	<i>Distribuição na África e no Benim.....</i>	33
1.4	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DOS SUBTIPOS DO HTLV-1	35
1.5	HIPÓTESES DA ORIGEM DO HTLV-1AA NO BRASIL	37
1.6	HISTÓRIA DO TRÁFICO TRANSATLÂNTICO	39
1.7	INTRODUÇÃO SOBRE OS MÉTODOS FILOGENÉTICAS	40
1.7.1	<i>Análises filogenéticas</i>	41
1.7.2	<i>Inferência filogenética.....</i>	44
2	JUSTIFICATIVA	50
3	OBJETIVOS	52
3.1	GERAL	52
3.2	ESPECÍFICOS	52
4	RESULTADOS.....	53
4.1	CAPITULO I.....	54
4.2	CAPITULO II.....	62
4.3	CAPITULO III.....	75
5	DISCUSSÃO	89
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	93
	REFERÊNCIAS	94
	ANEXOS	107

1 INTRODUÇÃO

1.1 PROPRIEDADES GERAIS DO HTLV

1.1.1 *Descoberta do HTLV*

O vírus linfotrófico de células T humanas tipo 1 (HTLV-1), o primeiro retrovírus humano descrito é o agente etiológico de várias doenças humanas. Apesar da identificação de outros três tipos (HTLV-2; HTLV-3; HTLV-4), o HTLV-1 é o mais encontrado nas regiões endêmicas ao redor do mundo. A descrição do HTLV-1 ocorreu pela primeira vez em torno dos anos 1980 nos Estados Unidos da América, onde ele foi isolado a partir de sobrenadante de linfócitos de um paciente afro-americano com leucemia/linfoma de células T de adultos (LLTA) (POIESZ et al., 1980; GALLO, 2005). Poucos anos antes, em 1977, Uchiyama e colaboradores descreveram 16 casos de um novo tipo de leucemia, que tipicamente ocorria na fase adulta. Estes casos foram descobertos no Japão, na população de Kyushu (região sudoeste do país) e esta patologia foi denominada de Leucemia de Células T do Adulto (ATL) (UCHIYAMA et al., 1977). As características epidemiológicas da ATL em 1981 no Japão sugeriam um fator ambiental, o que levou a detecção e descrição de antígenos virais em células cancerígenas de indivíduos com esta doença. Este vírus foi chamado de vírus da leucemia de células T de adultos (ATLV) (HINUMA et al., 1981). Posteriormente, estudos demonstraram que o HTLV e ATL se tratavam do mesmo vírus já descrito nos Estados Unidos, sendo então denominado HTLV-1 (POPOVIC et al., 1982). Paralelamente, em 1983 foi estabelecida a associação causal entre a ATL e o HTLV-1 baseado na detecção das partículas do HTLV em pacientes com a Leucemia/Linfoma de Células T do Adulto (GALLO et al., 1983). A associação entre a infecção pelo HTLV-1 e essa doença foi então estabelecida, tornando o HTLV-1, o agente etiológico da leucemia/linfoma de células T do adulto (LLTA) (POIESZ et al., 1980; YOSHIDA et al., 1982).

Três anos mais tarde, a partir de estudos sorológicos e epidemiológicos realizados nas Antilhas Francesas, a infecção pelo HTLV-1 também foi associada à doenças neurológicas crônicas como paraparesia espástica tropical (TSP) e mielopatia associada ao HTLV (HAM), as quais em 1988, foram admitidas por Román e Osame, serem manifestações complementares, hoje conhecida como HAM/TSP (GESSAIN, 1985; OSAME et al., 1986). Posteriormente, o HTLV-1 foi associado a outras doenças inflamatórias, como dermatite infecciosa em crianças, doenças reumáticas como síndrome de Sjögren e artrite reumatóide; e

ao aumento da susceptibilidade a infecções por micobactéria e por helmintos (PROIETTI et al., 2005; GONÇALVES et al., 2010).

Apesar de ser associado a diversas patologias, a maioria dos indivíduos infectados não desenvolvem doenças associadas ao HTLV-1. Ainda não se sabe o mecanismo pelo qual um portador assintomático evolui para a forma sintomática. Entretanto, vários estudos têm demonstrado que fatores virais e do hospedeiro, como idade, gênero, via da infecção, fatores imunológicos e genéticos, além de fatores ambientais devem estar envolvidos no desenvolvimento de doença (GONÇALVES et al., 2010).

O vírus linfotrófico de células T humanas tipo 2 (HTLV-2) foi descoberto em 1982, quando foi isolado de um paciente com leucemia de células pilosas (KALYANARAMAN et al., 1982). No Brasil, este vírus tem sido encontrado em populações indígenas da Amazônia, usuários de drogas injetáveis das grandes áreas urbanas e doadores de sangue (ANDRADE; DOURADO; GALVÃO-CASTRO, 1998). Entretanto, a associação do HTLV-2 com a manifestação clínica não foi demonstrada até o momento, apesar que alguns estudos têm avaliado possível associação com o desenvolvimento de doenças neurológicas semelhantes a HAM/TSP (ROUCOUX; MURPHY, 2004; PROIETTI et al., 2005).

Em 2005, foi descrito o vírus linfotrófico de células T humanas tipo 3 (HTLV-3) em dois indivíduos assintomáticos com resultado positivo no teste sorológico de ELISA, mas com diagnóstico indeterminado no teste de Western Blot. Esses indivíduos eram nativos do sul do Camarões, na África Central, que tinham como principal atividade, a caça de primatas não humanos (PNH) como macacos, chimpanzés e gorilas (CALATTINI et al., 2005). No mesmo ano, foi isolado outro tipo viral, o vírus linfotrófico de células T humanas tipo 4 (HTLV-4), com perfil semelhante ao descrito para o HTLV-3, sendo proveniente de um caçador da mesma região (WOLFE et al., 2005). A análise das amostras revelou que o HTLV-3 e o HTLV-4 apresentam uma reação cruzada com HTLV-1 e HTLV-2 respectivamente (WOLFE et al., 2005; MAHIEUX; GESSAIN, 2011). Apesar da estreita relação dos genomas do HTLV-3 e HTLV-4 com o genoma do HTLV-1 e das prováveis semelhanças nos processos de replicação, patogênese e transmissão, nenhuma doença em humanos foi relacionada aos tipos recentemente identificados (CALATTINI et al., 2005; BAGOSSI et al., 2009).

1.1.2 HTLV e patologias associadas

O HTLV é um retrovírus que já infectou os seres humanos há milhares de anos, mas o conhecimento sobre a infecção e sua patogênese está apenas emergindo recentemente.

O HTLV-1 foi inicialmente associado com a leucemia/linfoma de células T do Adulto (ATLL), primeira manifestação clínica humana identificada como sendo causada por um retrovírus (YOSHIDA et al., 1982). Posteriormente, a infecção pelo HTLV-1 foi associada com as patologias neurológicas paraparesia espástica tropical (TSP) e mielopatia associada ao HTLV (HAM) (GESSAIN, 1985), admitidas como manifestações complementares, uma síndrome neurológica, hoje conhecida como HAM/TSP. Ele foi associado também a outras patologias, como dermatite infecciosa em crianças (LA GRENADE, 1996), uveíte (MOCHIZUKI et al., 1996), doenças reumáticas como síndrome de Sjögren e artrite reumatóide; e ao aumento da susceptibilidade a infecção por helmintos. Apesar de ser associado a diversas patologias, poucos indivíduos infectados irão apresentar alguma sintomatologia associada ao vírus.

A Leucemia/Linfoma de células T do Adulto (ATLL) é uma neoplasia de linfócitos T maduros, que ocorre devido à expansão monoclonal dos linfócitos T infectados (YOSHIDA et al., 1982). Ela é causada principalmente pela inibição das proteínas relacionadas ao reparo do dano ao DNA, além da aceleração de fases do ciclo celular por proteínas virais. A anemia, neutropenia, ou trombocitopenia ocorre raramente em pacientes com ATLL, enquanto pancitopenia ocorre em alguns pacientes devido à infiltração das células malignas em alguns tecidos da medula óssea (MATSUOKA, 2005). A doença ATLL ocorre predominantemente na faixa etária de 40-70 anos, com a idade média de início sendo cerca de 58 anos (TAKATSUKI et al., 1994). A idade média para o início dos sintomas em pacientes com ATLL no Caribe e África são de 43 anos, enquanto para os pacientes japoneses são de 58 anos idade (EDLICH; ARNETTE; WILLIAMS, 2000).

A ATLL é clinicamente dividida em quatro subtipos: aguda, linfomatosa, crônica e latente. Nas formas mais agressivas (aguda e linfomatosa), a metade dos pacientes apresentam fragilidade da pele, ossos e múltiplas lesões viscerais; infiltrado pulmonar; hipercalcemia; hepatomegalia; esplenomegalia; e linfadenopatia. Na forma linfomatosa, nódulos linfáticos superficiais ou profundos estão envolvidos. Na forma latente ou crônica, os sintomas são inespecíficos, não há envolvimento de massa tumoral, com pápulas, placas, tumor, ou

eritroderma de longa evolução (CARNEIRO-PROIETTI et al., 2006). A maioria dos pacientes com ATLL têm níveis elevados de Lactato Dehidrogenase sérica (LDH) e hipercalcemia. Além disso, a hipercalcemia e níveis de HDL elevados são característicos de um estado de doença avançada ou agressivo. Por conseguinte, estas medições são utilizadas para controlar a evolução do tumor ou atividade da doença (EDLICH; ARNETTE; WILLIAMS, 2000).

A HAM/TSP, por sua vez, caracteriza-se por uma doença neurológica crônico-degenerativa que atinge o sistema nervoso central, causando principalmente, a paraparesia dos membros inferiores, espasticidade e hiperreflexia (GESSAIN, 1985; OSAME et al., 1986). A HAM / TSP atinge principalmente os pacientes adultos (média de 40 anos), com predomínio no sexo feminino. Ela pode ser encontrada em áreas tropicais em desenvolvimento (África, Caribe e América do Sul) e zonas temperadas (Japão), com prevalência variando de 0,2% a 5% entre os portadores do HTLV-1. Ela é caracterizada clinicamente por paraparesia espástica e distúrbio na marcha, frequentemente associada com bexiga e disfunção sensorial. Os sinais de movimentações não existem apenas nos membros inferiores, mas também nos membros superiores. Na história natural da doença, após um período de anos ou décadas, alguns pacientes precisam de cadeira de rodas, e cerca de 30% e podem tornar-se acamados e morrer de infecções intercorrentes (CARNEIRO-PROIETTI et al., 2006).

O HTLV-2 foi associado com manifestações clínicas que são semelhantes a alguns casos esporádicos de doenças neurológicas de HAM/TSP (MURPHY et al., 1997). O HTLV tipos 3 e 4 foram encontrados em populações de África Central, e não foram ainda associadas com nenhuma doença em seres humanos.

1.1.3 Classificação e taxonomia do HTLV

Os retrovírus podem ser classificados de acordo com a morfologia da partícula viral ou com a homologia entre as sequências que se tornam evidentes após análises filogenéticas. Baseada na organização genômica e na filogenia, a família *Retroviridae* é dividida em sete gêneros: *Alpharetrovirus*, *Betaretrovirus*, *Gammaretrovirus*, *Deltaretrovirus*, *Epsilonretrovirus*, *Lentivirus* e *Spumavirus* (Figura 1) (VAN-DOOREN, 2005). Todos os tipos virais do HTLV pertencem à família *Retroviridae*, subfamília *Oncovirinae*, e gênero *Deltaretrovirus*, classificados juntamente com os seus correspondentes não humanos, o Vírus Linfotrópico de Células T de Símios (STLV) tipos 1, 2, e 3 e o Vírus da Leucemia Bovina (BLV) (MATSUOKA; JEANG, 2007). Todos os tipos virais que infectam os primatas

humanos e não humanos foram convenientemente classificados no grupo do Vírus Linfotrófico de Células T de Primatas (PTLV) (KORALNIK et al., 1994; MAHIEUX et al., 1997; SLATTERY; FRANCHINI; GESSAIN, 1999; MEERTENS et al., 2001). Este grupo é subdividido em PTLV-1, PTLV-2 e PTLV-3, que incluem HTLV-1, HTLV-2 e HTLV-3, e seus análogos STLV-1, STLV-2 e STLV-3, os quais infectam primatas humanos e não humanos, respectivamente. O HTLV-4 é um membro de uma linhagem filogenética distinta de todos os outros tipos virais HTLV e STLV, previamente conhecidos. Assim, a origem do HTLV-4 não é clara, visto que ele não tem um correspondente primata conhecido até o momento (CALATTINI et al., 2005; WOLFE et al., 2005; SWITZER et al., 2009; GESSAIN et al., 2013).

A transmissão interespecies dos retrovírus entre primatas não humanos e humanos já foi descrita em algumas infecções zoonóticas por retrovírus. Isso se deve pelo contato entre primatas não-humanos infectados por retrovírus e humanos durante sua convivência no ambiente doméstico, durante a caça ou durante o consumo de carne de primatas não humanos (SLATTERY; FRANCHINI; GESSAIN, 1999; COURGNAUD et al., 2004; CARNEIRO-PROIETTI et al., 2014). Essas transmissões zoonóticas teriam ocorrido nos continentes africano e asiático favorecida pela existência de diversas espécies de primatas não humanos habitando o velho mundo. A hipótese das transmissões zoonóticas estão confirmadas com os aspectos moleculares e biológicos do HTLV e do STLV que são muito similares (descoberta de uma forte similaridade na sequência gp21 entre STLV-1 e HTLV-1 nos indivíduos originados da África Central). Após essa transmissão interespecies, o HTLV se disseminou dentro da população humana através de diversos mecanismos particulares, principalmente pelas migrações dos indivíduos infectados.

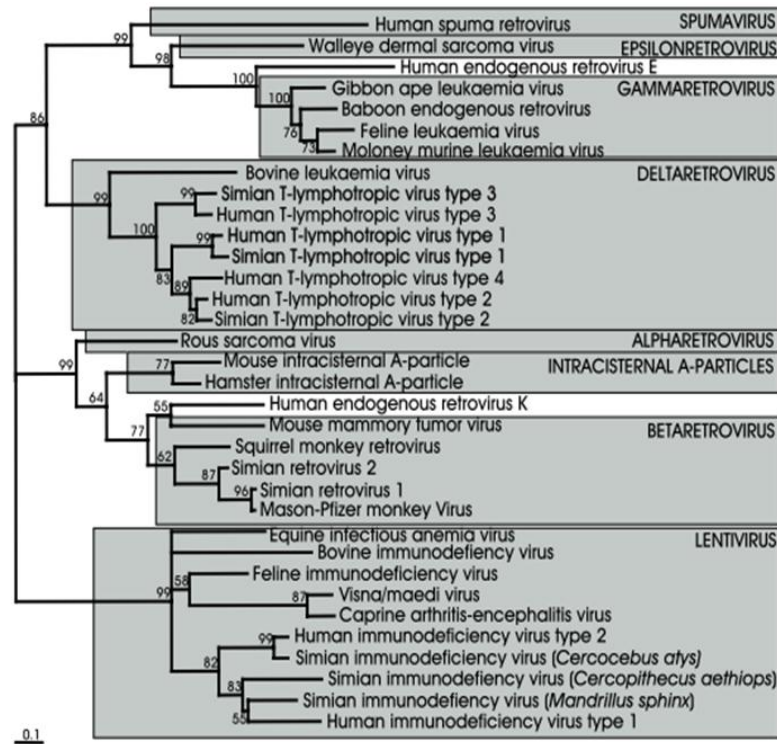


Figura 1: Classificação taxonômica da família *Retroviridae* baseada nas relações de evolução. (VAN-DOOREN, 2005).

1.1.4 Organização genômica do HTLV

O genoma do HTLV-1 possui um tamanho em torno de 9032 pares de base (pb) (SEIKI et al., 1983) e é composto por duas fitas simples de RNA, que codificam as regiões principais que são os genes estruturais *gag* (grupo antigênico), *pro* (protease), *pol* (polimerase), *env* (envelope) e uma região regulatória conhecida como Px. Em ambas as extremidades (5' e 3') do genoma se localiza a região promotora que são as sequências de repetições terminais longas (LTR – *long terminal repeat*), que exercem uma função essencial na incorporação do DNA proviral ao genoma da célula hospedeira, bem como na regulação da transcrição de genes virais. No processo de transcrição, três moléculas de mRNA são produzidas: A transcrição a partir da região LTR 5' gera uma molécula de mRNA genômica completa (9kb), utilizada para a síntese dos produtos dos genes *gag*, *pro*, e *pol*. Um RNA subgenômico (4kb) é sintetizado a partir de uma etapa única de processamento da molécula de RNA completa, e codifica as glicoproteínas do envelope viral (*env*). Da mesma forma, outra molécula de RNA (2kb) é gerada após a remoção de dois *íntrons*, e codifica para as proteínas regulatórias da região pX, com pelo menos, quatro fases de leitura aberta (*Open Reading Frame-ORF*) (Figura 2).

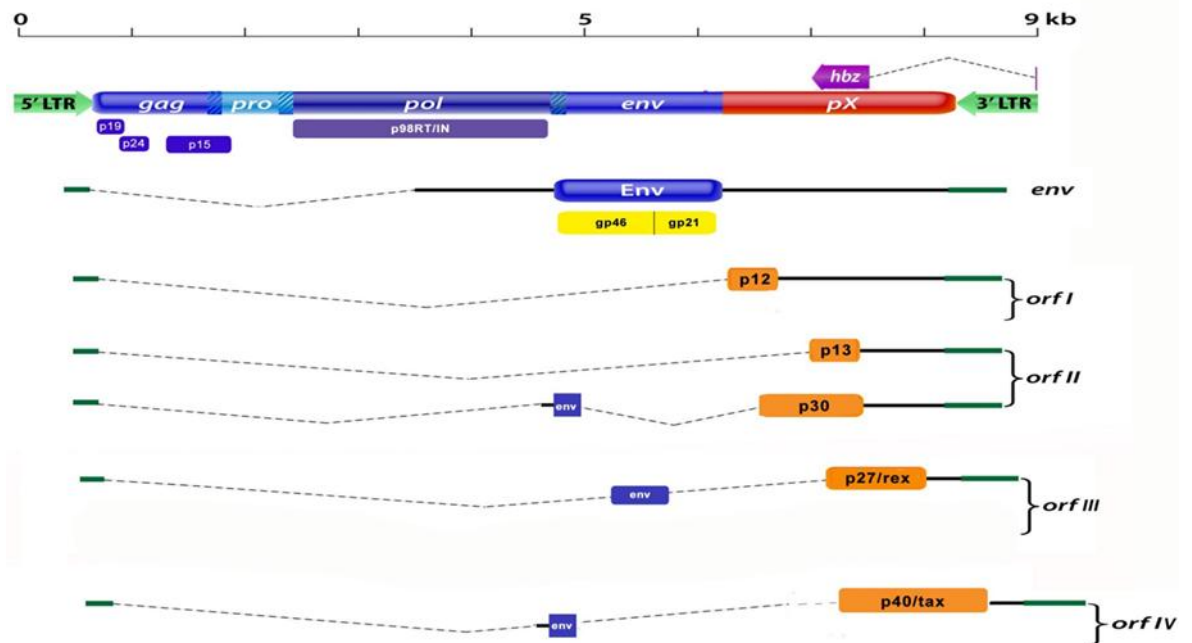


Figura 2: Estrutura genômica do HTLV-1 e os diferentes tipos de RNA. (EDWARDS et al., 2011).

1.1.4.1 Genes Estruturais

O gene *gag* corresponde aos nucleotídeos 802 a 2019 no genoma do HTLV-1, e essa região é inicialmente traduzida como um precursor (p55), que após a clivagem origina as proteínas da matriz (p19), proteínas do capsídeo (p24), e a proteína do nucleocapsídeo (p15). A extremidade 3' do gene *gag* sobrepõe-se ao início do gene *pro*, que compreende a posição 2052 a 2755 no genoma do HTLV-1. O gene *pro* codifica a enzima protease (PR), que atua no processo de clivagem das cadeias polipeptídicas originando proteínas maduras (JOHNSON et al., 2001).

O gene *pol*, por sua vez, localiza-se na posição 2497 a 5187 no genoma do HTLV-1, e é responsável por codificar enzimas importantes, como a transcriptase reversa (TR), que atua na síntese do DNA viral a partir da molécula de RNA, e a integrase (IN), fundamental no processo de integração do DNA viral ao genoma da célula hospedeira (CARNEIRO-PROIETTI et al., 2006).

O gene *env* corresponde a sequência de nucleotídeos localizada na posição 5180 a 6647 no genoma do HTLV-1, e assim como o gene *gag*, codifica inicialmente um precursor. Esse precursor (gp63) é clivado entre a posição 6117-6118 para gerar uma glicoproteína transmembrana (gp21) e uma glicoproteína de superfície (gp46). Assim como em outros

retrovírus, a glicoproteína transmembrana ancora, através de associações não covalentes, a glicoproteína de superfície na bicamada lipídica do envelope. Dessa forma, a gp21 e gp46 ficam expostas ao sistema imune e, conseqüentemente, estão associadas à resposta humoral e celular (MANEL et al., 2004).

1.1.4.2 Genes Regulatórios

A região pX do genoma do HTLV-1 contem quatro fases abertas de leitura (ORFI, II, III e IV) que codificam diferentes proteínas regulatórias e acessórias p12^I, p13^{II} e p30^{II}, Rex^{III}, e Tax^{IV} e a HBZ codificada pela fita negativa. Estudos do papel funcional destas proteínas acessórias demonstram que eles são importantes durante os mecanismos de replicação viral (EDWARDS et al., 2011). As proteínas acessórias p12 (ORFI), p13 e p30 (ORFII) contribuem para a infectividade viral, manutenção de altas cargas virais, ativação das células do hospedeiro e regulação da transcrição gênica (BINDHU et al., 2004).

Já a ORF III codifica uma importante proteína regulatória, denominada proteína Rex. Essa proteína é considerada essencial para a regulação da expressão gênica viral através de eventos pós-traducionais. Rex é indispensável para a eficiente multiplicação, infecção e disseminação viral, além de regular a indução das diferentes fases do ciclo celular do HTLV-1 (YOUNIS; GREEN, 2005).

A ORF IV, por sua vez, codifica a proteína regulatória viral mais importante, pois atua como agente principal no desenvolvimento de diversas patologias associadas ao HTLV-1. Essa proteína, denominada proteína Tax, é essencial para a replicação viral e para a transformação celular, através da sua interação com fatores de transcrição celulares com a região LTR (PROIETTI, 2006). Tax pode ser encontrada tanto no núcleo, como no citoplasma da célula e, além de regular a transcrição viral, pode aumentar a expressão de citocinas e receptores envolvidos no crescimento e proliferação celular (SMITH; GREENE, 1992; TSCHACHLER et al, 1993). Da mesma forma, Tax é capaz de reprimir a ação de genes celulares envolvidos na inibição do crescimento celular, bem como inibir o reparo do DNA e os eventos de apoptose (FRANCHINI, 1995).

É importante ressaltar que além de regular processos virais, a proteína Tax e a proteína Rex podem interferir em funções da célula hospedeira, ao afetar a transcrição e tradução de diversos genes endógenos (FRANCHINI, 1995).

Recentemente, foi identificado na região pX o gene HTLV-1 bZIP *factor gene* (HBZ), codificado pela fita negativa, sobre o controle da região LTR 3' (MATSOUKA; GREEN, 2009). Estudos sugerem que o HBZ pode atuar tanto como molécula de RNA, quanto em sua forma protéica, e tem como principal função a regulação da transcrição viral, e o aumento da proliferação das células T (MESNARD et al, 2006). Além disso, a proteína HBZ inibe a transativação da transcrição viral mediada por Tax, por se heterodimerizar com fatores de transcrição da família CREB (MATSOUKA, 2005).

1.1.4.3 Região promotora

As extremidades do genoma são flanqueadas por duas regiões repetidas, sem função codificante denominadas LTR (*Long Terminal Repeats*) e são constituídas pelas regiões U3, R e U5 que contêm sinais importantes para o controle da expressão dos genes virais. Essas duas regiões LTR localizadas nas extremidades 5' e 3' são essenciais na integração do DNA proviral dentro do DNA cromossômico do hospedeiro e também na regulação transcricional do genoma do HTLV (GREEN; CHEN, 2001).

Uma análise detalhada do genoma proviral do HTLV-1 demonstra que o vírus possui uma alta estabilidade genética quando comparado aos outros retrovírus portanto as regiões LTR e *env* do HTLV-1 apresentam uma ampla variabilidade e por isso são as regiões mais utilizadas em estudos filogenéticos investigando a origem e a evolução do vírus (GESSAIN; GALLO; FRANCHINI, 1992; SANTOS ; LIMA, 2005). Assim, esta alta estabilidade genética do genoma do HTLV-1 quando comparado a outros retrovírus (GESSAIN et al., 1992), tem dado suporte aos estudos de evolução e as vias de disseminação deste vírus, bem como sobre os movimentos migratórios de populações humanas infectadas para monitoramento da transmissão do vírus afim de tomar medidas preventivas (SLATTERY; FRANCHINI; GESSAIN, 1999; ALCANTARA et al., 2003).

1.1.5 Morfologia do HTLV

O HTLV é uma partícula viral esférica com diâmetro que varia entre 80 a 100 nanômetros (nm) (OHTSUKI et al., 1982). A partícula viral contém um envelope, uma matriz proteica e um nucleocapsídeo (NC). O envelope representa a superfície do vírion e é constituído por duas subunidades proteicas glicosiladas: a proteína de superfície (SU), denominada gp46, e a proteína transmembrana (TM), denominada gp21, que ancora a gp46. Logo após o envelope, encontra-se a proteína da matriz (MA), seguida do capsídeo (CA), que

apresenta simetria icosaédrica e é composto pelas proteínas codificadas a partir do gene *gag*. No interior do capsídeo encontra-se o genoma viral, composto por duas fitas simples idênticas de RNA (ssRNA) com polaridade positiva, associadas às proteínas do nucleocapsídeo (JOHNSON et al., 2001; POIESZ et al., 2003). Outras proteínas estão presentes no interior do capsídeo, como a transcriptase reversa (TR) e a integrase (IN), essenciais para o processo de integração viral (Figura 3) (POIESZ et al., 2003; VAN-DOOREN, 2005).

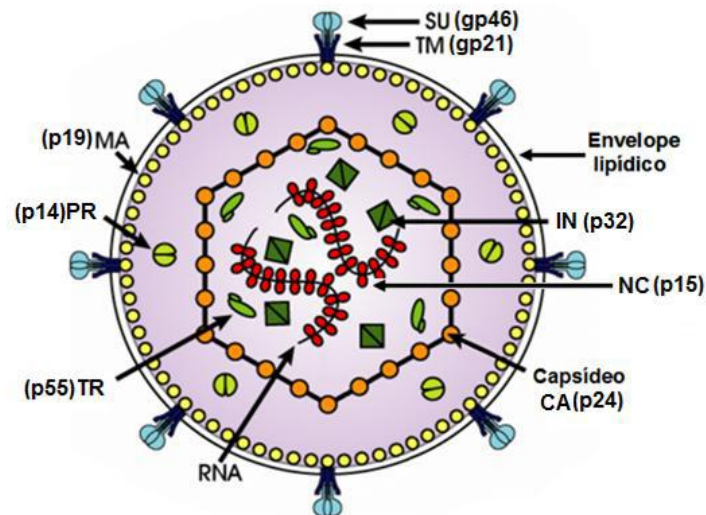


Figura 3: Representação esquemática da partícula do HTLV. (VAN-DOOREN, 2005).

1.1.6 Vias de transmissão do HTLV

A transmissão do HTLV ocorre por duas vias principais: (1) a transmissão por via vertical que pode ocorrer da mãe para filho durante o período perinatal, ou principalmente pelo leite materno e (2) a transmissão por via horizontal ocorre durante as relações sexuais desprotegidas, transfusão de componentes celulares sanguíneos não testados, e durante o compartilhamento de agulhas ou seringas entre os usuários de drogas injetáveis (PROIETTI et al., 2005; GONÇALVES et al., 2010). O risco da infecção por aleitamento materno está diretamente relacionado à duração do aleitamento do neonato. A amamentação prolongada por um período superior a seis meses e a alta carga proviral no leite materno são geralmente considerados fatores de riscos para transmissão do HTLV (ISHAK et al., 2001). Sexo sem proteção, múltiplos parceiros sexuais, presença de ulcerações genitais e sexo pago aumentam o risco da transmissão sexual (BARTHOLOMEW et al., 1987; BELZA, 2004).

A eficiência da transmissão do HTLV por via horizontal através da exposição à hemoderivados está associada a transfusão de hemocomponentes sem rastreamento prévio de

anticorpos contra este retrovírus, e ao compartilhamento de seringas ou agulhas infectadas utilizadas entre usuários de drogas injetáveis. Em áreas onde o HTLV-1 é endêmico, a soroconversão foi observada em 15-60% dos casos de indivíduos que receberam hemocomponentes infectados pelo HTLV-1 (OKOCHI; SATO; HINUMA, 1984). Sabendo-se que a transfusão sanguínea é considerada como a forma mais eficiente da transmissão do vírus, a inclusão da triagem para o HTLV em bancos de sangue para qualificação dos doadores voluntários de sangue é essencial para o controle da transmissão parenteral. A transmissão por exposição à hemocomponentes passou a ser controlado com a implementação da triagem sorológica obrigatória para HTLV nos bancos de sangue em vários países como Japão, Estados Unidos, Canadá, Caribe, França, Austrália, Dinamarca, Portugal, Grécia e certas ilhas das Índias Ocidentais. No Brasil, a triagem sorológica para o HTLV nos bancos de sangue tornou-se obrigatória em 1993 pela portaria nº1376 do Ministério da Saúde (SATAKE; YAMAGUCHI; TADOKORO, 2012).

Apesar de a África Subsaariana ser uma das regiões com um grande número de indivíduos infectados pelo HTLV, em alguns países o processo da triagem do vírus em doadores voluntários de sangue ainda não é uma realidade. Portanto, um dos principais desafios dos países africanos é disponibilizar produtos sanguíneos com qualidade de acordo com as normas da Organização Mundial da Saúde (OMS). Estudos foram realizados em alguns países como em Mali, Nigéria e África do Sul nos bancos de sangue respectivos para mostrar o risco de transmissão do HTLV por transfusão sanguínea a fim de melhorar o sistema de transfusão sanguínea nestes países (TERRY et al., 2011; EK et al., 2015; DIARRA et al., 2014; PARUK ; BHIGJEE, 2015).

A incompreensão do HTLV como um agente infeccioso e responsável pelo desenvolvimento de diversas patologias é uma das principais causas de risco de transmissão do vírus em certas regiões. Considerando a possibilidade da transmissão do HTLV através de transfusão de sangue, o monitoramento eficiente entre os doadores de sangue e receptores constituem uma importante componente de um sistema de hemovigilância (LOPES; PROIETTI, 2008). O rastreamento dos doadores de sangue para as infecções transmissíveis é fundamental para reduzir o risco de transmissão do HTLV através da transfusão de sangue não testado. Assim, os serviços de transfusão devem estabelecer sistemas eficientes para assegurar que somente o sangue analisado e livre de agentes infecciosos sejam liberados para a utilização clínica.

1.2 DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO E MOLECULAR

A resposta imune a determinantes antigênicos encontrados nas proteínas virais pode ser mensurada por diversos sistemas para detecção de anticorpos que são produzidos para reagir contra elas. Partindo deste pressuposto, o diagnóstico da infecção pelo HTLV-1/2 requer tanto a habilidade de detectá-lo como a capacidade de diferenciar os dois tipos. A detecção, a confirmação e a diferenciação podem ser realizadas utilizando o diagnóstico sorológico. Os métodos utilizados para o diagnóstico sorológico no teste de triagem são o ensaio imunoenzimático/enzyme linked immunosorbent assay-ELISA ou ensaio de aglutinação em partículas de látex ou gelatina. Os métodos sorológicos como testes de confirmação e diferenciação da positividade são o Western Blot (WB), imunofluorescência (IFA) ou radioimunoprecipitação (RIPA). Porém, a confirmação da infecção nem sempre é possível utilizando os testes sorológicos e confirmatórios citados.

Devido a evolução e a disponibilidade das técnicas de biologia molecular, as amostras reagentes, não diferenciadas ou indeterminadas no diagnóstico sorológico podem ser submetidas ao diagnóstico molecular que possibilita tanto a confirmação quanto a diferenciação entre HTLV-1/2 (WILLIAMS et al., 2000; GESSAIN, 2011) (Figura 3). Os métodos de biologia molecular para confirmação e diferenciação da infecção pelo HTLV-1/2 são: a reação em cadeia da polimerase (PCR) e a técnica de PCR em tempo real. Essa última é capaz de detectar o DNA do HTLV e quantificar o número de cópias presente na amostra, sendo importante no prognóstico das doenças associadas ao HTLV (GRASSI et al., 2011).

1.2.1 DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

O ELISA é um teste de triagem que geralmente utiliza lisado de células infectadas com HTLV-1 purificado, podendo ser acrescido de proteínas recombinantes da região do envelope, o que aumenta a sensibilidade do teste. Ele é o teste mais utilizado na triagem sorológica do HTLV principalmente em bancos de sangue. A técnica de ELISA consiste em antígenos específicos que são adsorvidos a uma placa de poliestireno e a reação é revelada após a incubação do soro do indivíduo a um conjugado anti-IgG humano marcado com uma enzima. Os resultados da reação de ELISA são determinados pela leitura da densidade óptica (DO), dependendo da cor da intensidade gerada pela reação enzimática, através de um espectrofotômetro. As reações são interpretadas como reagentes, não reagentes ou

indeterminadas a partir do valor de ponto de corte ou *cut-off* (CO). Usualmente, cada fabricante dos reagentes utilizados, indica como calcular o ponto de corte. Entretanto alguns estudos consideram os valores de DO/CO para interpretação das reações (ANDRADE et al., 2010). Se um resultado é positivo no teste inicial, este é repetido, e as amostras com resultados repetidamente reativos são submetidos aos testes confirmatórios (CARNEIRO-PROIETTI, 2015). As infecções recentes podem não ser identificadas, uma vez que a quantidade de anticorpos específicos nem sempre são suficientes para sua detecção (SANTOS; LIMA, 2005; BERINI et al., 2008). Os testes de terceira geração (testes com antígenos recombinantes) possuem sensibilidade superior a 96,5% e especificidade maior que 92,9% para detecção de HTLV-1/2, porém, não ocorre a distinção da infecção por HTLV-1 ou HTLV-2 (JACOB et al., 2007, 2009).

As reações de aglutinação são ensaios sorológicos, caracterizados pela presença de partículas de gelatina ou látex sensibilizadas com antígenos inativados, capazes de se aglutinarem na presença de anticorpos específicos presentes no soro ou plasma. Assim como o teste de ELISA, as reações de aglutinação são altamente específicas e sensíveis e também não são capazes de discriminar o HTLV-1 do HTLV-2 (SATAKE; YAMAGUCHI; TADOKORO, 2012).

A confirmação da positividade pode ser realizada por testes sorológicos como Western Blot (WB), imunofluorescência (IFA) ou radioimunoprecipitação (RIPA), sendo o WB é o mais utilizado. Este teste permite distinguir a infecção pelo HTLV-1 da infecção pelo HTLV-2, pois possui uma fita de nitrocelulose com proteínas recombinantes antigênicas para anticorpos específicos tanto para o HTLV-1 (MTA-1) quanto para o HTLV-2 (K-55).

Porém, em casos onde esta distinção não é obtida, os testes moleculares são utilizados particularmente nos casos de sorologia indeterminada, o que ocorre constantemente na sorologia, além dos casos considerados positivos e não tipados ou nos casos que ocorrem reação cruzada dos anticorpos de um tipo de HTLV com os antígenos do outro tipo.

Os testes moleculares detectam o DNA proviral, extraído de células mononucleares do sangue periférico, uma vez que há pequena circulação de RNA do vírus no plasma.

1.2.2 Diagnóstico molecular

Dentre as técnicas de biologia molecular, a mais utilizada para a detecção do genoma do HTLV no sangue ou em outros tecidos, é a reação em cadeia da polimerase (PCR), que

amplifica sequências específicas no genoma viral, utilizando iniciadores correspondente às regiões conservadas do genoma, como tax/rex. Essa técnica apresenta maior especificidade e sensibilidade que os métodos sorológicos, por isso é capaz de confirmar e discriminar os dois tipos virais, que possuem aproximadamente 70% de similaridade na sequência de nucleotídeos (COSTA; MAGRI; CATERINO-DE-ARAÚJO, 2011). Nessa técnica não há dependência da presença de anticorpos e a identificação do vírus pode ser precoce. O uso do PCR é a ferramenta ideal para a diferenciação, pois além de sua grande sensibilidade, a sequência de nucleotídeos dos produtos amplificados pode ser facilmente determinada, permitindo diagnóstico preciso do tipo de infecção. A determinação da verdadeira prevalência da infecção pelo HTLV-1/2 pode requerer uma combinação de testes sorológicos para triagem e técnicas moleculares para confirmar e diferenciar os tipos virais.

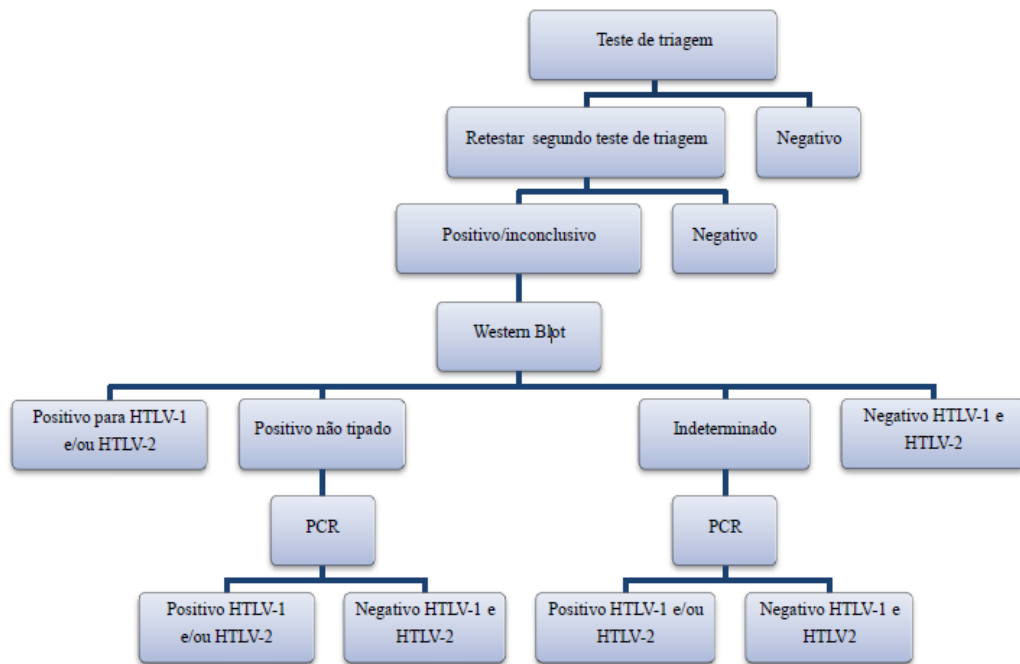


Figura 4: Fluxograma para diagnóstico laboratorial do HTLV-1 e 2. (Guia de Manejo Clínico da Infecção pelo HTLV; Ministério da Saúde 2013).

1.3 EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO PELO HTLV-1

1.3.1 Distribuição no mundo

A distribuição geográfica do HTLV-1 tem sido estudada há quase 30 anos desde sua descrição inicial e as estimativas mundiais são de pelo menos de 5-10 milhões de indivíduos infectados com HTLV-1 (GESSAIN ; CASSAR, 2012). Esses resultados foram baseados somente na população de 1,5 bilhão de pessoas que vivem em áreas conhecidas como endêmica para HTLV-1. De acordo com a prevalência de HTLV-1 no mundo, as taxas de soro prevalência foram estratificadas de acordo com a percentagem de prevalência: prevalências elevadas (mais de 5% da população testada), média (1% a 5%) e baixa (menos de 1%) (GONÇALVES et al., 2010) (Figura 5). Assim, as regiões geográficas do mundo que foram reconhecidas como áreas endêmicas para esta infecção são: sudoeste do Japão, África Subsaariana, Irã, Caribe, Melanésia, América do Sul, e nas Ilhas Salomão, entre os aborígenes australianos. O Japão e África são considerados os locais com maior número de indivíduos infectados pelo HTLV-1, seguido da América do Sul (GESSAIN; CASSAR, 2012).

Entretanto a estimativa mundial, regional e local da prevalência do HTLV-1 ainda continua pouco conhecida devido a interferência de diferentes fatores como: 1) a falta de dados de algumas regiões do mundo; 2) os testes sorológicos para triagem do HTLV-1, utilizados para avaliar a prevalência do HTLV-1 entre 1980 e 1990, apresentaram uma baixa especificidade o que levou a uma super estimativa da prevalência; 3) a maioria dos estudos realizados para avaliar a prevalência do HTLV-1 tinha como base estudos seletivos de grupos de população, como estudos em doadores de sangue, gestantes, pacientes hospitalizados, e não estudos de base populacional, que melhor representam o perfil da população geral; e 4) uma distribuição não homogênea da infecção por HTLV-1, como visto no sudeste do Japão e em algumas áreas da América do Sul. Nestas regiões foram encontrados pequenos agrupamentos com alta prevalência de infecção para HTLV-1, enquanto que nas áreas ou localidades próximas as endêmicas, a prevalência não representava uma endemia (GESSAIN; CASSAR, 2012).

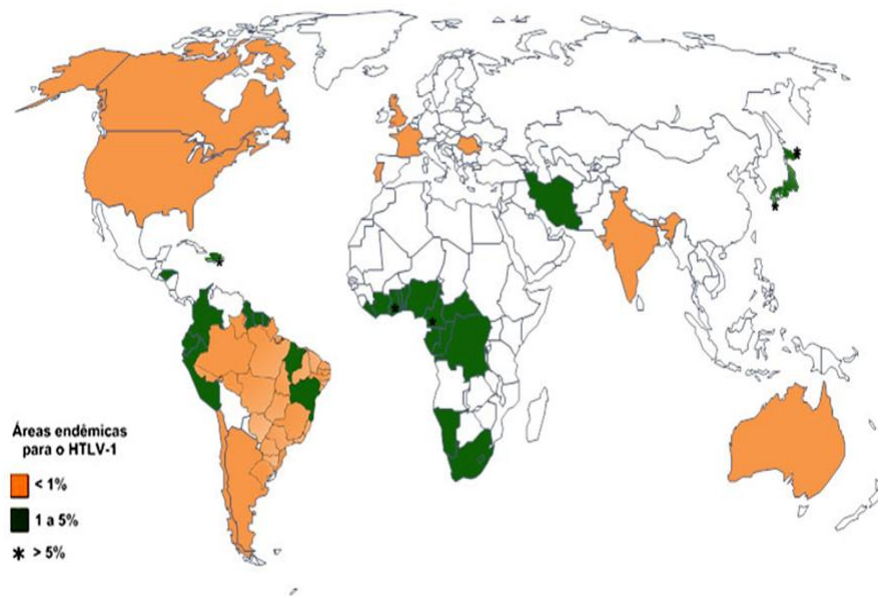


Figura 5: Distribuição do HTLV-1 no mundo. (Adaptado de GONÇALVES et al., 2010).

1.3.2 Distribuição no Brasil e em Salvador

Estudos indicam que aproximadamente 2,5 milhões de pessoas estão infectadas pelo HTLV-1 no Brasil, sendo assim o país com maior número absoluto de casos de infecção pelo vírus no mundo. Porém, a maior parte dos estudos epidemiológicos da infecção pelo HTLV-1 no Brasil aborda a soroprevalência da infecção em indivíduos com ATL, HAM/TSP ou em grupos específicos como doadores de sangue, gestantes, usuários de drogas injetáveis, e populações indígenas (CATALAN-SOARES; PROIETTI; CARNEIRO-PROIETTI, 2001; PROIETTI et al., 2005; GALVÃO-CASTRO et al., 2010). Estes estudos epidemiológicos realizados no Brasil entre os doadores de sangue mostraram uma distribuição heterogênea da infecção no país destacando a cidade de Salvador como a região que possui o maior número de infectados no Brasil.

Um estudo sorológico realizado entre o período de julho e setembro de 1993, em 5842 doadores voluntários de bancos de sangue em cinco capitais do Brasil destacou a cidade de Salvador com a maior frequência de soroprevalência (1,35%), quando comparada as outras regiões, 0,08% (Manaus), 0,33% (Recife), 0,08% (Florianópolis) e 0,33% (Rio de Janeiro) (GALVÃO-CASTRO et al., 1997). Um outro estudo de triagem sorológica para o HTLV-1/HTLV-2 foi realizado em candidatos à doação de sangue, no período de 1995 a 2000 nas unidades de banco de sangue da rede pública de 27 maiores regiões metropolitanas do Brasil (26 Estados e o Distrito Federal). A infecção foi encontrada em todos os estados do Brasil

com taxas de soropositividade variando de 0,04% a 1,3% dependendo da localização geográfica. Os maiores índices de soroprevalência do vírus foram encontrados nas regiões Norte e Nordeste principalmente no Maranhão, Pará, Pernambuco e Bahia (6,7 a 10/1000) enquanto nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, foram encontrados menores soroprevalências (CATALAN-SOARES; CARNEIRO-PROIETTI; PROIETTI, 2005) (Figura 6).

O único estudo de base populacional realizado na cidade de Salvador detectou uma soroprevalência de 1,76% na população geral, alcançando 9,0% em mulheres com idade acima de 50 anos. A partir deste estudo, foi estimado que cerca de 50.000 indivíduos estão infectados pelo HTLV-1 em Salvador (DOURADO et al., 2003). Em gestantes, a soroprevalência foi de 0,28% na Bahia, 0,9 e 1,0% respectivamente, em Salvador e Cruz das Almas, no Recôncavo Baiano. Nos indivíduos usuários de drogas injetáveis em Salvador detectaram-se soroprevalências de 25,5% e 8,8% para HTLV-1 e HTLV-2 respectivamente (GALVÃO-CASTRO et al., 2010).

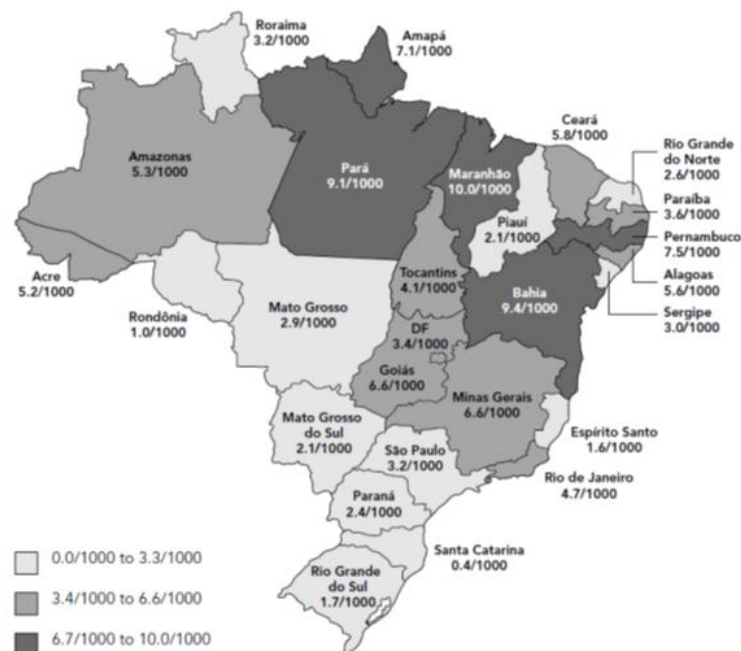


Figura 6: Prevalência do HTLV-1/2 nos doadores de sangue de capitais de 26 estados e Distrito Federal brasileira. (CATALAN-SOARES et al., 2005).

1.3.3 Distribuição na África e no Benim

O continente africano é considerado uma das áreas de alta endemicidade para o HTLV-1 no mundo, com soroprevalência variando de 0 a 5,5 % (GESSAIN; CASSAR, 2012). Neste continente, a região da África Subsaariana representa a área de alta endemicidade, com um valor estimado de 2 a 4 milhões de indivíduos infectados pelo HTLV-1, sendo as regiões Oeste e Centro da África, particularmente as regiões com maior incidência (DIOP et al., 2006). Já os países localizados no norte da África como o Egito, Marrocos e Tunísia apresentam uma soroprevalência muito baixa ou ausente. A soroprevalência no continente africano aumenta da região norte para o sul, variando de 0,6% em Marrocos para mais de 5% em vários países da África Subsaariana, por exemplo, Benim, Camarões e Guiné-Bissau (GONÇALVES et al., 2010).

A África central é representada por 9 países apresenta uma população em torno de 130 milhões de habitantes e a infecção pelo HTLV-1 já foi reportada em Angola, Camarões, República Centro-Africana, Chade, República Democrática do Congo e Gabão (GESSAIN; CASSAR, 2012). Os estudos epidemiológicos realizados em Camarões, demonstraram uma prevalência variando de 0,5 a 2%, dependendo da localização geográfica, da população estudada e do grupo étnico. No grupo de pigmeus, que vive principalmente na região Sul do país, foi observado uma soroprevalência em torno de 2 a 10% em adultos, enquanto uma soroprevalência de 0,3 a 1,5% foi observado no grupo da população *Bantu* que representa a maior parte da população do Camarões. Na região Sul da África, o HTLV-1 foi reportado em vários países como na cidade de Maputo em Moçambique onde foi estimado uma soroprevalência de 0,9% a 1,2 % entre os doadores de sangue desta região (VICENTE et al., 2011) enquanto uma soroprevalência de 1,7% foi observada em KwaZulu-Natal, Durban (África do Sul) e áreas circundantes entre indivíduos infectados com HIV-1 com falha na terapia (ALCANTARA et al., 2006).

A região Oeste da África representa mais de 300 milhões de habitantes com 17 países. A infecção pelo HTLV-1 já foi reportada em vários desses países como Benim, Burkina Faso, Gâmbia, Gana, Guiné-Bissau, Costa do Marfim, Mali, Nigéria, Senegal e Togo. Em Guiné-Bissau, a soroprevalência foi estimada em torno de 3,6% na população adulta e de 9,3% nos doadores de sangue, sendo assim considerado o país com a maior soroprevalência da infecção pelo HTLV-1 na África (LARSEN et al., 2000; ZEHENDER et al., 2008). O Benim é um país localizado na região Oeste da África entre o Togo e a Nigéria e tem em torno de 10, 87

milhões de habitantes. O país tinha seis províncias resultantes da divisão colonial francesa: *Atacora*, *Atlantique*, *Borgou*, *Mono*, *Ouémé* e *Zou* (divisão territorial em 1958), mas desde 1999 ele está subdividido em 12 províncias, sendo as 6 novas províncias criadas: *Alibori*, *Collines*, *Couffo*, *Donga*, *Littoral* e *Plateau*. Alguns estudos de soroprevalência já foram realizados investigando a presença do vírus no país. Vários estudos de seroprevalência foram realizados no Benim e estes estudos mostraram uma diferença nos valores de seroprevalência devido aos diferentes métodos de teste utilizados nesses estudos. Um estudo realizado de 1988 a 1989 entre 1300 doadores de sangue e 2625 indivíduos em seis províncias de Benim mostrou uma prevalência de 1,5% (39/2625) apenas no segundo grupo, enquanto no grupo de doadores nenhum indivíduo foi encontrado com o vírus. Esta soroprevalência varia de 0,3% nas províncias localizadas na região litoral para 5,4% na província de *Atacora* localizada na região norte do país (DUMAS et al., 1991) (Figura 7). Outro estudo realizado na *Atacora*, mostrou uma soroprevalência global da infecção pelo HTLV-1 de 1,86% (HOUINATO et al., 1996). Mais tarde, um outro estudo realizado nessa mesma região identificou 25 cidades que apresentaram uma soroprevalência maior do que 4% e que foram consideradas como áreas endêmicas para o HTLV-1 (HOUINATO et al., 2002).

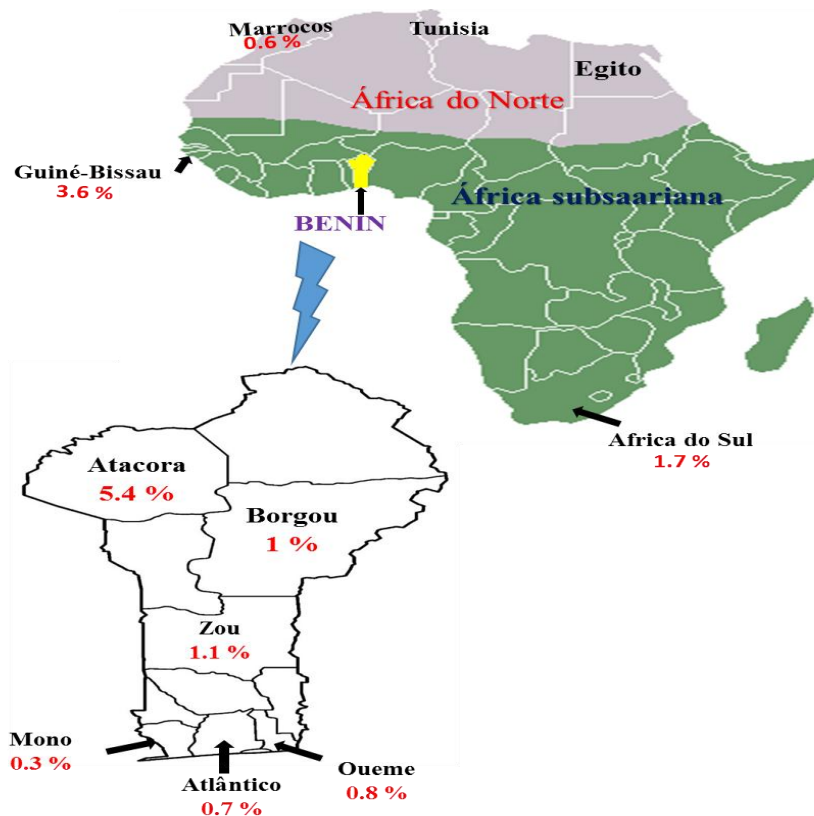


Figura 7: Figura mostrando a prevalência do HTLV-1 na África e em Benim. (Adaptado própria da Autora).

1.4 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DOS SUBTIPOS DO HTLV-1

Os estudos de epidemiologia molecular demonstraram a existência de vários subtipos moleculares ou genótipos de HTLV-1 que são principalmente associados à origem geográfica de populações infectadas e não à patologia (leucemia ou neuromielopatia) (GESSAIN, 2011).

A partir das análises filogenéticas das regiões LTR e *env*, das cepas provenientes de todas as regiões geográficas do mundo, o HTLV-1 foi classificado em sete subtipos: a ou cosmopolita; b ou África Central; c ou da Melanésia; d, isolado de pigmeus em Camarões e no Gabão; e, isolado de pigmeus na República Democrática do Congo; f, isolado de um indivíduo do Gabão e g, recentemente descrito como um subtipo novo em Camarões (África Central). O subtipo Cosmopolita (a) é encontrado em muitos países do mundo. Ele é dividido em 6 subgrupos em função de sua localização: A–Transcontinental, B–Japonês, C–Oeste africano, D–Norte africano, E–Negros do Peru e F–Etiópia (Figura 8) (MIURA et al., 1994; VAN-DOOREN et al., 1998; PAIVA; CASSEB, 2015; TREVIÑO et al., 2014).

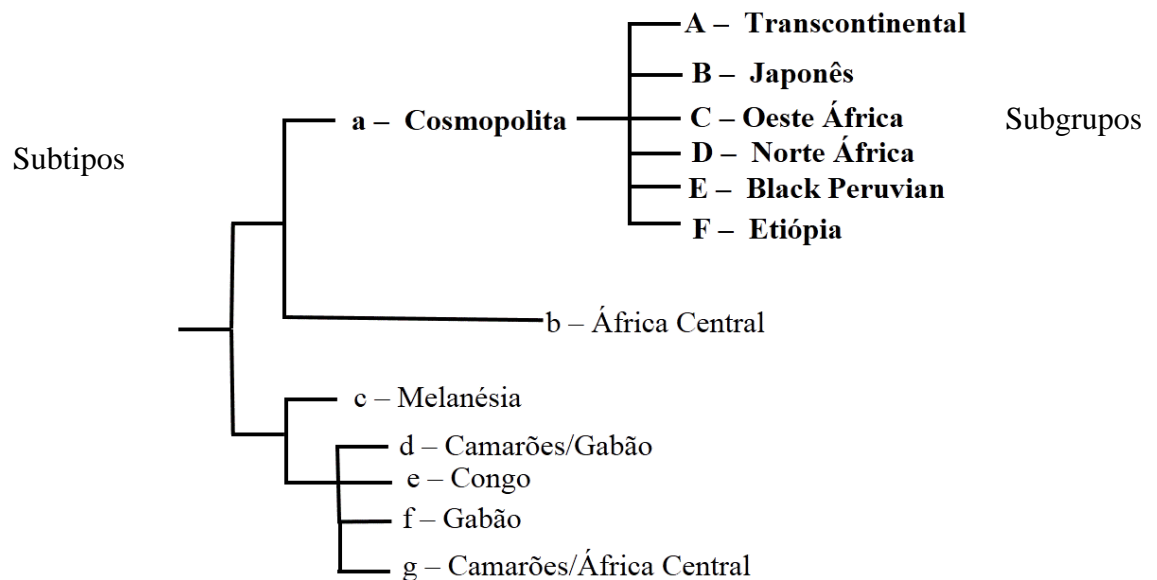


Figura 8: Figura mostrando a classificação dos subtipos e subgrupos do HTLV-1. (Adaptado própria da Autora).

Apesar da grande distribuição geográfica dos subtipos de HTLV-1, o subgrupo HTLV-1aA denominado como HTLV-1 subtipo Cosmopolita subgrupo Transcontinental é o mais frequente entre todos os subtipos virais. Ele é responsável pela maioria das infecções no mundo (GESSAIN; CASSAR, 2012), sendo o subtipo que possui o maior número de

sequências disponíveis nos bancos de dados secundários (ARAÚJO et al., 2012). Em quase todos os estudos de caracterização molecular realizados nas regiões da América Latina, principalmente no Brasil, tem sido demonstrado a predominância de dois subgrupos distintos do subtipo Cosmopolita (Transcontinental e Japonês). O subgrupo HTLV-1aA está presente em todas as regiões da América Latina (Brasil, Argentina, Peru, Chile, Guiana Francesa, Suriname e Colômbia) sendo no Brasil principalmente em imigrantes originados das regiões endêmicas como África e Japão (MIURA et al., 1997; VAN-DOOREN et al., 1998; ALCANTARA et al., 2003; KASHIMA et al., 2006; VALLINOTO et al., 2006; MOTA et al., 2007; GASTALDELLO et al., 2008; MOTA-MIRANDA et al., 2008; MAGALHÃES et al., 2008). O subgrupo HTLV-1aA já foi isolado também no continente africano principalmente na África do Sul e em Moçambique (ALCANTARA et al., 2003; VICENTE et al., 2011). Já o HTLV-1aB, tem uma distribuição geográfica em menor frequência comparado ao do subgrupo A. O HTLV-1aB foi isolado principalmente no Japão, porém já foi encontrado também em outros países como Argentina, Taiwan, Brasil (GASTALDELLO et al., 2008; ALCANTARA et al., 2003; TREVIÑO et al., 2014). O subgrupo aB foi relatado em poucos estudos, e sempre relacionado a imigrantes japoneses, sendo em descendentes japoneses residentes no Brasil (VALLINOTO et al., 2004; KASHIMA et al., 2006). O HTLV-1aC (subgrupo da região Oeste africano) foi identificado pela primeira vez no Oeste da África principalmente em Gana, Senegal, Nigéria, Costa do Marfim e Mali, e posteriormente em regiões como Caribe e Guiana Francesa (ZEHENDER et al., 2008; DESRAMES et al., 2014). O subgrupo HTLV-1aD reportado pela primeira vez na região Norte da África, já foi identificado também em vários outros países africanos como Argélia, Marrocos, Guiné-Bissau, Senegal, Costa do Marfim, Gambia e Gana (Oeste da África) (PÁDUA et al., 2011; VAN-TIENEN et al., 2012; DESRAMES et al., 2014). Contudo existe pelo menos duas grandes linhagens do subtipo Cosmopolita que são responsáveis pela infecção no continente africano. A caracterização do subgrupo HTLV-1aA como o responsável das epidemias do HTLV-1 em Moçambique e África do Sul (ALCANTARA et al., 2006; MOTA et al., 2007; VICENTE et al., 2011) e os subgrupos HTLV-1aC e HTLV-1aD que foram descritos respectivamente em países localizados nas regiões Oeste e norte da África (ZEHENDER et al., 2008; VICENTE et al., 2011).



Figura 9: Distribuição geográfica dos subtipos do HTLV-1 no mundo. (ARAÚJO et al., 2012).

1.5 HIPÓTESES DA ORIGEM DO HTLV-1AA NO BRASIL

Quanto à origem do HTLV-1aA no continente americano, bem como no Brasil, quatro tipos de hipóteses são discutidas atualmente: a primeira descreve a migração de populações asiáticas através do estreito de bering, trazendo o vírus do norte da Ásia para o continente americano, a segunda hipótese sugere que os africanos introduziram o vírus no continente americano durante a migração da população africana e a terceira suporta a ideia da introdução através da migração recente da população japonesa.

Considerando a migração de populações asiáticas, a introdução do HTLV-1 nas Américas teria acontecido durante as rotas de deslocamento de populações da Ásia para o novo mundo através do estreito de bering. Esta hipótese da origem asiática é reforçada pela evidência da descoberta de uma linhagem divergente do HTLV-1 encontrada na Melanésia e em aborígenes australianos (HTLV-1c), pois a ausência de primatas não humanos na Oceania sugere que o HTLV-1 tenha sido trazido pelas primeiras populações ancestrais que habitaram a Australo-Melanésia entre 40.000 – 60.000 anos atrás (LIU et al., 1996). Além disso, o HTLV-1 foi identificado em múmias andinas (SONODA et al., 2000), em aborígenes canadenses (ANDONOV et al., 2012) e em populações indígenas atuais da América Latina (PAIVA; CASSEB, 2015).

A hipótese da origem africana é reforçada pelos eventos de migração para fora da África das populações ancestrais humanas infectadas com HTLV-1, as quais teriam proporcionado a dispersão global do vírus. Durante o tráfico humano (século XVI-XVIII), milhares de africanos, principalmente do oeste e centro da África, foram trazidos para o Brasil afim de atuar como mão de obra. O período de migração dos africanos no Brasil pode ser dividido em quatro ciclos principais, caracterizados pelos diferentes locais de embarque no continente africano: **ciclo da Guiné; ciclo de Angola e do Congo, ciclo da Costa da Mina e ciclo da baía de Benim**. O ciclo da Guiné foi o primeiro ciclo de migração e ocorreu na segunda metade do século XVI. Os navios partiam da costa Oeste da África, região onde hoje está situado o Senegal, Gâmbia e Guiné Bissau. Nesta época, todos os africanos trazidos para o Brasil, eram considerados como oriundos da Guiné não havendo precisão da proveniência. O **ciclo de Angola e do Congo** ocorreu no século XVII; o **ciclo da Costa da Mina**, ocorreu no século XVIII; a maioria dos africanos trazidos para Bahia nesse ciclo eram *yoruba* com a denominação de nagôs. Eles são originários da região oeste da África, ao longo da costa do *Dahomey* onde o Benim está atualmente localizado, região conhecida como Costa da Mina, e por fim o **ciclo da baía de Benim** que ocorreu nos séculos XVIII e XIX (PAIVA ; CASSEB, 2015). Porém, há evidências demonstrando que os africanos foram também trazidos das regiões do sul da África, hoje conhecidas como sul de Angola, África do Sul e Moçambique. Isso foi justificado por estudos filogenéticos que mostraram o agrupamento das sequências oriundas de indivíduos infectados de Salvador com os da África do Sul (ALCANTARA et al., 2006; REGO et al., 2008).

A terceira hipótese descreve uma introdução recente durante o início do século XX através da migração da população japonesa no Brasil. Isso justifica-se pela maior presença da população japonesa principalmente na região Sudeste do Brasil (PAIVA; CASSEB, 2015).

A mais recente hipótese descreve uma provável introdução do HTLV-1aA no Brasil através de múltiplas introduções da África durante o período pós-colombiano para o novo mundo. Esta hipótese foi reforçada a partir das análises filogenéticas que mostra o agrupamento das sequências em dois diferentes agrupamentos dentro do subgrupo Transcontinental. Também pelos estudos de caracterização dos haplótipos do gene da β^A globina de pacientes infectados pelo HTLV-1 na população de Salvador, Bahia, uma cidade que tem muitas características sócio demográficas parecidas a alguns países da África. O estudo de caracterização dos haplótipos do gene da β^A globina realizado em 34 pacientes infectados pelo HTLV-1 em Salvador, Bahia mostrou que 29,4% dos indivíduos foram

caracterizados como pertencentes ao haplotipo CAR (África Central); 45,6% como BEN (Benim); e 25% como SEN (Senegal) (ALCANTARA et al., 2003). Em geral foi relatado uma predominância do genótipo heterozigoto CAR/BEN (África Central/Benim), e uma frequência menor do tipo SEN na cidade de Salvador (ALCANTARA et al., 2003, GALVÃO-CASTRO et al., 2010).

Considerando o fato que os haplótipos são classificados de acordo com a sua origem e a região geográfica onde predominam, eles podem ser usados como excelentes marcadores para traçar a origem, evolução e as migrações de populações em estudos antropológicos principalmente em caso de estudo de origem da população infectados pelo HTLV-1 em Brasil (ALCANTARA et al., 2003; GALVÃO-CASTRO et al., 2010).

1.6 HISTÓRIA DO TRÁFICO TRANSATLÂNTICO

A história do povoamento do Brasil é o resultado do encontro entre várias paíes principalmente os europeus, africanos e indígenas. Antes do início do comércio transatlântico dos africanos pelos portugueses, os índios são os primeiros povos que chegaram no Brasil. Hoje já se sabe, que os povos ameríndios foram originados da Ásia, e chegava no Brasil, por via terrestre através do estreito de Bering entre 14000 e 12000 anos atrás. Então, mais de cinco milhões de indígenas divididos em várias nações já habitavam o Brasil antes da chegada dos portugueses. Em 1500, os portugueses chegaram no Brasil pelos navios comandados pelo português Pedro Álvares Cabral, o príncipe regente Dão João IV e a família real, em busca de novas terras para explorar e conseqüentemente fugindo também da invasão do Portugal por Napoleão Bonaparte. Para explorar a riqueza das terras brasileiras, os portugueses contaram com o auxílio dos grupos de indígenas que viviam já no Brasil, para fornecer mão de obra nas plantações de açúcar. Infelizmente, os índios rapidamente foram vítimas de doenças europeias, e são incapazes de continuar a trabalhar nas plantações. Desta forma, a partir da década de 1530 os portugueses desenvolveram o tráfico atlântico dos africanos com a parceria dos europeus. Então, os africanos foram trazidos para o Brasil para trabalhar com mão de obra nos diversos trabalhos agrícolas durante todo o período da escravidão. No entanto, não foi apenas na área rural que os negros escravizados trabalharam. Muitos trabalhavam com o algodão, confeccionando roupas de escravos e sacos para armazenar diversos produtos. Eram também responsáveis da produção da farinha de mandioca e da farinha de milho, ingredientes básicos da alimentação da população da época. Além disso, havia inúmeros escravos que são utilizados em vários tipos de serviços domésticos existentes numa casa. O Portugal foi o

primeiro país da Europa a realizar o comércio de escravos africanos. Isso foi possível porque os portugueses, ao longo dos séculos XV e XVI, dominaram muitas regiões no litoral da África. Os conquistadores portugueses estabeleceram alianças com comerciantes e soberanos africanos e passaram a fazer tráfico de escravos através do Atlântico. O tráfico negreiro era um comércio que unia interesses com os países da África, Europa e América. Os navios dos europeus levaram mercadorias como tecidos, tabacos e armas para a costa africana, que eram trocados por escravos. Posteriormente, esses escravos eram vendidos para os colonos americanos. Devido ao tráfico negreiro, milhões de africanos foram violentamente transportados da África e transformados em escravos. As estimativas sobre o total de escravos trazidos para a América e, especialmente, para o Brasil variam muito. Entre os séculos XVI e XIX, cerca de 10 a 20 milhões de escravos foram trazidos Para toda a América. Em relação ao Brasil, as estimativas apontam o desembarque de cerca de 4 milhões de africanos entre 1531 e 1855 pelos portos da Bahia e Rio de Janeiro (VERGER, 1987;VIANA FILHO, 1988; MIURA et al., 1994;VAN-DOOREN et al., 1998).

1.7 INTRODUÇÃO SOBRE OS MÉTODOS FILOGENÉTICAS

Inicialmente os estudos realizados para estudar a relação que existe entre os organismos vivos eram baseadas exclusivamente na comparação das características morfológicas (caraterísticas fenotípicas) dos animais presentes ou fósil. Os cientistas compararam a estrutura externa e organizações para avaliar as suas afinidades evolutivas. No início dos anos 1960, esse método de estudo das características morfológicas foi substituído para a filogenia molecular com a descrição da teoria da evolução elaborado por Darwin. A descoberta da estrutura do DNA por Watson e Crick em 1953 (WATSON;CRICK, 1953) e particularmente a evolução da técnica de sequenciamento e análises de moléculas macro biológicas mudaram rapidamente as práticas antigas utilizadas para estabelecer as relações entre os organismos vivos. Hoje a inferência filogenética é preferencialmente empregada nesses dados moleculares de sequências genéticas (DNA ou proteína), substituindo assim a análise das características fenotípicas do passado. Desde o desenvolvimento das novas técnicas de sequenciamento em biologia molecular, o número de sequências de nucleotídeos e de aminoácidos disponíveis para os diferentes genes de diferentes organismos aumentam exponencialmente, isso possibilitam a realização de vários estudos de filogenia molecular. Embora a compreensão da epidemiologia molecular das infecções, incluindo a relacionada ao

HTLV, requer as noções dos métodos filogenéticos moleculares empregados e são utilizados como uma importante ferramenta no estudo da origem e da disseminação da infecção.

1.7.1 *Analises filogeneticas*

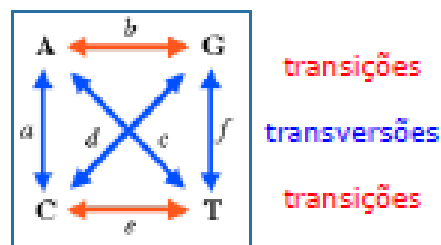
A filogenia molecular é conhecida hoje como uma ferramenta muito utilizado para o estudo do relacionamento que existe entre as taxas e espécies, para inferir uma arvore filogenetica. O primeiro passo em qualquer investigação filogenetica é a recuperação da informação genética relevante para comparar com as novas informações de sequências obtidas. O passo seguinte envolve o alinhamento das diferentes sequências de uns com os outros, a fim de obter uma posição de homologia (BALDAUF, 2003). O alinhamento é um processo de comparação de duas ou mais sequências (de nucleotídeos ou amimo-ácidos) de forma a observar o nível de similaridade. Duas sequências são homólogas quando pode assumir que elas têm um ancestral comum. Existem dois tipos de alinhamento quanto ao número de sequências comparadas: alinhamento simples é realizado entre duas sequências de DNA ou proteínas enquanto alinhamento múltiplo é realizado entre mais de duas sequências de DNA ou proteínas. Existem também dois tipos de alinhamento quanto á abordagem: alinhamento global: as sequências são alinhadas de ponta a ponta em toda a extensão das sequências utilizando alguns softwares como ClustalX, Mafft, T-Coffee. O alinhamento local é um alinhamento entre as regiões mais conservadas das sequências de qualquer organismo, ou seja, os pedaços das sequências são comparados sem considerar todo o comprimento das sequências usando geralmente o software BLAST (*Basic Local Aligment Search Tools*).

Diferentes algoritmos de alinhamento foram desenvolvidos com o objetivo de minimizar o número de erros entre todas as sequências num banco de dados. Procurando obter o melhor alinhamento, as falhas (ou *gaps*) podem ser inseridas em uma ou mais sequências para ajustar as diferenças no comprimento interno (SALEMI;VAN-DOOREN; VANDAMME, 1999). Diferentes modelos tentam explicar os resultados do alinhamento das sequências, através das substituições de nucleotídeos ou aminoácidos e pontuam de maneira distinta essas ocorrências.

➤ Modelos de substituição nucleotídica

A análise filogenética faz certas suposições sobre o processo de substituições de taxa de DNA ou substituições de aminoácidos no modelo de evolução que empregam. Os modelos de substituição nucleotídica freqüentemente consideram dois tipos de substituição

nucleotídica; transição (Ts) e transversão (Tv). Uma transição ocorre quando uma purina é substituída por outra purina, ou uma pirimidina é substituída por outra pirimidina. Uma transversão ocorre quando uma pirimidina é substituída por uma purina, ou vice-versa. Quatro transversões são possíveis enquanto só duas transições diferentes são possíveis, entre purinas e entre pirimidinas (SALEMI;VANDAMME, 2003). Então para estudar a dinâmica dessas alterações de sequências existem alguns algoritmos matemáticos em programas computacionais (por exemplo, o *Modeltest v 3.0*) para predição do melhor modelo de substituição que será utilizado para o conjunto de dados. Até hoje, um grande número destes modelos, foram desenvolvidas e todos os quais permitem a explicação dos dados através das substituições de nucleotídeos ou aminoácidos e pontuam de maneira distinta essas ocorrências.



Os modelos de substituição nucleotídica mais comuns são os seguintes; O modelo de Jukes e Cantor (JC69), que assume frequências iguais para cada nucleotídeo em equilíbrio e que todas as mudanças, entre os quatro nucleotídeos, ocorrem com a mesma probabilidade (JUKES; CANTOR, 1969); o modelo Kimura-2- parâmetros (K80) que permite transições e transversões ocorrendo com diferentes probabilidades (KIMURA, 1984); o modelo Felsenstein (F81) que permite aos quatro nucleotídeos terem frequências diferentes em equilíbrio (FELSENSTEIN, 1981); o modelo Hasegawa (HKY85) que permite frequências nucleotídicas diferentes em equilíbrio e parcialidade em transição/transversão (HASEGAWA; KISHINO; YANO, 1985); o modelo Tamura e Nei (TN93) é similar ao HKY85, mas também permite que transições entre pirimidina e também entre purinas ocorram com diferentes probabilidades (TAMURA; NEI, 1993). Os modelos de substituição nucleotídica mais importantes são: Jukes and Cantor (JC69), Felsenstein 1981 (F81), Kimura 1980 (K80), Hasegawa, Kishino and Yano (HKY).

➤ Modelos de γ -Distribuição.

Todos os modelos descritos anteriormente assumem que cada sítio nas seqüências nucleotídicas alinhadas sofre mutação exatamente na mesma velocidade. Entretanto, as pressões seletivas diferentes em posições diferentes do genoma podem ser responsáveis que alguns nucleotídeos evoluírem mais lentamente ou mais rapidamente que outros. Em regiões codificantes, mutações na primeira e segunda posição geralmente levam à mudança no aminoácido, e elas ocorrem normalmente a baixas velocidades devido à seleção purificante. Além disso, regiões não codificantes levam a mudanças rápidas, porque mutações podem ocorrer com menos restrições que em regiões codificantes. Em uma aproximação clássica, a velocidade da heterogeneidade entre os sítios pode ser aproximada por uma função estatística chamada γ -distribuição, que representa a velocidade de substituição nucleotídica em função da proporção de sítios tendo uma velocidade particular (YANG, 1996). A inclusão de taxas de substituição nucleotídicas γ -distribuídas nos modelos descritos anteriormente é uma descrição mais realística do processo evolucionário e permite estimar a distância evolucionária (SALEMI; VAN-DOOREN; VANDAMME, 1999).

Após, o alinhamento das seqüências e o modelo de substituição selectionada, eles serão utilizados para inferir as relações filogenéticas (BALDAUF, 2003). Uma representação esquemática dos passos básicos envolvidos em qualquer investigação filogenética é apresentada na Figura 10.

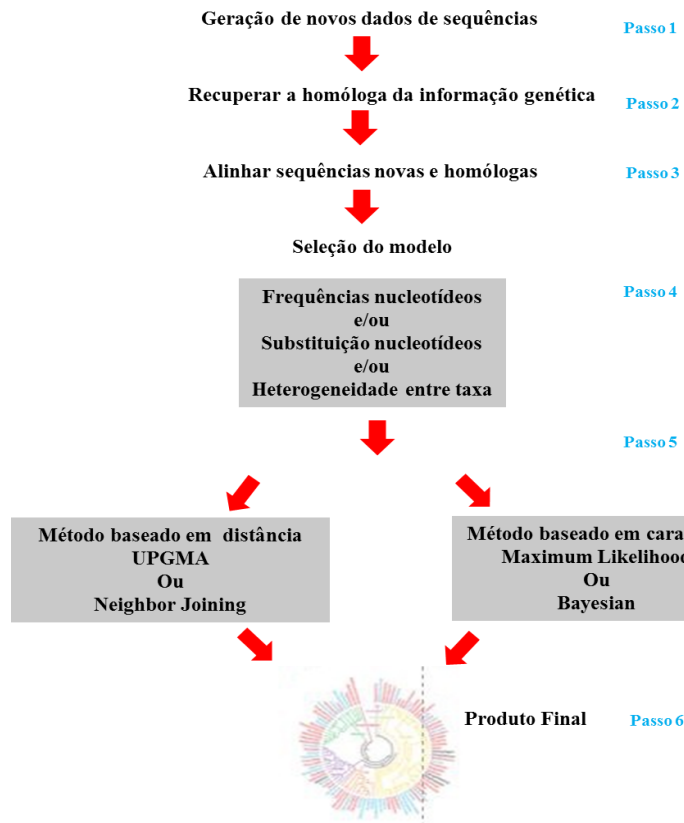


Figura 10: Passos básicos envolvidos em qualquer investigação filogenética. (Adaptado própria da Autora).

1.7.2 Inferência filogenética

A análise filogenética procura reconstruir as relações evolutivas entre os organismos a partir das diferenças nas sequências. Portanto, é importante descrever basicamente os componentes mais básicos de qualquer árvore filogenética (Figura 11). Uma árvore filogenética é uma representação gráfica da relação evolucionária entre organismos ou unidades taxonômicas operacionais (OTUs), também denominados “taxa”. “Taxa” numa árvore filogenética pode ser, por exemplo, um grupo de animais ou cepas virais diferentes. A árvore é composta de nodos conectados por braços. O nodo terminal, ou “tips”, representa a “taxa” contemporânea, enquanto os nodos internos representam os ancestrais. Uma relação filogenética em uma árvore é definida por um braço conectando dois nodos. Um grupo de “taxa” que compartilha um mesmo ancestral comum é denominado de um grupo monofilético ou “clade”. O modelo geral de vários braços numa árvore é referido como a topologia da árvore (SALEMI;VAN-DOOREN; VANDAMME, 1999).

As árvores filogenéticas podem ser denominadas com raiz ou sem raiz. Uma árvore é dita sem raiz quando o ponto mais antigo no tempo, ou seja, o local de um ancestral comum

para a “taxa”, não foi identificado. Em árvores com raiz a origem e a direção do caminho evolucionário são conhecidas, enquanto árvores sem raiz dão informação somente sobre a relação entre a “taxa”, mas não definem uma direção evolucionária. A melhor maneira de transformar uma árvore sem raiz em uma com raiz é incluir um grupo externo (“outgroup”), que é uma “taxa” com um longo braço, mais antigo e divergente que as outras “taxas” do estudo. O grupo externo deve ter divergido antes de todos os outros “taxa”, mas não deve ser tão distantemente relacionado dos outros, a fim de obter um alinhamento não ambíguo e evitar dificuldades em estimar a verdadeira distância entre o grupo externo e os “taxa” (SALEMI;VAN-DOOREN; VANDAMME, 1999).

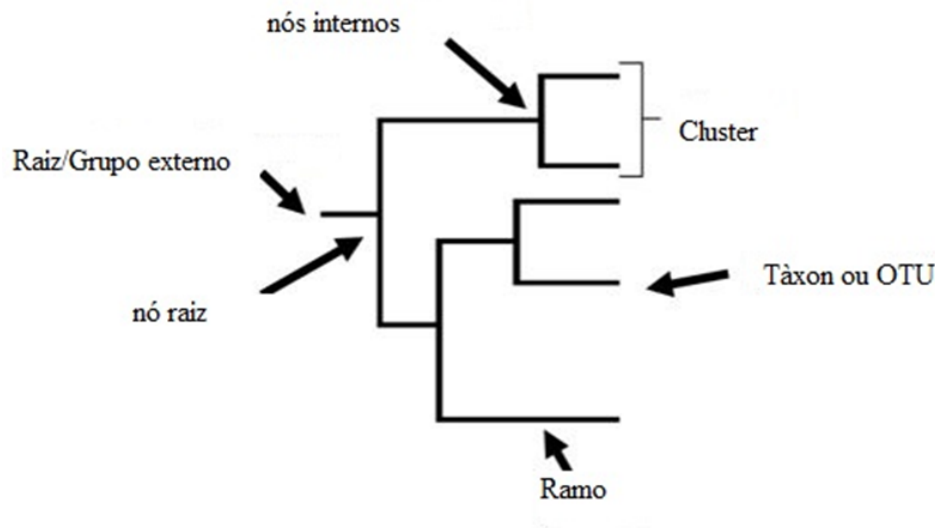


Figura 11: Representação esquemática de uma árvore filogenética. (Adaptado própria da Autora).

Com as informações genéticas e poder computacional agora disponível, o desenvolvimento dos algorítmicos filogenéticos possibilitaram a realização de análise dos dados genéticos para inferir as relações evolutivas. Existem modelos de construção de árvores baseados em distância e caracteres (Tabela 1). Em métodos de distância, a distância evolucionária é computada para todos os pares de “taxa”, levando a uma matriz de distâncias. A árvore é então construída empregando um algoritmo em que a relação topológica local entre “taxa” é identificada em ordem de similaridade. Os principais métodos utilizados são: o método Fitch-Margoliash (FITCH; MARGOLIASH, 1967), análise de “cluster” (UPGMA) (MICHENER; SOKAL, 1957), o método Mínimo Evolution (ME) (RZHETSKY; NEI, 1992), e o método Neighbour-Joining (NJ) (SAITOU; NEI, 1987).

Tabela 1: Métodos de construção de uma árvore filogenética.

Métodos	Criterio de Pesquisa	Algoritmo de agrupamento
Metodos baseados em distancia	Fitch-Margoliash	UPGMA
	Minimum Evolution	Neighbour-Joining
Metodos baseados em caracteres	Parcimônia	
	Máxima verossimilhança	
	Inferência Bayesiana	

Vários outros métodos baseados em caracteres de inferência foram desenvolvidos para análise dos dados por exemplo o método de parcimônia, máxima verossimilhança e a inferência bayesiana (HOLDER; LEWIS, 2003).

➤ Métodos de parcimônia.

A máxima parcimônia (MP) tem o objetivo de encontrar a topologia da árvore para um determinado conjunto de dados (alinhamento de sequências) que pode ser explicado com o menor número de mudanças de caracteres (substituições). A topologia de uma árvore usando o MP-algoritmo infere para cada posição de sequência o número mínimo de mudanças de caracteres necessárias ao longo de seus ramos para explicar os estados de caracteres observados.

Existem algumas vantagens de métodos de inferência de máxima parcimônia. O método baseia-se em caracteres comuns e derivados. Não reduz informação da sequência a um único valor numérico como muitos dos métodos baseados em distância e ele fornece informações sobre as sequências ancestrais. O método da parcimônia define a melhor hipótese filogenética aquela que apresenta o menor número de passos, cada passo sendo definido como uma mudança de estado de caracteres. Várias desvantagens dos métodos máximos parcimônia existem também. Ele é um método lento em comparação com os métodos com base na distância de construção da árvore. O método não utiliza toda a informação da sequência, usa somente os sites informativos no alinhamento. Ele não permite múltiplas mutações e não fornece informações sobre os comprimentos dos ramos (HENNIG, 1966).

➤ Métodos filogenéticos baseados nos cálculos de máxima verossimilhança

O método de máxima verossimilhança (ML) para reconstrução da árvore filogenética é muito semelhante a método de máxima parcimônia em que o algoritmo examina as diferentes

topologias de árvores e avalia a probabilidade relativa para cada árvore. Ao contrário dos métodos de parcimônia, a máxima verossimilhança avalia a probabilidade para cada árvore pela soma sobre todas as posições ao longo do comprimento da sequência e não apenas os sítios informativos ao longo do comprimento da sequência. O algoritmo de ML busca a árvore que maximiza a probabilidade (*likelihood*) de observar os estados de caracteres em um determinado conjunto de dados, dando uma topologia em árvore particular e um modelo de substituição para inferir a evolução. Em ML, a árvore que produz a maior probabilidade no final é então escolhida como a melhor árvore possível para explicar o determinado conjunto de dados (SALEMI; VANDAMME, 2003).

A desvantagem principal para o método de inferência da ML- árvore é que ele pode ser extremamente computacionalmente e intensiva. No entanto, o método de inferência da ML-árvore possui muitas vantagens fora do intenso sistema computacional do tipo de algoritmo usado pelo método. Em primeiro lugar, o método de inferência de árvore com ML se baseia na pontuação da máxima verossimilhança, o que permite que os usuários testem árvores ou hipóteses e não se baseia em análises estatísticas adicionais, como amostragem do bootstrap. O método de ML utiliza também toda a informação da sequência no conjunto de dados e não apenas sites informativos. Ele é também robusto para a análise de sequências curtas. Com este método, é possível estimar os diferentes parâmetros envolvidos na computação dos modelos de substituição nucleotídica diferentes (FELSENSTEIN, 1981).

➤ O “bootstrap”

Felsenstein (1985) propôs o uso do “bootstrap” para avaliar a magnitude dos efeitos de erros amostrais sobre inferências. O “bootstrap” é implementado da seguinte forma: A matriz de dados original é usada para gerar novas matrizes, as matrizes de “bootstrap”. Caracteres da matriz original são amostrados aleatoriamente e transferidos para a matriz de “bootstrap”. Todos os caracteres da matriz original podem ser amostrados com igual probabilidade. Esse processo de amostragem, entretanto, é realizado com reposição. Isto significa que um mesmo caráter pode ser transferido mais de uma vez para a matriz de “bootstrap” a partir da matriz original, enquanto outros caracteres não serão amostrados nenhuma vez. Este processo inteiro é repetido várias vezes, gerando diversas matrizes de “bootstrap”. A seguir, cada uma dessas é usada para inferir uma árvore usando um mesmo método. Uma vez que as matrizes são diferentes umas das outras (em decorrência do processo de amostragem) diferentes árvores podem ser geradas. Os valores de “bootstrap” apresentados

em uma árvore indicam em quantas das árvores geradas a partir das matrizes de “bootstrap”, determinado agrupamento foi obtido.

➤ Inferência Bayesiana

A inferência bayesiana baseado em caracteres é um método de inferência da árvore que emprega uma otimização dos critérios. Ele foi introduzido na filogenia molecular no final dos anos 1990 (RANNALA;YANG, 1996; MAU; NEWTON, 1997; LI; PEARL; DOSS, 2000) e representa o mais recente na biologia evolutiva. Ele é teoricamente muito diferente dos outros métodos de inferência baseados em caracteres, tais como métodos de máxima parcimônia e verossimilhança, em que este método não tenta buscar apenas uma única árvore melhor (SUCHARD et al., 2001).

A inferência Bayesiana requer o uso do parâmetro chamado *prior*, especificado pelo investigador, que é formalizada como uma distribuição sobre os parâmetros do modelo (por exemplo, comprimentos dos ramos, topologia em árvore, e os parâmetros do modelo de substituição). Se nenhuma informação biológica está disponível, então o *prior* é pouco informativo. Se a informação biológica (por exemplo, taxa de mutação) sobre o gene ou espécie em estudo é conhecido, então pode-se definir um *prior* muito informativo sobre a análise (SUCHARD et al., 2001). Em inferência Bayesiana um *prior* uniforme para a topologia da árvore é o principal objetivo.

Os Posteriores de probabilidades de árvores são obtidos através da exploração do espaço da árvore usando uma técnica de amostragem, chamado de método Markov Chain Monte Carlo (MCMC) (YANG, 2008). Este algoritmo, Bayesiana MCMC pode ser descrita da seguinte maneira. O algoritmo é iniciado com uma árvore totalmente aleatória, com comprimentos de ramificação aleatória e parâmetros de substituição aleatória, em um ponto aleatório. Após um determinado número de iterações do comprimento da cadeia de uma amostra da árvore, os comprimentos dos ramos e parâmetros realizados são enregistados. Este processo de rearranjo da árvore contínua e a amostragem a cada passo da cadeia é prosseguida até ao fim do comprimento da cadeia. No final da cadeia os dados são resumidos em uma distribuição posterior de árvores / parâmetros.

A desvantagem principal do método Bayesiana de inferência é que ele pode ser extremamente computacionalmente intensivo. A principal vantagem da inferência bayesiana é que a partir de uma única corrida MCMC, os valores de suporte para cada um dos clusters em uma árvore pode ser derivada a partir da data gerado, e assim a inferência Bayesiana fornece

uma maneira natural de tendo em conta a incerteza filogenética (HALL, 2008), (LEMEY; SALEMI; VANDAMME, 2010).

➤ A implicação do relógio molecular

Desde o início da filogenia moderna no final de 1950 e início da década de 1960, a implicação do relógio molecular tem um papel central no estudo da inferência filogenética. O relógio molecular foi introduzido no início dos anos 1960 por Zuckerkandl e Pauling, que publicou dois artigos sobre a taxa de evolução em proteínas (ZUCKERKANDL; PAULING, 1962). Eles observaram que a distância genética de duas sequências que codificam para a mesma proteína, mas isolados a partir de espécies diferentes, aumentou linearmente com o tempo de divergência dos dois isolados. Eles observaram resultados similares em uma ampla gama de outras proteínas e a hipótese de que a taxa de evolução para qualquer proteína é constante ao longo do tempo. Esses achados levaram à implicação de um relógio molecular para diferentes genes. Isto significa que se um relógio molecular existe e a taxa de evolução de um gene particular pode ser calculado ou é conhecido, pode-se calcular o tempo de divergência entre os isolados, comparando as suas sequências de ácidos nucleicos ou aminoácidos (ZUCKERKANDL; PAULING, 1962).

2 JUSTIFICATIVA

A infecção pelo HTLV-1 é endêmica em várias regiões do mundo. Apesar do retrovírus já ser conhecido como patogênico para os humanos desde o século passado, existe ainda uma controvérsia em relação à origem do HTLV-1aA no Brasil. Os estudos relatam que é provável que o HTLV-1aA foi introduzido no Brasil por umas destas vias: (a) uma introdução durante o período paleolítico, correspondendo à primeira migração humana para às Américas, através do estreito de bering entre 15.000 a 35.000 anos atrás, (b) através do tráfico dos africanos durante o período pós-colombiano, (c) através da imigração da população japonesa a partir do início do século XX, e por fim (d) foi descrito múltiplas introduções durante o período pós-colombiano da África para o Brasil (PAIVA; CASSEB, 2015; ALCANTARA et al., 2003).

Em relação aos dados históricos, a maioria dos africanos trazidos para Salvador, durante o período colonial pelos portugueses como parte do tráfico negreiro são originados do oeste da África (Benin, Nigéria e Norte de Angola) onde os subgrupos C e D do HTLV-1a já foram encontrados. Portanto a maioria dos recentes estudos filogenéticos sugerem uma múltipla introdução durante o período pós-colombiano tendo como Salvador a porta de entrada, e demonstraram que a maioria dos isolados circulando no Brasil e na África do Sul pertencem ao subtipo Cosmopolita, Subgrupo Transcontinental. Além disso, os estudos de análise filogenética mostraram um agrupamento entre os isolados dos indivíduos infectados da África do Sul e do Brasil (ALCANTARA et al., 2003), mas ainda não foi demonstrado uma relação filogenética entre os isolados oriundos dos indivíduos infectados da região oeste da África e os do Brasil. Então, a partir destes estudos, foi sugerido que o HTLV-1aA foi introduzido no Brasil a partir dos indivíduos infectados por HTLV-1aA e provenientes da região sul da África. Sabendo que os haplótipos do gene β -globina são utilizados como marcadores de ancestralidade dos seres humanos, a caracterização dos haplótipos dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 em Salvador mostrou uma predominância do genótipo CAR/BEN (África Central/Benin), enquanto nos pacientes infectados da África do Sul, o haplótipo CAR/CAR (África Central) é o mais predominante. O haplótipo CAR, sendo o haplótipo mais característico da África Central foi sugerido dessa forma, que o HTLV-1 poderia ter se originado da África Central e se disseminou para a África do Sul pela migração da população *bantu* e depois para o Brasil durante o período pós-colombiano (ALCANTARA et al., 2003).

Estes resultados contradizem dados históricos que indicam que a maioria dos africanos que veio para Salvador são originados da região oeste da África onde os subgrupos C e D do HTLV-1 já foram descritos. Benim é um país localizado na região oeste da África, que teve uma grande influência no tráfico dos africanos no Brasil. Entretanto, não existem sequências originadas do Benim e informação sobre o subtipo de HTLV-1 que está circulando neste país para aumentar o conhecimento sobre a introdução do HTLV-1a subgrupo A no Brasil. Dessa forma, são necessárias análises filogenéticas que considerem a informação de genomas de HTLV-1 oriundos de indivíduos infectados provenientes do Benim pois é um país localizado na região oeste da África, cuja participação no tráfico dos escravos no Brasil teve grande importância. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi investigar a introdução do HTLV-1aA no Brasil a partir de populações infectados do oeste da África para entender melhor a introdução do HTLV-1aA em Salvador, Bahia, Brasil partindo da África. Também avaliar a soroprevalência da infecção pelo HTLV-1 entre os doadores de sangue em Benim para obtenção das sequências de indivíduos infectados pelo HTLV-1 originado desta região que será de maior importância para esclarecer esta origem africana do HTLV-1aA no Brasil.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

- Investigar as possíveis origens do HTLV-1aA no Brasil.

3.2 ESPECÍFICOS

- Estimar a data de introdução do HTLV-1aA no Brasil.
- Investigar a relação filogenética entre as sequências originados de populações infectadas do Brasil e novas sequências do sul da África.
- Investigar a relação filogenética entre as sequências originados de populações infectadas do Brasil e do oeste da África.
- Caracterizar novos isolados de HTLV-1 circulando em Salvador, Bahia.
- Avaliar a soroprevalência da infecção pelo HTLV-1 entre os doadores de sangue em Benim.

4 RESULTADOS

Os resultados obtidos sobre a origem do HTLV-1aA no Brasil, usando análise filogenética a partir das sequências LTR previamente publicadas no HTLV-1 *Molecular Epidemiology Database* foram organizados no artigo intitulado “***Introdução do HTLV-1aA no Brasil: associação com o tráfico transatlântico***”, e está descrito no Capítulo I deste manuscrito. O referido artigo foi aceito para publicação na revista *Infection, Genetics and Evolution* (2017).

Os resultados referentes a genotipagem de novos isolados de HTLV-1 circulando em Salvador, Bahia foram organizados no manuscrito intitulado “***Phylogenetic characterization of HTLV-1aA isolates from Salvador, Bahia, Brazil***”, e está descrito no Capítulo II. O referido manuscrito está em preparação para submissão na revista *AIDS Research and Human Retroviruses*.

Os resultados referidos a estimação da soroprevalência da infecção pelo HTLV entre os doadores de sangue em Benim foram organizados no manuscrito intitulado “***First detection of human T-lymphotropic virus in blood donors in Benin shows that testing is required to improve blood safety***”, e está descrito no Capítulo III. O referido manuscrito foi submetido para publicação na revista *ISBT science series*.

4.1 CAPITULO I

Artigo publicado: *Infection, Genetics and Evolution*, 2017.

HTLV-1aA introduction into Brazil and its association with the trans-Atlantic slave trade.

Adjile Edjide Roukiyath Amoussa, EduanWilkinson, Marta Giovanetti, Filipe Ferreira de Almeida Rego, Thessika Hialla A Araujo, Marilda de Souza Gonçalves, Tulio de Oliveira, Luiz Carlos Junior Alcantara.



Research paper

HTLV-1aA introduction into Brazil and its association with the trans-Atlantic slave trade



Adjile Edjide Roukiyath Amoussa^{a,1}, Eduan Wilkinson^{b,1}, Marta Giovanetti^{a,c},
Filipe Ferreira de Almeida Rego^{a,d}, Thessika Hialla A Araujo^{a,e}, Marilda de Souza Gonçalves^a,
Tulio de Oliveira^b, Luiz Carlos Junior Alcantara^{a,*}

^a Laboratory of Hematology, Genetics and Computational Biology/Gonçalo Moniz Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, Bahia, Brazil

^b Africa Centre for Health and Population Studies, University of Kwazulu-Natal, Durban, South Africa

^c University of Rome "Tor Vergata", Italy

^d Catholic University of Salvador, Salvador, Bahia, Brazil

^e Bahia School of Medicine and Public Health/Bahia Foundation for Development of Science, Salvador, Bahia, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 September 2016

Received in revised form 21 November 2016

Accepted 6 December 2016

Available online 08 December 2016

Keywords:

HTLV
Brazil
Southern Africa
Trans-Atlantic slave trade

ABSTRACT

Introduction: Human T-lymphotropic virus (HTLV) is an endemic virus in some parts of the world, with Africa being home to most of the viral genetic diversity. In Brazil, HTLV-1 is endemic amongst Japanese and African immigrant populations. Multiple introductions of the virus in Brazil from other epidemic foci were hypothesized. The long terminal repeat (LTR) region of HTLV-1 was used to infer the origin of the virus in Brazil, using phylogenetic analysis.

Methods: LTR sequences were obtained from the HTLV-1 database (<http://htlv1db.bahia.fiocruz.br>). Sequences were aligned and maximum-likelihood and Bayesian tree topologies were inferred. Brazilian specific clusters were identified and molecular-clock and coalescent models were used to estimate each cluster's time to the most recent common ancestor (tMRCA).

Results: Three Brazilian clusters were identified with a posterior probability ranged from 0.61 to 0.99. Molecular clock analysis of these three clusters dated back their respective tMRCAs between the year 1499 and the year 1668. Additional analysis also identified a close association between Brazilian sequences and new sequences from South Africa.

Conclusion: Our results support the hypothesis of a multiple introductions of HTLV-1 into Brazil, with the majority of introductions occurring in the post-Colombian period. Our results further suggest that HTLV-1 introduction into Brazil was facilitated by the trans-Atlantic slave trade from endemic areas of Africa. The close association between southern African and Brazilian sequences also suggested that greater numbers of the southern African Bantu population might also have been part of the slave trade than previously thought.

© 2016 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) was the first human pathogenic retrovirus to be discovered (Gallo, 2011). HTLV-1 is associated with many severe diseases, such as Adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) (Poiesz et al., 1980; Yoshida et al., 1982) and HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) (Gessain et al., 1985). However, the majority of infected people remain asymptomatic (Bandeira et al., 2015). It is estimated that at least between 5 and 10 million people are infected with the virus, with specific

areas of endemicity (Gessain and Cassar, 2012). The endemic areas for this virus are sub-Saharan Africa, Central and South America, the Caribbean, Japan, Melanesia and the Middle East (Proietti et al., 2005; Gonçalves et al., 2010). Japan and the African continent are the most important areas where HTLV-1 is endemic, followed by South America (Gessain and Cassar, 2012).

Phylogenetic analysis of the LTR region of HTLV-1, the most diverse region of the viral genome, classifies the virus into seven major genetic subtypes (a–g). These are: a, or the cosmopolitan subtype (Miura et al., 1994); b, or the Central African subtype (Vandamme et al., 1994); c, or the Melanesian subtype (Gessain et al., 1991); d, or the Cameroonian subtype (Chen et al., 1995; Mahieux et al., 1997); e, or the Democratic Republic of Congo subtype; f, or the Gabonese subtype (Salemi et al., 1998); and g, also from Cameroon (Wolfe et al., 2005). The cosmopolitan subtype is divided into five subgroups: A, or transcontinental, B or

* Corresponding author at: Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia, Brazil.

E-mail addresses: amoussaroukiyath@yahoo.fr (A.E.R. Amoussa),

ewilkinson83@gmail.com (E. Wilkinson), lalcan@bahia.fiocruz.br (L.C.J. Alcantara).

¹ Same contribution.

Japanese, C or West African, D or North African (Miura et al., 1994) and E or Black Peruvian (Van Dooren et al., 1998). However, the transcontinental subgroup of the cosmopolitan subtype (HTLV-1aA) is spread worldwide (Gessain and Cassar, 2012), mainly in Latin America and southern Africa (Alcantara et al., 2006). The HTLV-1aC genotype is described in West Africa while recent reports of HTLV-1aD have been documented in West African countries like Guinea-Bissau, Gambia, Ghana, Ivory Coast and Senegal (Zehender et al., 2008; van Tienen et al., 2012; Desrames et al., 2014). Furthermore, a recent report described viral recombination between HTLV-1 strains currently present in North Africa and West Africa (Desrames et al., 2014).

Brazil is the country in South America that received the bulk of immigrants hailing from different parts of the world. An admixed population comprising people of African, European, Asian and native America backgrounds, characterizes the population of Brazil today. HTLV-1 in Brazil is concentrated amongst individuals who descend from immigrant populations from areas where the virus is endemic, such as Africa and Japan (Paiva and Casseb, 2015). The city of Salvador is estimated to be home to the largest number of HTLV-1 infections in Brazil and it shares many socio-demographic characteristics of some African countries (Alcantara et al., 2003; Mota et al., 2007; Rego et al., 2008). A large proportion of the city's population are the descendants of African immigrants. It is estimated that Brazil received roughly four million slaves during the trans-Atlantic slave trade (Alcantara et al., 2003). It is believed that the bulk of slaves were sourced from Portuguese ports in western Africa (e.g. present day Angola and Guinea Bissau). However, some recent studies reported a close association between HTLV-1 isolates from Brazil and the southern African region (Alcantara et al., 2006; Mota et al., 2007). This close relationship suggests that HTLV-1 was also brought to Brazil via the slave trade from southern African ports (e.g. Mozambique and Madagascar). On a human genetic level, it has also been demonstrated that 26.5% of the descendants of African slaves living in Salvador, Bahia, carry the BEN/CAR (Benin/Central African Republic) β -globin haplotype. This haplotype of the β -globin gene circulates primarily amongst Bantu speakers from the southern African region (Alcantara et al., 2006; Rego et al., 2008).

Brazil also received large numbers of Japanese migrants during the first half of the 20th century (Alcantara et al., 2003). In Brazil, HTLV-1 was first described in the Japanese immigrant population from Okinawa, Southern Japan, residing in the city of Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul. Recently, a prevalence of 6.8% of infection was found amongst adult Japanese immigrants and their descendants living in Campo-Grande (Mato Grosso do Sul). Phylogenetic analysis performed in this population showed that the cosmopolitan subtype of Transcontinental and Japanese subgroup are the most circulated amongst this population (Bandeira et al., 2015).

Several studies have investigated the origin of HTLV-1 in Latin America, particularly in Brazil (Alcantara et al., 2003; Magalhães et al., 2008; Aleluia et al., 2015). The majority of these studies support the hypothesis of multiple introductions of HTLV-1aA into Brazil during the post-Columbian period (> 1492) (Van Dooren et al., 1998; Alcantara et al., 2003; Rego et al., 2008). On the basis of this consideration, the aim of the present study was to estimate the date of the introduction of HTLV-1 into Brazil (i.e. time to the most recent common ancestor) and investigate the relationship amongst African and Brazilian isolates in order to better understand the ethnic origin of people of African descent residing within Brazil today.

2. Methods

2.1. Dataset composition

A total of 390 HTLV-1 LTR sequences were retrieved from the HTLV database (<http://htlv1db.bahia.fiocruz.br>), including 120 sequences from Brazil (Araujo et al., 2012). A breakdown of the 390 sequences, their Genbank accession numbers, country of origin and sampling

dates are provided in Supplementary materials. Each sequence was annotated as follows: (i) two-letter country code corresponding to the International Organization for Standardization (ISO) codes, (ii) their unique Genbank accession numbers, (iii) the subtype and (iv) their isolation date (if available). Sequences without a date of sampling were assigned an arbitrary isolation date (e.g. 2007 or 2015). We feel this to be acceptable because of the low mutation rate of HTLV-1 and the fact that the majority of sequences were derived from contemporary sampling (~1990 to the present). Genbank accession numbers of the LTR sequences obtained from the HTLV database can be found in Supplementary materials.

2.2. Preliminary phylogenetic analysis of the LTR dataset

All the 390-LTR sequences were aligned against one another in ClustalW (Thompson et al., 1997) using a quick tree method to speed up the alignment process. The alignment was manually edited using the Geneious v 8.0.5 software package (Kearse et al., 2012). Prior to any phylogenetic inference, we performed recombination analysis in order to rule out viral recombination. To this end, we aligned the 390 LTR sequences, along with 41 LTR sequences recently described by Desrames et al., 2014 as a positive control, as described previously (Desrames et al., 2014). Desrames and colleagues described the presence of viral recombination amongst the 41 LTR sequences which they collected from 19 different African countries. GenBank accession numbers of the 41 LTR sequences recently described by Desrames et al., 2014 are presented in Supplementary materials.

The alignment was imported into Recombination Detection Programme (RDP) v 4.0 (Martin et al., 2015) and a detailed scan for viral recombination was performed. Once recombination had been ruled out, we inferred a maximum likelihood (ML)-tree topology in RAXML v 8.0.0 (Stamatakis, 2014). The general time reversible (GTR) model of nucleotide substitution (Lanave et al., 1984; Rodríguez et al., 1990) and an estimated gamma shape parameter (Anderson and Ray, 1975) was used to infer the tree in RAXML. The multiple or rapid bootstrap resampling method ($n = 1,000$) was implemented on a 12-core MacPro to infer support for splits. The ML-tree topology was visualized in FigTree v 1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) and rooted on the Subgroup C ancestral branch. The ML-tree topology was further analysed in Path-O-gen to evaluate the molecular clocklikeness of the dataset. To this end, all non-transcontinental sequences were removed from the tree topology with the ape package in R prior to analysis in Path-O-gen. This ensured that reliable clocklike parameters for the HTLV-1aA group were obtained.

Due to poor bootstrap support values in the ML-tree topology, a Bayesian tree topology was inferred for the entire LTR dataset in MrBayes v 3.2.5 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001) using the GTR model of nucleotide substitution (Lanave et al., 1984; Rodríguez et al., 1990). To speed up the analysis, we inferred Bayesian tree topologies using the multi-threaded version of MrBayes with four independent chains spread over four computational nodes. Posterior trees and parameters were sampled in a Metropolis Hastings Markov Chain Monte Carlo (MCMC) chain with a total length of 100 million steps and a sample frequency of every 10,000 steps. Following 100 million steps in the analysis, the MCMC was evaluated based on the average standard deviation of splits (<0.01) and the posterior parameters, which were evaluated in the Tracer v 1.6 software application (<http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>). The resulting Bayesian tree topology was visualized in FigTree v 1.4.2 and manually edited for better visual interpretation.

2.3. Phylodynamic inference of the HTLV epidemic in Brazil

Three Brazilian clusters were identified in the Bayesian tree topology. The date of origin of each clusters was estimated using the BEAST v 1.8.2 software package (Drummond and Rambaut, 2007). Molecular clock analysis was implemented under the Tamura-Nei model of

nucleotide substitution, an estimated gamma shape parameter (TN93 + G) and a strict molecular clock assumption. Since HTLV-1 is an endemic virus with no signs of spreading, we chose to infer epidemic histories under a constant population size tree prior (Drummond and Rambaut, 2007) and a fixed mutation rate of 2.0×10^{-5} substitutions/site/year. MCMC analysis for each cluster were run for 1 billion steps, while posterior parameters and trees were sampled every 100,000 step in the chain. MCMC convergence and overall performance (based on large Effective Sample Sizes, ESS > 200) were assessed in Tracer v 1.6. Following the discarding of the first 10% of samples from the posterior distribution, the estimated root height for each cluster was recorded along with the 95% highest posterior density (HPD).

Our justification for using a mutation rate of 2.0×10^{-5} substitutions/site/year was based on the estimated mutation rate that was calculated by Alcantara and colleagues (Alcantara et al., 2006). This rate was estimated from a vertical transmission pair between a mother and an infant containing a single point mutation between the two. When Alcantara and colleagues added an additional 16-transmission pairs, the estimated mutation rate was approximately ten times slower (4.49×10^{-5} substitutions/site/year, 95% confidence interval 1.34×10^{-5} – 1.08×10^{-6}). However, out of the combined 17 transmission chains, only three point mutations were informative. Our rate was within the lower 95% confidence interval of the 17 pair estimated rate. Furthermore, our molecular clock analysis of our ML-tree topology in Path-O-Gen, suggested a mutation rate of 3.67×10^{-5} substitutions/site/year, based on the slope of the root to tip regression.

2.4. Phylodynamic inference of the HTLV-1 infection in South Africa

In order to analyse the phylogenetic relationship between Brazilian and South African sequences, another dataset was constructed by adding seven recently genotyped HTLV-1 isolates from South Africa. These sequences were derived from HTLV-1/HIV-1 co-infected

individuals in a rural area of northern KwaZulu-Natal, South Africa, close to the Mozambican border. Rego and colleagues previously described the genotyping of these seven isolates (Rego et al., 2013). The 390 LTR HTLV-1 sequences were aligned against the seven South African isolates in ClustalW and manually edited, as previously described. Due to the shorter length of the seven South African sequences, the alignment was reduced to 468 base pairs (bp). A Bayesian tree topology was inferred from this new alignment in MrBayes under the same models and parameters as previously described. The resulting tree topology was visually inspected to determine the association between Brazilian and South African isolates and to verify the clustering of Brazilian clades. Molecular clock and coalescent analysis of these Brazilian clusters were performed as previously described to validate our previous estimates.

3. Results

3.1. Recombination and phylogenetic inference

Our analysis in RDP4 could not identify any signs of viral recombination amongst the 390 LTR sequences that were retrieved from the HTLV-1 sequence database. Phylogenetic inference in a maximum-likelihood framework produced a phylogeny consistent with clustering observed in previous studies (Alcantara et al., 2003). However, the branch supports for splits in this tree topology were largely unresponsive (bootstrap < 70), with the exception being branches for major subtypes (i.e. cosmopolitan subtype HTLV-1a). The overall low bootstrap support in this dataset can be attributed to the slow mutation rate of the HTLV-1 virus, which has resulted in a very homogenous viral population within major subtypes.

The removal of non-transcontinental sequences from this tree topology with the ape package and the subsequent analysis in Path-O-gen revealed that the dataset carried enough clocklike signal. The slope of the

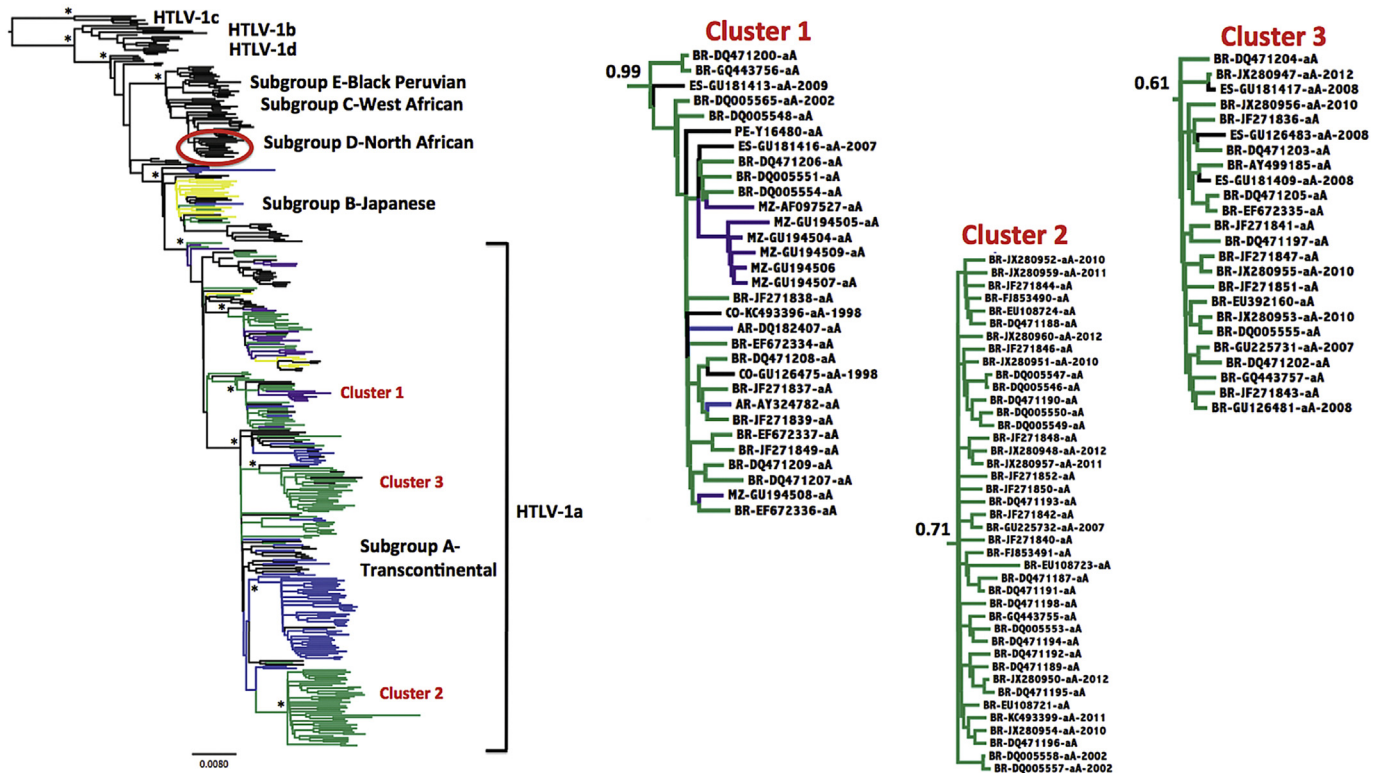


Fig. 1. Tree topology of 390 LTR sequences of HTLV-1 isolates. The sequence alignment covered 552-bp and the tree topology was inferred under a GTR substitution model with gamma site heterogeneity in MrBayes. Support values for branches with a posterior support >0.6 are marked with an asterisk. All Brazilian sequences are marked green, Japanese sequences yellow, Mozambican purple and Argentinian in blue. The genetic distance is shown at the bottom. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

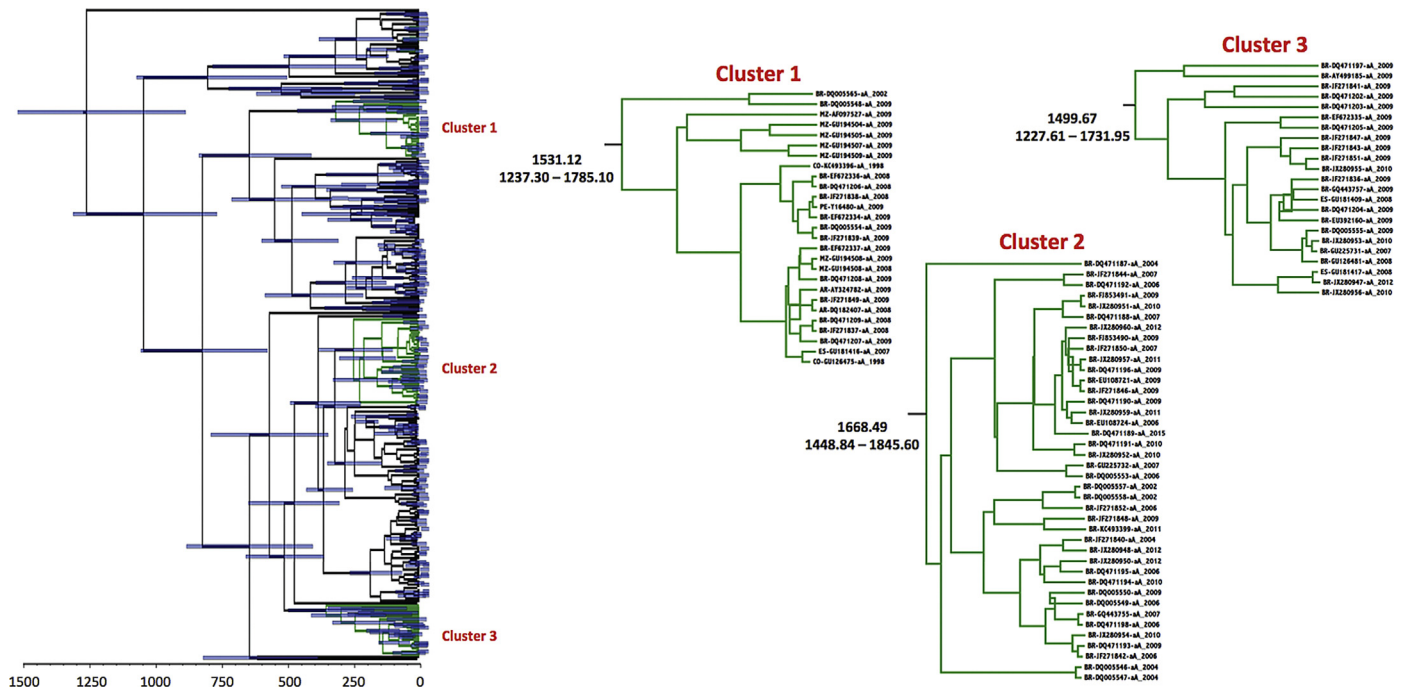


Fig. 2. Time scaled tree topology of the 290 sequences in the transcontinental clade of HTLV-1. The tree was inferred through sampling in BEAST under a Tamura-Nei model of nucleotide substitution. A strict molecular clock was used along all branches with a fix mutation rate of 2.0×10^{-5} substitutions/site/years and a constant population size tree prior. On the right hand side are the three LTR clusters with their estimated time of origin. On the left hand side is a big transcontinental Bayesian time resolved phylogenetic tree with 111 LTR Brazilian sequences.

regression analysis was 3.67×10^{-5} substitutions/site/year, which broadly correlates with the known mutation rate for the LTR region of HTLV-1. The x-intercept for the regression analysis was 1188.268, while the R squared (R^2) for the Path-O-gen analysis was only 3.9×10^{-3} . The low R^2 for this dataset can be attributed to the slow mutation rate of HTLV-1, in comparison with other viruses (e.g. HIV).

The Bayesian phylogenetic tree of the 390 LTR sequences was consistent with the clustering pattern observed in the ML-tree topology. For the epidemic reconstruction, three Brazilian clusters were identified (Cluster 1, 2 and 3). All the Brazilian isolates clustered within the main transcontinental subgroup A of HTLV-1 (Fig. 1), together with sequences from Mozambique and other South American sequences (e.g. Argentina, Colombia, or Peru). Only five of the Brazilian isolates clustered with Japanese sequences (Fig. 1). Cluster 1 (posterior probability = 0.99) included 28 sequences; 15 from Brazil, seven from Mozambique, two from Colombia, two from Argentina, one from Peru and one from Spain. Cluster 2 (posterior probability = 0.71) included only Brazilian sequences ($n = 41$), while Cluster 3 (posterior probability = 0.61) included 24 sequences, 21 from Brazil, and three from Spain. Descriptions of accession numbers contained in each cluster are detailed in Supplementary materials.

3.2. Phylodynamic reconstruction of the Brazilian epidemic

Fig. 2 shows a time resolved phylogenetic tree, which was constructed for the entire transcontinental clade (HTLV-1a) in the BEAST package. The clustering of the three Brazilian clades in this time resolved phylogenetic tree was consistent with the clustering in the Bayesian tree topology that was constructed in MrBayes (Fig. 1). The estimated tMRC for each of the Brazilian clusters as well as for the entire transcontinental group are summarized in Table 1. The estimated date of origin for Cluster 1 was around the year 1531.12 CE (95% HPD: 1237.30–1785.10) and includes sequences from Brazil, Argentine and Mozambique. The estimated tMRC for Cluster 2, which contained only Brazilian isolates, was around the year 1668.49 CE (95% HPD: 1448.84–1845.60) Finally, the origin of Cluster 3 dated back to the year 1499.67 CE (95% HPD: 1227.61–1731.95).

3.3. Phylodynamic relationship between southern African and Brazilian isolates

The phylogenetic analysis of the dataset, enriched by the seven sequences from South Africa (Genbank accession numbers: KF042345–KF042351), identified these seven isolates as belonging to the cosmopolitan subtype transcontinental subgroup of HTLV-1aA. The Bayesian tree topology analysis showed that the seven South African sequences grouped into two different monophyletic clusters in the cosmopolitan subtype transcontinental subgroup cluster. Five sequences grouped with Mozambican and South American sequences ($PP = 0.99$) and the remaining two sequences with South American and Mozambican sequences ($PP = 0.10$). Within these two clades, a close clustering between the seven southern African sequences and sequences from Mozambique and Brazil was further identified (Fig. 3). The phylogenetic analysis showed that the clade which contained seven sequences from South Africa was formed with Brazilian sequences isolated in Salvador, Bahia/Molecular clock analysis of these two clusters produced estimated dates of origin that were slightly more recent but still within the 95% HPD confidence intervals of our previous analysis. The posterior support for the splits in this tree was dramatically lower than the previous tree

Table 1

Estimated dates of origin of each of the identified clusters.

	Models parameters	tMRC	95% HPD interval	ESS
Cluster 1	strict.const.fix.01	1531.12	1237.30–1785.10	9001
	strict.const.fix.02	1529.61	1236.28–1784.28	9001
Cluster 2	strict.const.fix.01	1668.49	1448.84–1845.60	8635.44
	strict.const.fix.02	1668.27	1456.32–1842.79	8300.93
Cluster 3	strict.const.fix.01	1499.67	1227.61–1731.95	9001
	strict.const.fix.02	1498.10	1232.03–1727.51	9001
Transcontinental	strict.const.fix.01	728.05	306.61–1086.73	9001
	strict.const.fix.02	732.82	323.97–1090.51	9001

tMRC – time to the most recent common ancestor; HPD – highest posterior density; ESS – Effective Sample Size; fix – fixed mutation rate; strict – strict molecular clock assumption; const – constant population size tree prior.

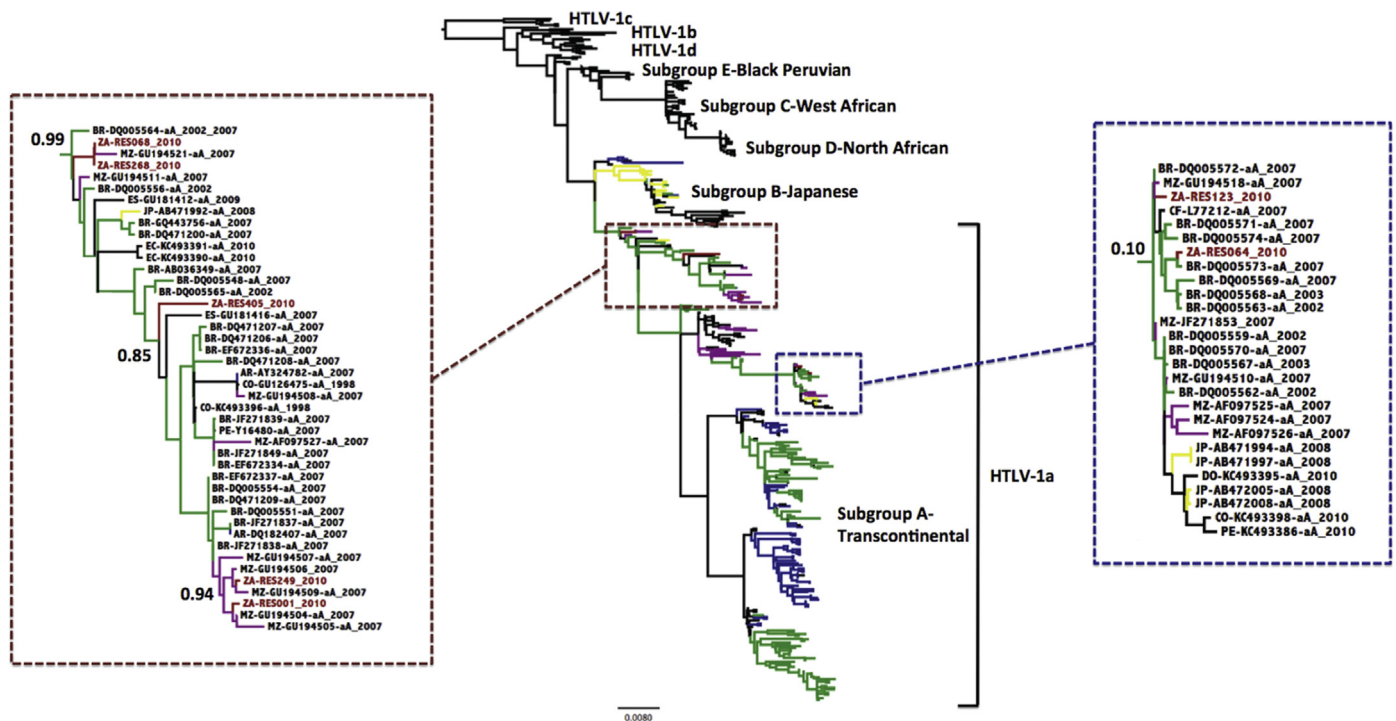


Fig. 3. Tree topology of 397 LTR sequences of HTLV-1 isolates, including the seven samples from South Africa. The sequence alignment covered 468-bp and the tree topology was inferred under a GTR substitution model with gamma site heterogeneity in MrBayes. Support values for branches with a posterior support >0.6 are marked with an asterisk. All Brazilian sequences are marked green, Japanese sequences yellow, Mozambican purple and Argentinian in blue. The genetic distance is shown at the bottom. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

presented in Fig. 1, due to the shorter length of the alignment (468 bp vs. 552 bp).

4. Discussion

The phylogenetic inference of the LTR sequences retrieved from the database (<http://htlv1db.bahia.focruz.br>) was performed to investigate the time of introduction of the transcontinental subtype of HTLV-1 in Brazil using Bayesian inference. Our results support the hypothesis of an African origin of the HTLV-1 epidemic in Brazil, in particular in Salvador, Bahia, which was closely linked to the slave trade era between the 16th to 20th centuries. The dispersal of Brazilian sequences throughout the transcontinental clade, and the existence of large Brazilian clusters in the Bayesian tree topology (Fig. 1), confirm the hypothesis of multiple introductions of HTLV-1aA into Brazil. The estimated tMRCAs of all of the clusters we identified was around the year 1500 CE, which suggests that the bulk of introductions of HTLV-1aA occurred during the post-Columbian period (Table 1).

Considering that the Brazilian population is composed of at least of three ancestral population groups (European, African and Amerindian), and that the HTLV-1aA subgroup is found in many parts of the world, we suggest that the multiple introduction of HTLV into Brazil is the result of different sources of immigrant populations, primarily from Africa. Approximately 80% of the population of Salvador have ethnic African ancestry. This is reflected in the language, religion and customs of individuals from Salvador (Alcantara et al., 2003). Moreover, a close relationship between Brazilian and southern African isolates was previously described (Alcantara et al., 2006; Mota et al., 2007). Our analysis was also able to show one cluster (PP > 0.99) in which Brazilian and Mozambique sequences appear closely related. This relationship seems to confirm the hypothesis that southern Africans were brought to Brazil as part of the slave trade during the 16th and 19th centuries (Alcantara et al., 2003; Rego et al., 2008).

According to historical reports, HTLV-1 emerged in Central Africa and then spread throughout the world (Van Dooren et al., 2001).

Therefore, Africa is host to most of the genetic variability of HTLV-1 (Van Dooren et al., 2001). Some studies have already confirmed the presence of HTLV-1aA in Maputo (Mozambique), with a prevalence of 4.5%, amongst HIV co-infected patients (Bhatt et al., 2009; Vicente et al., 2011). The genetic relationship between South African and Mozambican HTLV-1aA strains suggests a common origin of HTLV-1 in these two countries. Bantu populations in South Africa are ethnically related to populations in current day southern Mozambique, where the port of Maputo is located (Vicente et al., 2011). The characterization of HTLV-1aA as a prevalent subgroup deriving from Mozambique, suggests that perhaps the transcontinental subgroup could also have been introduced to Latin America independently, mainly from Mozambique to Brazil. This is supported by the Portuguese colonial history and the use of Portuguese as an official language in Mozambique.

Human genetic testing in Salvador Bahia, has reported a large presence (26.5%) of the BEN/CAR β -globin haplotype amongst individuals of African heritage. This haplotype of the β -globin gene is prevalent amongst Bantu speakers from the southern African region (Alcantara et al., 2006; Rego et al., 2008). Moreover, viral sequences derived from patients that were part of the human ancestry study from Salvador, Bahia (Alcantara et al., 2006; Rego et al., 2008) was present in all three of the clusters. Our results presented here confirm previous findings that suggested a post-Columbian African origin of this HTLV in Salvador, Bahia (Alcantara et al., 2003).

Portugal had three main African colonies from where slaves could be sourced. These are the present day countries of Mozambique, Angola and Guinea Bissau. In Angola and Mozambique the HTLV-1aA variant is prevalent (Van Dooren et al., 2001; Bhatt et al., 2009; Vicente et al., 2011), while in Guinea Bissau, the HTLV-1aD variant is the most prevalent (Fig. 1). HTLV-1aD variants from Guinea Bissau cluster in a monophyletic clade along with other West African strains from Senegal (red circle Fig. 1). It is curious to note that there is no genetic relationship between Brazilian and Guinea Bissau HTLV variants, either in the tree topologies we inferred in the present study or in any previous reports

(van Tienen et al., 2012). This could imply that slaves from Guinea Bissau were exported to other slave colonies in North America and the Caribbean in preference to colonies in South America. However, we can negate this hypothesis as official reports indicate that the majority of Africans brought to Bahia (Brazil) during the slave trade came from West African ports (Curtin, 1969; Verger, 1976). The absence of West African HTLV-1 strains in Salvador, Bahia, and the close genetic relationship between viral isolates from southern Africa and isolates from Salvador, Bahia, suggests that the bulk of HTLV-1aA introductions came from slaves originating from ports in the southern African region (e.g. in Angola, Mozambique and the Indian ocean).

Apart from the association between Brazilian and African sequences, a close relationship between Brazilian and Argentinian isolates was also observed (Fig. 1). Brazil and Argentina are neighbouring countries in Latin America and several studies have already found HTLV-1aA to be endemic in Argentina amongst Amerindians (Berini et al., 2013; Gastaldello et al., 2008; Pineda et al., 2015). These studies suggested that HTLV-1aA in Argentina spread from the Amerindians of South America to other ethnic groups within the country (Gastaldello et al., 2008). Our analysis showed at least one cluster containing Brazilian and Argentinian sequences (Cluster 1), but the estimated date of the cluster correlated with the trans-Atlantic slave trade period, which would suggest a much more recent transmission between the two countries (Fig. 1).

Considering the ancestral human migrations, one hypothesis suggests that the introduction of HTLV-1aA in Latin America would have happened following the migration of the Mongoloid population of Asia to the New World via the Bering Strait at the last glaciation period, approximately 10,000–15,000 years ago (Paiva and Casseb, 2015). The evidence that reinforce this theory is the identification of an HTLV-1 isolate in an Andean mummy dated approximately 1500 years old. This led to the conclusion that the mummy strain was carried into the New World during the ancestral migrations of humans from Asia across the Bering Strait (Li et al., 1999). Our phylogenetic and molecular clock analysis do not supported the idea that HTLV-1aA was introduced to the new world through the land bridge of Beringia, as was suggested by Miura et al. (1994) & Yamashita et al. (1998), but rather through the slave trade that occurred during the colonial era. Therefore, based on these conflicting reports, it is possible that HTLV-1 may have been introduced multiple times over a much wider timescale than previously thought.

Additionally, a close association between three Spanish sequences and a Brazilian cluster was observed (Fig. 1). Historical data reports that Salvador also has a higher Spanish ancestry than others states of Brazil, especially immigrants from the Galicia region of Spain (Bacelar, 1994; Leira, 2002). This hypothesis supports the fact that Spanish immigrants could also have participated in the introduction of the HTLV-1aA into Brazil. It is important to note that HTLV-1aA is the subtype also characterized amongst Spain infected individuals (Vallejo et al., 2003; Treviño et al., 2014). However, over the past 10 years, Spain has received a considerable flow of immigrants from South American countries, who have to the ethnic and cultural heterogeneity of the population. Many of the foreigners come from Brazil, with which Spain shares historic links, and to a lesser extent from Sub-Saharan Africa (Pádua et al., 2011). Likewise, we can be suggested that the immigrants from South America who were infected with HTLV-1aA introduced the virus in Spain. The route of introduction of the virus between Brazil and Spain should be investigated, because of the grouping in the same cluster of Brazilians and Spain sequences observed in our study. In addition, haplotype analysis of the infected individuals from Spain should be carried out to clarify the clustering of the Brazilian and Spanish sequences.

Finally, our data also confirms the hypothesis that the migrations of Japanese migrants to Latin America during the first half of the 20th century also brought HTLV-1 to Brazil (Van Dooren et al., 1998). This is evident in the association between Japanese and Brazilian sequences

within the transcontinental clade. This association has already been highlighted by several studies and the HTLV-1 virus was described for the first time in Brazil amongst the Japanese immigrant population (Kitagawa et al., 1986; Alcantara et al., 2003).

In conclusion, in this highly admixed population, our results seem to support the hypothesis of multiple introductions of HTLV-1aA into Brazil mainly via and during the Africans slave trade. Our results support the hypothesis that southern African Bantu populations infected with HTLV-1aA participated in the introduction of this subgroup into Latin America, which was facilitated through the trans-Atlantic slave trade. However, because of the high number of migrations from Africa, the investigation of HTLV-1 isolates and haplotypes from other Bantu-speaking groups (Central and West Africa) should be conducted to increase knowledge about the origin of Brazilian Afro descendants. Likewise, the origin of the HTLV-1aA in Spain should be investigated because of the close relationship observed in our study between Brazilian and Spanish strains. Therefore, it is important to continue to study the migratory routes of infected individuals, and understand how the virus spread around the world not only for the evolutionary history of the virus, but also in order to curb the spread of the virus.

Acknowledgements

This work was supported by CNPq (200328/2015-8) Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil. E.W. and T.d.O are funded by a Medical Research Council flagship grant of the Republic of South Africa (MRC-RFA-UFSP-01-2013/UKZN HIVEPI).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2016.12.005>.

References

- Alcantara Jr., L.C., Van Dooren, S., Gonçalves, M.S., Kashima, S., Costa, M.C.R., Santos, F.L.N., Bittencourt, A.A.L., Dourado, I., Filho, A.A., Covas, D.T., Vandamme, A.M., Galvão-Castro, B., 2003. Globin haplotypes of human T-cell lymphotropic virus type I-infected individuals in Salvador, Bahia, Brazil, suggest a post-Columbian African origin of this virus. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 33, 536–542.
- Alcantara, L.C., de Oliveira, T., Gordon, M., Pybus, O., Mascarenhas, R.E., Seixas, M.O., Gonçalves, M., Hlela, C., Cassol, S., Galvão-Castro, B., 2006. Tracing the origin of Brazilian HTLV-1 as determined by analysis of host and viral genes. *AIDS* 20, 780–782.
- Aleluia, M.M., Mello, M.A.G., Alcântara, L.C.J., Rego, F.F.A., de Souza Santos, L.P., Galvão-Castro, B., de Souza Gonçalves, M., de Oliveira, T., Marin, L.J., Sousa, S.M.B., Gadelha, S.R., 2015. The origin of HTLV-1 in southern Bahia by phylogenetic, mtDNA and β -globin analysis. *Virology* 5, 63–74.
- Anderson, C.W., Ray, W.D., 1975. Improved maximum likelihood estimators for the gamma distribution. *Commun. Stat.* 4, 437–448.
- Araujo, T.H.A., Souza-Brito, L.I., Libin, P., Deforche, K., Edwards, D., de Albuquerque-Junior, A.E., Vandamme, A.-M., Galvão-Castro, B., Alcantara, L.C.J., 2012. A Public HTLV-1 Molecular Epidemiology Database for Sequence Management and Data Mining. *PLoS ONE* 7, e42123.
- Bacelar, J.A., 1994. *Galegos no paraíso racial*. Centro Editorial e Didático.
- Bandeira, L.M., Uehara, S.N.O., Asato, M.A., Aguiar, G.S., Maedo, C.M., Benites, N.H., Puga, M.A.M., Rezende, G.R., Finotti, C.M., Cesar, G.A., Tanaka, T.S.O., Castro, V.O.L., Otsuki, K., Vicente, A.C.P., Fernandes, C.E., Motta-Castro, A.R.C., 2015. High prevalence of HTLV-1 infection among Japanese immigrants in non-endemic area of Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, e0003691.
- Berini, C.A., Delfino, C., Torres, O., García, G., Espejo, R., Pianciola, L., Juárez, M., Arribere, G., Nadal, M., Eirin, M.E., Biglione, M.M., 2013. HTLV-1 cosmopolitan and HTLV-2 subtype b among pregnant women of non-endemic areas of Argentina. *Sex. Transm. Infect.* 89, 333–335.
- Bhatt, N.B., Gudo, E.S., Sema, C., Bila, D., Di Mattei, P., Augusto, O., Garsia, R., Jani, I.V., 2009. Loss of correlation between HIV viral load and CD4+ T-cell counts in HIV/HTLV-1 co-infection in treatment naive Mozambican patients. *Int. J. STD AIDS* 20, 863–868.
- Chen, J., Zekeng, L., Yamashita, M., Takehisa, J., Miura, T., Ido, E., Mboudjeka, I., Tsague, J.M., Hayami, M., Kaptue, L., 1995. HTLV type I isolated from a pygmy in Cameroon is related to but distinct from the known central African type. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 11, 1529–1531.
- Curtin, P.D., 1969. *The Slave Atlantic Trade: A Census*. The University of Wisconsin Press, Milwaukee.
- Desrames, A., Cassar, O., Gout, O., Hermine, O., Taylor, G.P., Afonso, P.V., Gessain, A., 2014. Northern African strains of human T-lymphotropic virus type 1 arose from a recombination event. *J. Virol.* 88, 9782–9788.

- Drummond, A.J., Rambaut, A., 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol. Biol.* 7, 214.
- Gallo, R.C., 2011. Research and discovery of the first human cancer virus, HTLV-1. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 24, 559–565.
- Gastaldello, R., Iñiguez, A.M., Otsuki, K., Lamas, G., Balangero, M., Barbas, M.G., Mangano, A., Sen, L., Maturano, E., Remondegui, C., Vicente, A.C.P., Gallego, S., 2008. HTLV type 1 genetic types among native descendants in Argentina. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 24, 1139–1146.
- Gessain, A., Barin, F., Vernant, J.C., Gout, O., Maurs, L., Calender, A., de Thé, G., 1985. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet* 2, 407–410 (Lond. Engl.).
- Gessain, A., Cassar, O., 2012. Epidemiological Aspects and world distribution of HTLV-1 infection. *Front. Microbiol.* 3, 388.
- Gessian, A., Yanagihara, R., Franchini, G., Garruto, R.M., Jenkins, C.L., Ajdukiewicz, A.B., Gallo, R.C., Gajdusek, D.C., 1991. Highly divergent molecular variants of human T-lymphotropic virus type I from isolated populations in Papua New Guinea and the Solomon Islands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 7694–7698.
- Gonçalves, D.U., Proietti, F.A., Ribas, J.G.R., Araujo, M.G., Pinheiro, S.R., Guedes, A.C., Carneiro-Proietti, A.B.F., 2010. Epidemiology, treatment, and prevention of human T-cell leukemia virus type 1-associated diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 23, 577–589.
- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F., 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17, 754–755 Oxf. Engl.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., Drummond, A., 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28, 1647–1649 Oxf. Engl.
- Kitagawa, T., Fujishita, M., Taguchi, H., Miyoshi, I., Tadokoro, H., 1986. Antibodies to HTLV-1 in Japanese immigrants in Brazil. *JAMA* 256, 2342.
- Lanave, C., Preparata, G., Saccone, C., Serio, G., 1984. A new method for calculating evolutionary substitution rates. *J. Mol. Evol.* 20, 86–93.
- Leira, L.P., 2002. Galegos na Bahia de todos os Santos. *Galicia en El Mundo Edicións. Editora Graciela Alba Burgos, Spain*, pp. 5–12.
- Li, H.C., Fujiyoshi, T., Lou, H., Yashiki, S., Sonoda, S., Cartier, L., Nunez, L., Munoz, I., Horai, S., Tajima, K., 1999. The presence of ancient human T-cell lymphotropic virus type I provirus DNA in an Andean mummy. *Nat. Med.* 5, 1428–1432.
- Mahieux, R., Ibrahim, F., Mauclere, P., Herve, V., Michel, P., Tekai, F., Chappey, C., Garin, B., Van Der Ryst, E., Guillemin, B., Ledru, E., Delaporte, E., de The, G., Gessain, A., 1997. Molecular epidemiology of 58 new African human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) strains: identification of a new and distinct HTLV-1 molecular subtype in Central Africa and in Pygmies. *J. Virol.* 71, 1317–1333.
- Martin, D.P., Murrell, B., Golden, M., Khoosal, A., Muhire, B., 2015. RDP4: detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evol.* 1, vev003.
- Magalhães, T., Mota-Miranda, A.C., Alcantara, L.C.J., Olavarria, V., Galvão-Castro, B., Rios-Grassi, M.F., 2008. Phylogenetic and molecular analysis of HTLV-1 isolates from a medium sized town in northern of Brazil: tracing a common origin of the virus from the most endemic city in the country. *J. Med. Virol.* 80, 2040–2045.
- Miura, T., Fukunaga, T., Igarashi, T., Yamashita, M., Ido, E., Funahashi, S., Ishida, T., Washio, K., Ueda, S., Hashimoto, K., 1994. Phylogenetic subtypes of human T-lymphotropic virus type I and their relations to the anthropological background. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 1124–1127.
- Mota, A.C.A., Van Dooren, S., Fernandes, F.M., Pereira, S.A., Queiroz, A.T.L., Gallazzi, V.O., Vandamme, A.-M., Galvão-Castro, B., Alcantara, L.C.J., 2007. The close relationship between South African and Latin American HTLV type 1 strains corroborated in a molecular epidemiological study of the HTLV type 1 isolates from a blood donor cohort. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 23, 503–507.
- Pádua, E., Rodés, B., Pérez-Piñar, T., Silva, A.F., Jiménez, V., Ferreira, F., Toro, C., 2011. Molecular characterization of human T cell leukemia virus type 1 subtypes in a group of infected individuals diagnosed in Portugal and Spain. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 27, 317–322.
- Paiva, A., Casseb, J., 2015. Origine and prevalence of Human Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1) and type 2 (HTLV-2) among indigenous populations in the Americas. *Rev. Inst. Med. Trop* 57, 1–13.
- Pineda, M., Bouzas, M.B., Golemba, M., Remesar, M., Aulicino, P., Mammana, L., Tadey, L., Sen, L., Mangano, A., 2015. Molecular epidemiology of HTLV-1 in Argentina. *Retrovirology* 12, 85.
- Poiesz, B.J., Ruscetti, F.W., Gazdar, A.F., Bunn, P.A., Minna, J.D., Gallo, R.C., 1980. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77, 7415–7419.
- Proietti, F.A., Carneiro-Proietti, A.B.F., Catalan-Proaires, B.C., Murphy, E.L., 2005. Global epidemiology of HTLV-1 infection and associated diseases. *Oncogene* 24, 6058–6068.
- Rego, F.F., Alcantara, L.C.J., Moura Neto, J.P., Miranda, A.C. de S., P., M. de S., G., Galvão-Castro, B., 2008. HTLV type 1 molecular study in Brazilian villages with African characteristics giving support to the post-Columbian introduction hypothesis. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 24, 673–677.
- Rego, F.F.A., Galvão-Castro, B., Alcantara, L.C.J., de Oliveira, T., 2013. HIV and HTLV-1 Co-infection Effect on CD4 + Level of Patients Failing Anti-retroviral Therapy in Rural KwaZulu-Natal (Unpublished).
- Rodríguez, F., Oliver, J.L., Marín, A., Medina, J.R., 1990. The general stochastic model of nucleotide substitution. *J. Theor. Biol.* 142, 485–501.
- Salemi, M., Van Dooren, S., Audenaert, E., Delaporte, E., Goubau, P., Desmyter, J., Vandamme, A.M., 1998. Two new human T-lymphotropic virus type I phylogenetic subtypes in seroindeterminates, a Mbuti pygmy and a Gabonese, have closest relatives among African STLV-1 strains. *Virology* 246, 277–287.
- Stamatakis, A., 2014. RAXML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30, 1312–1313 Oxf. Engl.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G., 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25, 4876–4882.
- Treviño, A., Alcantara, L.C., Benito, R., Caballero, E., Aguilera, A., Ramos, J.M., de Mendoza, C., Rodríguez, C., García, J., Rodríguez-Iglesias, M., Ortiz de Lejarazu, R., Roc, L., Parra, P., Eiros, J., del Romero, J., Soriano, V., on behalf of the HTLV Spanish Study Group, 2014. Molecular epidemiology and clinical features of human T cell lymphotropic virus type 1 infection in Spain. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 30, 856–862.
- Vallejo, A., Capote, F.J., Guisado, F., Leal, M., Calderón, E., 2003. Cosmopolitan HTLV-1a subtype among Spanish native patients. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 19, 609–611.
- Vandamme, A.M., Liu, H.F., Goubau, P., Desmyter, J., 1994. Primate T-lymphotropic virus type I LTR sequence variation and its phylogenetic analysis: compatibility with an African origin of PTLV-1. *Virology* 202, 212–223.
- Van Dooren, S., Gotuzzo, E., Salemi, M., Watts, D., Audenaert, E., Duwe, S., Ellerbrok, H., Grassmann, R., Hagelberg, E., Desmyter, J., Vandamme, A.M., 1998. Evidence for a post-Columbian introduction of human T-cell lymphotropic virus [type I] [corrected] in Latin America. *J. Gen. Virol.* 79, 2695–2708.
- Van Dooren, S., Salemi, M., Vandamme, A.M., 2001. Dating the origin of the African human T-cell lymphotropic virus type-i (HTLV-1) subtypes. *Mol. Biol. Evol.* 18, 661–671.
- Van Tienen, C., de Silva, T.L., Alcantara, L.C.J., Onyango, C.O., Jarju, S., Gonçalves, N., Vincent, T., Aaby, P., Whittle, H., van der Loeff, M.S., Cotten, M., 2012. Molecular epidemiology of endemic human T-lymphotropic virus type 1 in a rural community in Guinea-Bissau. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1690.
- Verger, P., 1976. Mouvement des navires. P.12. In: Verger, P. (Ed.), *Trade Relations Between the Bight of Benin and Bahia, 17th to 19th century*. Trans. Ibadan University Press, Ibadan, pp. 24–26 Evelyn Crawford.
- Vicente, A.C.P., Gudo, E.S., Iñiguez, A.M., Otsuki, K., Bhatt, N., Abreu, C.M., Vubil, A., Bila, D., Ferreira Jr., O.C., Tanuri, A., Jani, I.V., for the HTLV in Mozambique Study Group, 2011. Genetic characterization of human T-cell lymphotropic virus type 1 in Mozambique: transcontinental lineages drive the HTLV-1 endemic. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e1038.
- Wolfe, N.D., Heneine, W., Carr, J.K., Garcia, A.D., Shanmugam, V., Tamoufe, U., Torimiro, J.N., Prosser, A.T., LeBreton, M., Mpoudi-Ngole, E., McCutchan, F.E., Birx, D.L., Folks, T.M., Burke, D.S., Switzer, W.M., 2005. Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 7994–7999.
- Yamashita, M., Picchio, G., Veronesi, R., Ohkura, S., Bare, P., Hayami, M., 1998. HTLV-1s in Argentina are phylogenetically similar to those of other South American countries, but different from HTLV-1s in Africa. *J. Med. Virol.* 55, 152–160.
- Yoshida, M., Miyoshi, I., Hinuma, Y., 1982. Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 2031–2035.
- Zehender, G., Ebranati, E., De Maddalena, C., Gianelli, E., Riva, A., Rusconi, S., Massetto, B., Rankin, F., Acurie, M., Galli, M., 2008. Description of a “trans-Saharan” strain of human T-lymphotropic virus type 1 in West Africa. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 47, 269–273.

4.2 CAPITULO II

Manuscrito em preparação:

Phylogenetic characterization of HTLV-1aA isolates from Salvador, Bahia, Brazil.

Adjile Edjide Roukiyath Amoussa, Marta Giovanetti, Paloma Viana, Fernanda Khouri Barreto, Vagner Fonseca, Thessika Hialla Almeida Araújo, Bernado Galvão Castro Filho, Antonio Filho Andrade, Luiz Carlos Junior Alcantara.

O referido manuscrito esta no formato de *Sequences notes* para ser submetido na revista *AIDS Research and Human Retroviruses*.

Title Page**Phylogenetic characterization of HTLV-1aA isolates from Salvador, Bahia, Brazil**

Adjile Edjide Roukiyath Amoussa¹, Marta Giovanetti¹, Paloma Viana¹, Fernanda Khouri Barreto¹, Vagner Fonseca¹, Thessika Hialla Almeida Araújo², Bernado Galvão Castro Filho², Antonio Andrade Filho³, Luiz Carlos Junior Alcantara^{1*}.

¹ Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia, 40296-710, Brazil.

² Bahia School of Medicine and Public Health/Bahia Foundation for Development of Science, Salvador, Bahia, Brazil.

³ Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, Brazil.

* Corresponding author:

Luiz Carlos Junior Alcantara, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia, Brazil, lalcan@bahia.fiocruz.br, +55(71)3176-2255.

Running title: HTLV-1aA isolates from Salvador

Conflicts of Interest and Source of Funding:

The authors declare no conflict of interest.

This work was supported by the Brazilian Research Council (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- CNPq).

Word count:

Abstract: 89 words

Main text: 845 words

Abstract

The 5' LTR region sequences of HTLV-1 infected individuals from Salvador, Bahia-Brazil were submitted to molecular characterization by nested-PCR, followed by Sanger sequencing. Phylogenetic analysis of the LTR region demonstrated that all analyzed samples belong to the transcontinental subgroup of the HTLV-1 Cosmopolitan subtype. Moreover, molecular clock analysis using the BEAST package indicated a post-Columbian date of HTLV-1 introduction in Brazil. These findings provide further support of previous reports suggesting that the majority of HTLV-1 strains circulating in Brazil belong to the transcontinental subgroup of the HTLV-1 Cosmopolitan subtype.

Keywords: HTLV-1aA, LTR, Phylogenetic analysis.

Text:

To date, four types of Human T-cell Leukemia Virus (HTLV) have been described. HTLV-1 has been associated with many diseases, including adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL) and HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). In the case of HTLV-2, while not consistently associated with human disease, neurological disorders similar to HAM/TSP have been observed in HTLV-2-infected-patients [1]. HTLV-3 and HTLV-4, which were discovered in 2005, have not been associated with disease in humans [2]. Approximately 10 million people are infected with HTLV-1 throughout the world, with endemic regions in areas such as Japan, the Caribbean Basin, parts of West Africa, Melanesia, South America and the Middle East [3; 4]. Similarly to other retroviruses, HTLV-1 contains a diploid RNA genome comprised of 9,032 nucleotides that is reverse-transcribed into double-stranded DNA, which integrates into the host genome as a provirus. This genome contains *gag*, *pol* and *env* genes flanked by long terminal repeat (LTR) sequences at both the 5' and 3' ends. The *pX* region, which is not found in other retroviruses, is located between *env* and the 3' LTR [5]. In accordance with variability in the LTR region, seven subtypes (a-g) of HTLV-1 have been described. The most widespread subtype is further divided into five subgroups: Transcontinental (A), Japanese (B), West African/Caribbean (C), North African (D) and Black Peruvian (E). The cosmopolitan subtype of the transcontinental subgroup (aA) has been isolated throughout Latin America and represents the most prevalent subtype in Brazil, particularly present among individuals who originate from endemic regions [6]. The present study describes the molecular characterization of 16 new HTLV-1 isolates obtained from patients in Salvador, Bahia, as well as estimates the date of introduction of these new isolates into Brazil.

Six of the included patients were recruited from the Neurology and Neurosurgery Clinic of the Brain Institute of Salvador, located in the capital of the state of Bahia, between September 2014 and April 2015 while 10 additional HTLV-1 positive samples were obtained from a previous study. The study which was approved by the Ethics Committee of Institute Gonçalo Moniz of Fiocruz/Bahia under the protocol 377/2012. All patients were informed with respect to sample collection and analysis procedures and provided a term of written consent prior to participation.

DNA was extracted from Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) using a QIAamp DNA extraction kit (Quiagen). Nested PCR was performed to amplify the 5'LTR region of HTLV-1 using two different specific primer pairs. PCR products were analyzed on 1% agarose gel with ethidium bromide and visualized under ultraviolet light, followed by purification using a QIAquick PCR kit (QIAquick Gel Extraction Kit, Hilden, Düsseldorf, Germany) in accordance with manufacturer instructions. Purified PCR products were sequenced on an ABI3500xl automated sequencer using a Taq FS Dye terminator cycle sequencing kit (APPLIED BIOSYSTEMS). The generated sequences were analyzed using Geneious Sequencing Analysis software, version 9.0.4, to construct consensus sequences. For subtyping, sequences were analyzed via the HTLV1&2 Typing Tool, freely available at the following site: <http://bioafrica.net/software.php> [7].

For phylogenetic analysis, all 16 new sequences were aligned using reference sequences from other HTLV-1 subtypes downloaded from *GENBANK* using *BioEdit* software. The software TreePuzzle was used to control the presence of phylogenetic signal in our dataset. A Maximum Likelihood (ML) Tree was constructed using *PhyML* 3.0 online software [8], employing the GTR nucleotide substitution model with an estimated nucleotide substitution rate and gamma shape parameter. The reliability of the ML tree

was assessed by analyzing 1,000 bootstrap replicates, with *FigTree* software used for visualization.

The new LTR sequences and the other HTLV-1aA sequences obtained from the HTLV-1 database (<http://htlv1db.bahia.fiocruz.br>) were aligned using *BioEdit* software. The *BEAST* version 1.8.4 program was used to determine the Time of the Most Recent Common Ancestor (TMRCA) of the newly sequenced strains isolated in Salvador, Bahia-Brazil. For *Beast* analysis, a Markov Chain Monte Carlo (MCMC) approach was executed using the TN93 + Gamma model, a strict molecular clock with a constant population size [9]. Run parameters were analyzed under fixed mutation rates (2.10^{-5} mutations/site/year) [10] and MCMC chain analysis was conducted considering one billion generations, with sampling performed every 100,000 steps. Convergence of the runs was assessed based on the effective sample size (EES) after a 10% burn-in using the Tracer v 1.6 software application. Following the discarding of the first 10% of samples from the posterior distribution, the time of introduction was estimated using 95% Highest Posterior Density (HPD). The phylogenetic tree was examined using *FigTree* software, and was manually edited to improve interpretation and visualization.

This study included a total of 16 new sequences, with the resulting phylogenetic tree indicated that all sequences grouped into a clade of isolates belonging to the cosmopolitan subtype and transcontinental subgroup, with a bootstrap value above 70% (Figure 1A). Subtyping analysis revealed that all sequences were classified as HTLV-1aA (cosmopolitan subtype, transcontinental subgroup) with a 100% confidence level, which confirmed the phylogenetic analysis.

The TMRCA analysis of the newly characterized circulating strains from Salvador obtained in the study showed multiple introductions of the virus in Brazil (Figure 1B), confirms the previous analyses. In addition our study provide support for the post-

Columbian introduction of HTLV-1 in Brazil suggesting an ancient introduction of HTLV-1a-A related to the slave trade between the XVI and late XIX centuries.

In summary, we report the results of phylogenetic analysis, indicating a closer relation between newly sequences obtained in this study with Latin American and South African sequences compared to West African HTLV-1 strains, confirming the previously study. Futhermore, our results are highly support an African introduction of HTLV-1 isolates in Brazil mainly a during post-Columbian periode.

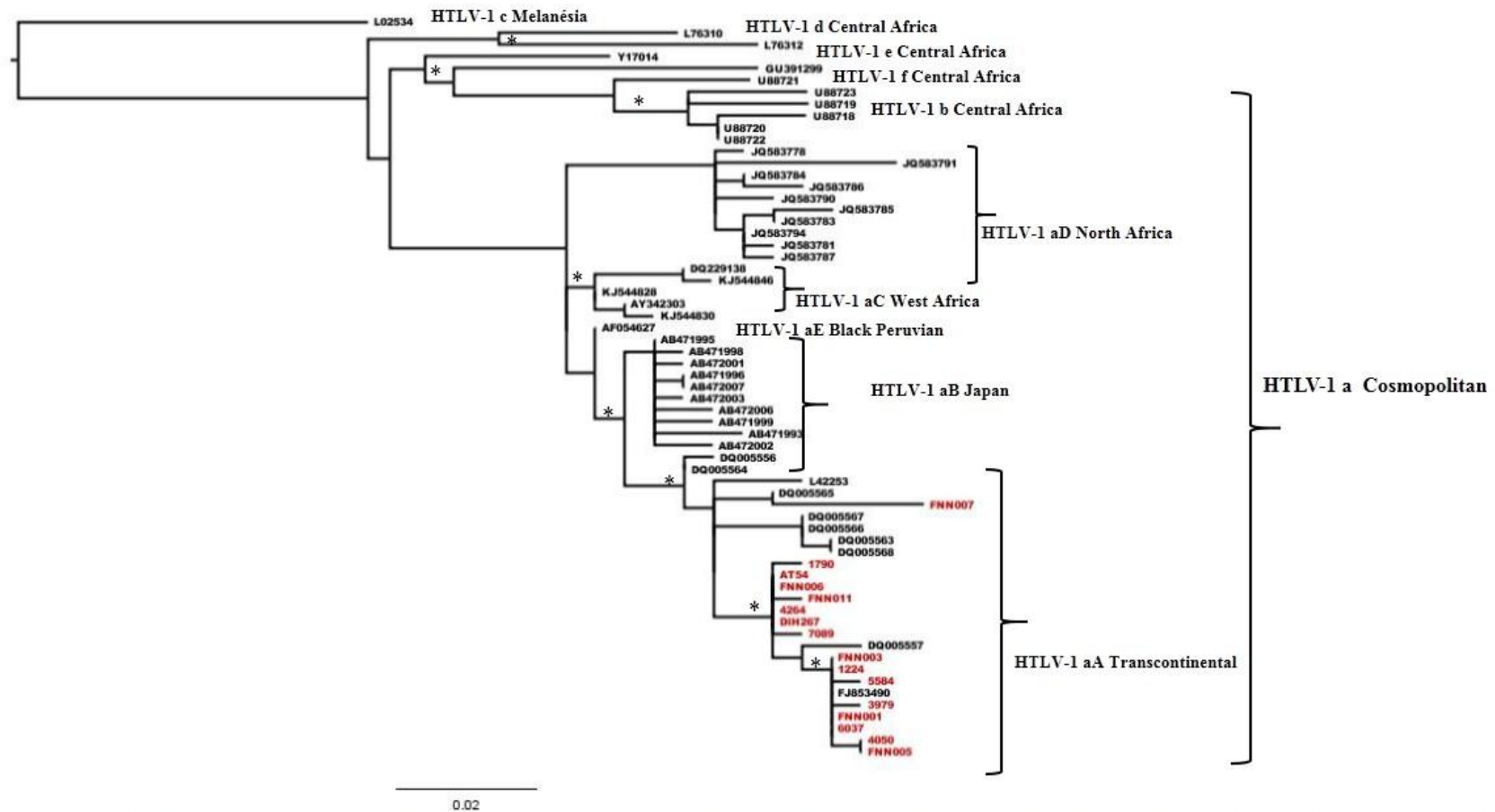


Figure 1: A) ML tree of HTLV-1 strains based upon a 463-bp fragment of the LTR region. The new sequences are marked in red.

Support value (> 0.7) for branches are marked by asterisk.

Acknowledgments

We are grateful to the subjects of this study for allow the access to the medical data.

This study was supported by grant from the Brazilian Research Council (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- CNPq-140152/2014-8).

Sequences Data

Accession numbers: the GenBank accession numbers of the new HTLV-1 fragments included in our phylogenetic study were as follows:

FNN001, MG734677; FNN003, MG734678; FNN005, MG734679; FNN006, MG734680; FNN007, MG734681; FNN011, MG734682; AT54, MG734683; 1224, MG734684; 5584, MG734685; 4050, MG734686; 3979, MG734687; DIH267, MG734688; 6037, MG734689; 7089, MG734690; 4264, MG734691; 1790, MG734692.

The other HTLV-1 strains were:

1- The references sequences for the phylogenetic tree:

pyg19, L76310; H23, L76312; KUW-1, L42253; mel5, L02534; CMR744, U88718; CMR786, U88719; CMR952, U88720; CMR961, U88721; CMR977, U88722; CMR996, U88723; Efe1, Y17014; RK14, AF054627; PH906, AY342303; HTLV01, DQ005556; HTLV04, DQ005557; HTLV18, DQ005563; HTLV20, DQ005564; HTLV24, DQ005565; HTLV25, DQ005566; HTLV30, DQ005567; HTLV33, DQ005568; JA10068, DQ229138; 04viii08-03, AB471993; 07viii08-03, AB471995; 07viii08-04, AB471996; 08viii08-02, AB471998; 08viii08-03, AB471999; 14viii08-02, AB472001; 14viii08-03, AB472002; 14viii08-04, AB472003; 14viii08-07, AB472006; 14viii08-01, AB472007; FS105, FJ853490; Cam1806LE, GU391299; Caio4046, JQ583778; Caio4118, JQ583781; Caio4328, JQ583783; Caio4383, JQ583784; Caio4417, JQ583785; Caio5006, JQ583786; Caio5187, JQ583787; Caio6590, JQ583790; Caio6622, JQ583791; Caio7580, JQ583794; PH52, KJ544828; PH833, KJ544830; HHZ, KJ544846.

2- The references sequences for the Beast analysis:

KUW-2, L42255; KUW-3, L42225; KUW-1, L42253; HTLV01, DQ005556; HTLV04, DQ005557; HTLV06, DQ005558; HTLV07, DQ005559; HTLV8, DQ005560; HTLV9, DQ005561; HTLV15, DQ005562; HTLV18, DQ005563; HTLV20, DQ005564; HTLV24, DQ005565; HTLV25, DQ005566; HTLV30, DQ005567; HTLV33, DQ005568; 04viii08-01, AB471992; 04viii08-07, AB471994; 08viii08-01, AB471997; 14viii08-06, AB472005; 16viii08-02, AB472008; ES-P7, GU126475; ES-P4a, GU126476; ES-P8, GU1264

78;ES-P4b, GU126479;ES-P10, GU126480;ES-P3, GU126481;ES-P2, GU126483;101, GU181409;103, GU181411;104, GU181412;105, GU181413;106, GU181414;107, GU181415;108, GU181416;109, GU181417;110, GU181418 ;FS67, GU225731;FS157, GU225732;BRSP30-10, JX280947;BRSP37-10, JX280948;BRSP38-10, JX280949;BRSP7-10, JX280950;BRSP93-10, JX280951;BRSP97-10, JX280952;BRSP101-10, JX280953;BRSP105-10, JX280954;BRSP118-10, JX280955;BRSP171-10, JX280956;BRSP40-11, JX280957;BRSP142-11, JX280958;BRSP194-11, JX280959;BRSP69-12, JX280960;1, KC493378;2, KC493379;4, KC493381;15, KC493385;16, KC493386;17, KC493387;18, KC493388;19, KC493389;20, KC493390;21, KC493391;25, KC493392;26, KC493393;28, KC493394;30, KC493395;31, KC493396;32, KC493397;36, KC493398;37, KC493399;38, KC493400;39, KC493401;40, KC493402.

Address reprint requests to:

Luiz Carlos Junior Alcantara, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia, Brazil, lalcan@bahia.fiocruz.br, +55(71)3176-2255.

References

- 1- Araujo A and Hall, WW: Human T-lymphotropic virus type II and neurological disease. *Ann. Neurol* 2004; 56:10-19.
- 2- Wolfe ND, Heneine W, Carr JK, Garcia AD, et al.: Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. *Proc. Natl. Acad. Sci* 2005; 102:7994–7999.
- 3- Proietti FA, Carneiro-Proietti ABF, Catalan-Soares BC, et al.: Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene* 2005; 24: 6058–6068.
- 4- Gessain A and Cassar, O: Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. *Front. Microbiol* 2012; 3: 388.
- 5- Pessôa R, Watanabe JT, Nukui Y, et al.; Molecular characterization of human T-cell lymphotropic virus type 1 full and partial genomes by Illumina massively parallel sequencing technology. *PloS One* 2014; 9: e93374.
- 6- Carneiro-Proietti ABF, Catalan-Soares BC, Castro-Costa CM, et al.: HTLV in the Americas: challenges and perspectives. *Rev. Panam. Salud Pública Pan Am. J. Public Health* 2006; 19: 44–53.
- 7- Fonseca VS, Freire M, Restovic MI, et al.: HTLV 1e 2 Typing Tool. 2015; Available at <http://bioafrica.net/software.php>.
- 8- Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, et al.; New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol* 2010; 59: 307–321.

- 9- Drummond AJ and Rambaut, A: BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol. Biol* 2007; 7: 214.
- 10- Alcantara LCJ, de Oliveira T, Gordon M, et al.: Tracing the origin of Brazilian HTLV-1 as determined by analysis of host and viral genes. *AIDS* 2006; 20: 780-782.

4.3 CAPITULO III

Manuscrito em submissão

First detection of human T-lymphotropic virus in blood donors in Benin shows that testing is required to improve blood safety.

Adjile Edjide Roukiyath Amoussa, Simone Kashima, Didier Djobessi, Fernanda Khouri Barreto, Denise Davou, Andre Bigot, Ludovic Anani, Marta Giovanetti, Jose Lourenço, Ester Sabino, Mohamed Cherif Rahimy, Luiz Carlos Junior Alcantara.

O referido manuscrito foi submetido para publicação na revista *ISBT science series*.

First detection of human T-lymphotropic virus in blood donors in Benin shows that testing is required to improve blood safety.

Adjile Edjide Roukiyath Amoussa ¹, Simone Kashima ², Didier Djobessi ³, Fernanda Khouri Barreto ¹, Denise Davou ⁴, Andre Bigot ³, Ludovic Anani ⁴, Marta Giovanetti ¹, Jose Lourenço ⁵, Ester Sabino ⁶, Mohamed Cherif Rahimy^{7,*}, Luiz Carlos Junior Alcantara ^{1,*}.

¹ Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia, 40296-710, Brasil;

² Hemocentro de Ribeirão Preto, 14706-045, Brasil;

³ Service d'Immunologie Banque de sang, Cotonou, 01 BP 386, Benin;

⁴ Agence Nationale pour la Transfusion Sanguine, Cotonou, 01 BP 386, Benin;

⁵ Universit of Oxford, UK;

⁶ University of São Paulo;

⁷ Centre de Prise en Charge Médicale Intégrée du Nourrisson et de la Femme Enceinte atteints de Drépanocytose, Cotonou, 01 BP 386, Benin.

Address for correspondence:

*Luiz Carlos Junior Alcantara, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, Bahia, Brazil, lalcan@bahia.fiocruz.br, +55(71)3176-2255.

*Mohamed Cherif Rahimy, Centre de Prise en Charge Médicale Intégrée du Nourrisson et de la Femme Enceinte atteints de Drépanocytose, mrahimy@bj.refer.org, +229 21 30 72 42.

Running title: Detection of HTLV in Blood donors in Benin.

Abstract:

INTRODUCTION: Human T-lymphotropic virus (HTLV) is a blood borne infection that can be transmitted via blood transfusion. Knowing that blood safety can improve blood transfusion to prevent dissemination of viral infection for lifesaving in medical facilities, there is no routine pre-transfusion screening for HTLV in all blood banks centres in Republic of Benin. Then, the study aims to estimate the prevalence of HTLV infection in blood donors and describing the characteristics of positive donors.

METHODS: HTLV prevalence study was carried out by screening 2,035 samples by an enzyme-linked immunoassay obtained from six blood banks located throughout the Republic of Benin.

RESULTS AND DISCUSSION: 12 subjects, all volunteer blood donors, were found with positive sorology, representing an overall seroprevalence of 0,59% and 7 was indeterminate for anti-HTLV-1/2 antibody. This are the first cases of HTLV among blood donors in Benin Republic, whose bloods are already transfused to recipients. This result emphasizes that HTLV needs to be considered a Public Health issue in Republic of Benin.

CONCLUSION: This study report positive result of HTLV infection among blood donors in the blood banks of Benin Republic in West Africa and highlights the inclusion of screening tests and strategies to reduce its transmission.

Keys Words: HTLV; HTLV prevalence; Blood donors; HTLV testing.

Text:

INTRODUCTION:

Although four types of human T-cell lymphotropic virus (HTLV) have been described, only HTLV type 1 has been associated with a wide spectrum of disease, including the lymphoproliferation of CD4-activated cells, known as adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL), a chronic myelopathy called tropical spastic paraparesis/HTLV-1-associated myelopathy (TSP/HAM), in addition to other inflammatory diseases [1,2,3,4]. Epidemiological data estimate that approximately 5-10 million people are infected with HTLV-1 worldwide, mainly concentrated in areas of high endemicity, such as Sub-Saharan Africa, Europe, Southeast Asia, Japan, the Caribbean, and in both the American continents [5].

Sub-Saharan Africa is considered to be one of the largest areas of endemicity for HTLV-1 infection, comprising an estimated 2-4 million infected individuals [6]. However, most of the early sero-epidemiological studies of HTLV-1/2 infection performed in Benin, a country situated in West Africa shown the prevalence of 1,5%, 1,86% and no positive individuals for antibody to HTLV-1 respectively among the general population of Benin, the Department of Atacora in north-western Benin and the blood donors [7,8]. Despite previous data indicate the presence of HTLV-1 in the general population of Benin, HTLV-1 antibody screening is not routinely done at the *Agence Nationale pour la Transfusion Sanguine* (ANTS) of Benin Republic. Moreover knowing that HTLV and HIV shared important homologous aspects of transmission including sexual contact, breast-feeding and blood transfusion, HTLV still remains a relatively hidden public health problem in some part of Africa continent largely due to the lack of the knowledge about this retrovirus.

Blood is an essential transporter for oxygen, nutrients and other substances throughout human tissues. Blood donation could be lifesaving for individuals who have lost blood during accident, surgery, severe low platelet count, and severe anaemia observed with infectious diseases such as malaria and HIV infection. Therefore screening blood donors for blood-borne infection may help maximize safety of blood donation for the donor and the recipient [9]. While screening of blood donors is therefore crucial to prevent dissemination of the virus in medical facilities [10], few studies have been conducted on HTLV-1 related to blood safety, in order to indicate the risk of HTLV transmission by blood products and to improve blood safety in Benin.

The *Agence Nationale pour la Transfusion Sanguine* (ANTS) of Benin Republic currently selects nonpaid, voluntary blood donors on the basis of a health check questionnaire and examination performed by a physician. All donated samples are then tested for blood-borne infection, such as human immunodeficiency virus (HIV), hepatitis B and C (HBV, HCV) and syphilis according to WHO recommendations at each branch of ANTS. Presently at the Benin Republic ANTS, there is no routine pre-transfusion screening for HTLV, knowing that HTLV is also a blood-borne infection transmissible in a similar manner to all other viruses which are actually tested in Benin Blood banks.

Given the major challenge of the Ministry of Health in Benin is the provision of high quality blood products that meet World Health Organization (WHO) standards to ensure blood safety, the present study was designed to estimate the prevalence of HTLV infection in blood donors and describing the characteristics of positive donors to fulfil complex goals of Benin blood banks, such as providing blood products to reduce the mortality of endemic diseases such as severe malarial anaemia, in a safe and effective manner.

METHODS:

Study design and population

A cross-sectional descriptive study was conducted using samples from volunteer blood donors who donated blood between July and December 2015. The samples were collected at the six provincial branches of the *Agence Nationale pour la Transfusion Sanguine* (ANTS) of Benin Republic: Atacora / Donga (AD), Atlantique / Littoral (AL), Borgou / Alibori (BA), Mono / Couffo (MC), Ouémé / Plateau (OP) or Zou / Colline (ZC). All included participants were volunteer blood donors older than 18 years old who donated blood during the study period.

This study received approval from the Faculty of Science and Health (Benin University) and informed written consent was obtained from each subject. The subjects were interviewed to obtain sociodemographic information.

Sample size and collection procedures

The sample size required was determined using the Schwartz formula: $N_1 = \varepsilon^2 pq / i^2$, in which N_1 represents the minimum sample size required; ε is the standard normal deviation at a 95% confidence interval corresponding to 1,96; p is the assumed true population prevalence of HTLV infections in Benin in 1989; q is the probability of not having HTLV; i is the absolute error between the estimated and true population prevalence, considering the following values: $p = 0.015$ (HTLV prevalence in Benin in 1989), $q = 1 - p = 0,985$ and $i = 1\%$ (precision), $N_1 = 568$.

Serologic Testing

The blood samples collected on a EDTA tube in the same moment of the donation blood collection, were separated into plasma and peripheral blood leukocytes (PBLs). The plasma samples were initially screened by an enzyme-linked immunoassay (ELISA) to detect

antibodies to HTLV-1/2 using a Murex HTLV 1/2 diagnostic assay at a specificity of 99.5% (Murex Diagnostics, DiaSorin, Dartford, UK) in accordance with manufacturer instructions. Initially reactive samples were confirmed by repeat testing using the same ELISA and only repeat reactive samples were considered positive.

Data Analysis

Data were collected and transferred to a spreadsheet using Microsoft Excel 2013 for analysis using Epi Info™ 7 statistical software. Fisher's exact test was used to compare the proportions of donors presenting risk factors associated with HTLV using a level of significance of $P \leq 0.05$.

RESULTS:

A total number of 2035 blood donors equal or older than 18 years were included in our study. The average donor age was 26 years (range: from 18 to 65 years), with 75% of donors aged <34 years. Most study participants were male 1675 (82.3%) and have between 18 to 26 years of age.

Table 1 delineates the number of blood samples obtained from each geographic location, as well as ELISA results. We identified a total of 12 HTLV reactive results, providing an overall prevalence of 0.59% (95% confidence interval (CI) 0.259% to 0.919%), and seven others subjects were considered borderline (DO/CO $1 << 1.23$). Considering the gender, among the male subjects, 9 (75%) were found to be reactive to HTLV antigens and 3 (25%) female were reactive to HTLV. The high prevalence is concentrated among the blood donors aged from 18-26 years and 27-34 years (41.67%) and this prevalence decrease with age 16.67% (35-45 years). According to occupation our result show that 5 of 861 students (0.58%) were positive compared to 3/579 non-medical staff (0.52%), and 9 of 1369 singles blood donors were positive.

It is also important to highlight that at least one individual tested HTLV reactive at each provincial blood bank and regarding participant occupation, students presented the highest percentage of reactivity (41.67%) (Table 2).

Screening for blood-borne infectious, such as human immunodeficiency virus (HIV), Hepatitis B and C (HBV, HCV) and syphilis, was previously performed according to WHO recommendations at each branch of the *Agence Nationale pour la Transfusion Sanguine* (ANTS). No blood donors with positive serology for the other viral markers evaluated (HBS, HCV, HIV, TPHA) presented reactivity in HTLV screening (Table 2).

No significant differences were observed when Fisher's exact test was used to compare the proportions of donors presenting risk factors considering history of transfusion, breastfeeding with duration longer than 6 months and partner number associated with HTLV reactive individuals ($p=1.00;0.099;0.70$ respectively).

Finally, our findings revealed the alarming information that reactive HTLV bloods donations had already been transfused to some recipients because of the lack of HTLV screening for blood donors in the same blood banks.

DISCUSSION:

Our study is the first cross-sectional study which explores the seroprevalence rates of HTLV and found reactivities samples among blood donors. The study included a panel of high number of male blood donors confirming the effective participation of men in blood donation schedules and the fact that potential blood donors are predominantly male [11]. It may be a consequence of the low number of female blood donors evaluated in our study. The prevalence of infection among men is high compared to women. This is not consistent with other previous studies indicating a higher infection rate among women, which increases with age [12,13]. In our study the seroprevalence rate found among blood donors, was low

compared to the prevalence among the general population of Benin who was 1,5% in the six provinces of the country and 1,86% was reported in the Department of Atacora in north-western Benin [7,8]. Our study is the first to report reactive sample in ELISA among blood donors in Benin, since a national survey conducted in Benin between 1988 and 1989 (including over 1,300 donations) indicated no positive blood donors for the HTLV-1 antibody when the blood donors were screened by immunofluorescence and enzyme immunoassay and reactive sample were further confirmed by Western blot and RIPA [7]. Therefore comparison with others studies among blood donors in Benin country should be difficult. The difference of seroprevalence rate observed in this study and the study among the general populations of Benin, can be do to the number of blood sample very close or equal tested in our study compared to the previous study. Otherwise due to some limitations of method employed in our study, the lack of confirmatory tests because of the difficulty to recruit the presumed positive blood donors and have access to the sample for confirmatory tests.

Our study showed a heterogeneous presence of blood donors reactive to the ELISA test in all provinces of Benin, which was also the case with the study conducted in the general population of Benin [7]. These observations highlighted the importance of adding HTLV-1/2 screening in Benin blood banks to prevent the transfusion of contaminated blood with HTLV infection to recipients. The seroprevalence found in our study is relatively high in comparison to a study conducted among blood donors in nearby West African countries like Senegal, with a prevalence of 0.16%, but low in comparison to studies carried out in Nigeria and Mali that reported a seroprevalence of 3.2% and 1,4% respectively [6, 14,15].

These preliminary data showing that there are individuals considered as HTLV reactive for anti-HTLV-1/2 antibody assessed using ELISA in Benin. Considering the current process of blood born infection screening applied in Benin doesn't include HTLV screening our result confirms the need to include HTLV screening procedures for blood transfusion

safety, similarly to what currently exists for HIV in Africa. In low-resource countries, such as Benin, in the absence of confirmatory test screening procedures, we propose that ELISA may be used, enabling any reactive samples to be exempted from availability for blood transfusion.

Blood-borne pathogens, such as bacteria and viruses, are present in blood and body fluids and can cause disease in humans. Safety of the blood supply from pathogens involves a multifaceted approach including screened blood units for transfusion transmissible infections. The surveillance of blood safety can reduce unnecessary transfusions, prevent transmission of blood-borne pathogens like HTLV through unsafe blood, and make safe blood available in management of complicated pregnancies, severe anaemia, malaria, AIDS patients on ART, accidents and trauma, cancer treatment and haematological conditions. Furthermore surveillance of blood transfusion for blood safety can reduce morbidity and mortality, following standard precautions to help prevent the spread of bloodborne pathogens and other diseases. These precautions require that all blood and other body fluids be treated as if they are infectious.

Finally, our findings revealed the alarming information that reactive HTLV bloods donations had already been transfused to some recipients because of the lack of HTLV screening for blood donors in the same blood banks. Screening of these recipients is in progress for serological and molecular confirmatory testing to verify the risk of seroconversion after receiving infected HTLV blood. We believe that the findings presented herein should demonstrate to public health policymakers of Benin Republic that is important to improve blood safety by adding HTLV screening for blood donation in Benin in order to monitor the dissemination of the infection for public health surveillance. Further studies are needed to determine the type of HTLV present among the reactive blood donors and conduct follow-up on the positively identified blood donors to monitor the progression of infection.

Table 1. Positive cases of HTLV among blood donors in six blood banks provinces of Benin.

Regions	No.	ELISA + (%)	IC 95%	Borderline (%)
Atacora-Donga	179	3 (1.68)	(0.0018, 0.0316) p<0.05	2 (1.12)
Borgou-Alibori	481	1 (0.21)	(-0.0020, 0.0060) p<0.05	0
Zou-Coline	400	3 (0.75)	(-0.0009, 0.0159) p<0.05	1 (0.25)
Total (North & Central)	1060	7 (0.66%)	(-0.0741, 0.0871) p<0.05	3 (0.29%)
Atlantique-Littoral	440	2 (0.45)	(-0.0017, 0.0107) p<0.05	4 (0.91)
Mono-Couffo	263	2 (0.76)	(-0.0028, 0.0180) p<0.05	0
Ouémé-Plateau	272	1 (0.37)	(-0.0035, 0.0107) p<0.05	0
Total (South & Southeast)	975	5 (0.52%)	(-0.0661, 0.0763) p<0.05	4 (0.41%)

Acknowledgements

We are grateful to the subjects of this study for allow the access to the medical data.

This work was partly supported by grant from Brazilian Research councils: (CNPq-140152/2014-8; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. This is my PhD fellowship grant which is the result of collaboration between Brazil and Africa), (FAPESP-2013/08135-2; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), (FINEP-1387/10; Financiadora de Estudo e Projetos), and the *Centre de Prise en Charge Médicale Intégrée du Nourrisson et de la Femme Enceinte atteints de Drépanocytose* (CPMI-NFED) and *Agence National de Transfusion Sanguine* (ANTS) in Benin Republic.

All authors read and approved the final manuscript.

The authors declare no conflict of interest.

Author Contributions

Conception and design: A.E.R.A.; M.C.R.; S.K.; L.A.; L.C.J.A.; Samples and data collection: A.B.; D.D., D.D., L.A.; Performed the experiments: D.D.; A.B.; Analyzed the data: A.E.R.A.; M.G.; L.C.J.A. Writing: A.E.R.A.; E. S.; F.K.B.; J.L.; M.C.R.; L.C.J.A.

References

- 1- Poiesz B J, Ruscetti F W, Gazdar A F, et al.: Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77:7415–7419.
- 2- Kalyanaraman V S, Sarngadharan M G, Robert-Guroff M, et al.: A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science* 1982; 218: 571–573.
- 3- Calattini S, Chevalier S A, Duprez R, et al.: Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. *Retrovirology* 2005; 9:30.
- 4- Wolfe N D, Heneine W, Carr J K, et al.: Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102:7994-7999.
- 5- Gessain A, Cassar O: Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. *Front Microbiol* 2012; 3:388.
- 6- Gonçalves DU, Proietti FA, Ribas JGR, et al.: Epidemiology, treatment, and prevention of human T-cell leukemia virus type 1-associated diseases. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23:577–89.
- 7- Dumas M, Houinato D, Verdier M, et al.: Seroepidemiology of human T-cell lymphotropic virus type I/II in Benin (West Africa). *AIDS Res Hum Retroviruses* 1991; 7: 447–451.
- 8- Diop S, Calattini S, Abah-Dakou J, et al.: Seroprevalence and molecular epidemiology of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 in blood donors from Dakar, Senegal. *Journal of clinical microbiology* 2006; 44: 1550-1554.

- 9- Yuguda S, Manga MM, Fowotade A, et al.: Seroprevalence of Human T-Cell Lymphoma/Leukemia Virus Type-1 (HTLV-1) Antibodies among Blood Donors at Ibadan, Nigeria. *J Hum Virol Retrovirol* 2017; 5: 3-5.
- 10- Diarra AB, Kouriba B, Guindo A, et al.: Prevalence of HTLV-I virus in blood donors and transfusion in Mali: Implications for blood safety. *Transfusion clinique et biologique* 2014; 21: 139-142.

5 DISCUSSÃO

A partir das análises realizados neste estudo, foi possível investigar sobre a data de introdução do HTLV-1aA em Salvador, Bahia, Brasil usando as sequências LTR previamente publicados.

As análises filogenéticas mostraram que há um agrupamento monofilético entre os isolados da América latina com os do sul da África do que os isolados do oeste da África, como já foi descrito em vários estudos anteriores (ALCANTARA et al., 2006; MOTA et al., 2007; REGO et al., 2008; MAGALHÃES et al., 2008; ALELUIA et al., 2015). Portanto, estes resultados de não observação de agrupamento monofilético entre os isolados da região oeste da África com os do Brasil, estão em contradição com os dados históricos que sugerem que a maioria dos africanos trazidos no Brasil são originados da região oeste da África (CURTIN, 1969), uma vez que o subtipo do oeste da África não foi ainda encontrado na população brasileira. Isso poderia ser explicado pelo fato de que talvez os africanos da região oeste da África foram trazidos no Caribe ou na Guiana Francesa, onde já foi descrito o subgrupo C da África Ocidental, mas não no Brasil (CARNEIRO-PROIETTI et al., 2006). A reconstrução filogeográfica das datas de introdução do HTLV-1aA de cada um dos clusters observados na topologia filogenética mostraram uma introdução aproximadamente no ano 1500, que é praticamente o período durante o qual ocorreu a migração da população africana no Brasil. As análises de relógio molecular realizados neste estudo possibilitaram a associar o resultado da datação molecular ao evento histórico de migração da população africana relativo ao processo de povoação do Brasil.

As sequências LTR originados da Moçambique, Europa e America Latina utilizados neste estudo se agruparam dentro do subgrupo Transcontinental em três diferentes grupos monofiléticos com valor de confiabilidade maior que 70% sugerindo também múltiplas introduções do HTLV-1aA no Brasil. Esse agrupamento das sequências dentro do subgrupo Transcontinental mostra um padrão de agrupamento monofilético consistente com os estudos anteriores e a maioria destas sequências originados do Brasil que se agruparam dentro do subgrupo Transcontinental são sequências isolados em Salvador. Considerando o fato que a população brasileira é uma população miscigenada composta por grupos populacionais ancestrais originados de diferentes regiões do mundo como os europeus, africanos e os ameríndios, também que o subgrupo HTLV-1aA é encontrado em diferentes regiões do mundo, sugerimos que estas múltiplas introduções do HTLV-1aA no Brasil é o resultado de populações imigrantes originadas de diferentes regiões, principalmente da África e tendo

como Salvador a porta da entrada. Porque que Salvador é uma cidade que possui características sócio demográficas semelhantes a alguns países da África, além da população de Salvador possuir uma ancestralidade africana muito forte, estimado em torno de 80% de descendentes de africanos. Isso justifica pelo agrupamento das sequências do Brasil com sequências de Moçambique e Argentina no cluster 1, e agrupamento das sequências do Brasil, com as sequências da Espanha no cluster 3.

Em geral, nosso estudo confirmou que houve múltiplas introduções do HTLV-1aA no Brasil durante o período pós-colombiano, que é algo esperado e já foi sugerido por vários estudos anteriores (ALCANTARA et al., 2006; MOTA et al., 2007; REGO et al., 2008; MAGALHÃES et al., 2008; ALELUIA et al., 2015). Dessa forma nosso resultado está em conformação com algumas hipóteses emitidos na literatura sobre a origem do HTLV-1aA no Brasil (GALVÃO-CASTRO et al., 2010; PAIVA; CASSEB, 2015).

Também as análises filogenéticas mostram um agrupamento das sequências originados do Brasil e África do Sul dentro do mesmo cluster. Os haplótipos do gene β -globina são utilizados como marcadores de migrações populacionais em estudos antropológicos, a caracterização dos haplótipos na população infectada de Salvador sera necessário para esclarecer a origem da população do sul do continente africano no Brasil. Os estudos mostraram uma maior presença do haplótipo CAR na população infectada da África do Sul, sabendo que o haplotipo CAR é mais característico da África central foi sugerindo que o HTLV-1 poderia ter se originado da África Central e se disseminou para a África do Sul pela migração dos bantu speaker e depois para o Brasil durante o período pós-colombiano. Então foi sugerido que HTLV-1aA foi trazido para a cidade de Salvador, durante a migração da população Africana, principalmente do sul do continente Africano. Dessa forma a partir desses resultados, nosso estudo confirma a hipótese de que o HTLV-1aA foi introduzido pela primeira vez na África do Sul durante a migração da população Bantu da África Central para África do Sul ao longo dos últimos 3000 anos, e depois para o Brasil durante o tráfico de escravos entre os séculos XVI ao XIX. A presença do haplotipo CAR no sul da África, poderia ser o resultado das migrações interafricana da população Bantu da África Central para o sul do continente africano (ALCANTARA et al., 2006; GALVÃO-CASTRO et al., 2010; PAIVA; CASSEB, 2015).

Portanto devido a estimativa de grande participação dos africanos da região oeste da África no tráfico negreiro para o Brasil segundo os dados históricos, é necessário obter sequências de indivíduos infectados pelo HTLV-1 originado do Benim para realizar as

análises de filogenia e filogeografia. Dessa forma um estudo de soroprevalência do HTLV entre os doadores de sangue no Benim, foi realizado a partir da triagem com o teste de ELISA utilizando o kit Murex. Esta triagem revelou a presença da infecção pelo HTLV entre os doadores de sangue desta região sendo a prevalência de HTLV foi de 0,59%. Um estudo anterior realizado no Benim por Dumas et colaboradores não identificou o HTLV entre os doadores de sangue (DUMAS et al., 1991). O presente trabalho é então o primeiro que identificou o HTLV entre os doadores de sangue em Benim. Este resultado que mostra a presença de casos de HTLV entre os doadores de sangue do Benim, chama a atenção que o HTLV deveria ser considerado como um problema de saúde pública para o país. Nosso resultado revelou também que os sangues destes indivíduos já foram qualificados para doação considerando a técnica de triagem disponíveis atualmente no Benim e conseqüentemente já foram transfundidos a alguns pacientes. Sabendo-se que o HTLV e HIV são retrovírus que possuem semelhante modo de transmissão, dessa forma nosso resultado mostra a importância da triagem dos doadores para o HTLV-1/2. Acreditamos que os resultados de caso positivos para HTLV que foram apresentadas neste trabalho chama a atenção das políticas de saúde pública da República de Benim sobre a importância de melhorar a segurança do sangue, adicionando o rastreio de HTLV para a doação de sangue no Benim, afim de monitorar a disseminação da infecção para a vigilância da saúde pública.

A transfusão sanguínea é considerada uma forma mais eficiente da transmissão do vírus, portanto a instalação da triagem para o vírus de HTLV-1 nos doadores voluntários de sangue é de importância maior para rastreamento de doadores de sangue infectados, e limitar o risco de infecção através da transfusão de hemocomponentes contaminados. Em áreas onde o HTLV-1 é endêmico, a seroconversão foi observada em 15-60% dos casos de indivíduos que receberam sangue contaminado de células infectado com HTLV-1 (OKOCHI; SATO; HINUMA, 1984). O programa de triagem para o HTLV-1 em doadores voluntários de sangue já foi instalado em várias pais, isso demonstrou uma grande redução do risco de transmissão relacionada à transfusão por exemplo no Japão, Estados Unidos, Canadá, Caribe, França, Austrália, Dinamarca, Portugal, Grécia e certas ilhas das Índias Ocidentais. Também no Brasil em 1993, pela portaria n° 1376 do Ministério da saúde o teste de triagem para infecção por HTLV-1 foi instalado nos bancos de doação para os doadores voluntários (SATAKE; YAMAGUCHI; TADOKORO, 2012).

Apesar que a África Subsaariana seja considerada como uma das regiões que tem um grande número de indivíduos infectados pelo HTLV, existem ainda países em África onde a

triagem do vírus em doadores voluntários de sangue não é ainda uma realidade. Portanto, hoje em dia, um dos principais desafios desses pais Africanos é disponibilizar uma boa qualidade de produtos sanguíneos segundo as normas da Organização Mundial da Saúde (OMS), para garantir a segurança e qualidade da transfusão de sangue. Mas é importante ressaltar que alguns países da África como Nigéria, Mali, África do Sul já estão neste caminho para possibilitar a instalação da triagem por HTLV-1 em doadores voluntários de sangue afim de prevenir o risco de transmissão do HTLV por transfusão de sangue na África (TERRY et al., 2011; EK et al., 2015; DIARRA et al., 2014; PARUK; BHIGJEE, 2015).

O rastreio das infecções transmissíveis por transfusão pode reduzir o risco de transmissão a níveis muito baixos. Assim, os serviços de transfusão devem estabelecer sistemas eficientes para assegurar que todo o sangue doado fosse analisado corretamente para rastreio de infecções transmissíveis específicas e que só o sangue e componentes sanguíneos que não apresentem reação são enviados para utilização clínica.

A vigilância da segurança do sangue pode prevenir e reduzir a transmissão de patógenos nascidos no sangue como HTLV através de sangue inseguro e disponibilizar sangue seguro no manejo de gravidezes complicadas, anemia grave, malária, pacientes com AIDS usando ART, acidentes e trauma, tratamento contra câncer e condições hematológicas. Além disso, a vigilância da transfusão de sangue para a segurança do sangue pode reduzir a morbidade e a mortalidade, seguindo as precauções padrão para ajudar a prevenir a propagação dos patógenos transmitidos pelo sangue e outras doenças sempre que haja risco de exposição ao sangue ou a outros fluidos corporais. Essas precauções exigem que todo o sangue e outros fluidos corporais sejam tratados afim de reduzir o risco da disseminação das infecções transmissíveis pelo sangue principalmente o HTLV.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A partir desse trabalho foi possível estimar a data da introdução do HTLV-1aA no Brasil em torno do ano de 1500 usando as sequências LTR previamente publicados e oriundas de isolados provenientes de várias regiões geográficas do mundo.
- As análises filogenéticas realizadas neste estudo, confirmaram que houver múltiplas introduções do HTLV-1aA no Brasil durante o período pós-colombiano principalmente da África e tendo como Salvador a porta de entrada.
- As análises filogenéticas revelaram uma relação mais próximas das sequências de Salvador com as sequências provenientes da África do Sul e Moçambique.
- As análises filogenéticas mostraram a falta de agrupamento monofilético das sequências de Salvador com as sequências do oeste da África.
- A análise de caracterização molecular de 16 novas sequências oriundas de isolados de Salvador foram classificadas como pertencendo a subtipo cosmopolita subgrupo Transcontinental.
- Foi possível estimar uma soroprevalência de 0,59% (12/2035) para o HTLV em doadores de sangue na população do Benim.
- A partir do presente trabalho, posteriores estudos serão realizados para confirmar a infecção pelo HTLV nesses indivíduos e caracterizar o subtipo que está circulando na população do Benim. Após a subtipagem, as sequências de região genômica oriundas destes indivíduos serão utilizados para realização das análises filogenéticas e filogeográfica. Além disso, será feita a caracterização da distribuição dos haplótipos do gene da globina β nestes indivíduos infectados do Benim para investigar melhor a origem africana do HTLV-1 no Brasil. Também o acompanhamento dos doadores de sangue identificados positivamente será necessário não só para controlar a evolução da infecção nestes indivíduos, mas também para o monitoramento da disseminação da infecção nesta população.

REFERÊNCIAS

- ALCANTARA, L.C.J. et al. Globin haplotypes of human T-cell lymphotropic virus type I-infected individuals in Salvador, Bahia, Brazil, suggest a post Columbian African origin of this virus. **J. Acquir. Imm. Defic. Syndr.**, v. 33, n. 4, p. 536-542, 2003.
- ALCANTARA, L.C. et al. Tracing the origin of Brazilian HTLV-1 as determined by analysis of host and viral gene. **AIDS.**, v. 20, n. 5, p. 780-782, 2006.
- ALELUIA, M.M. et al. The origin of HTLV-1 in southern Bahia by phylogenetic, mtDNA and β -globin analysis. **Virol. Rep.**, v. 5, p. 63-74, 2015.
- ANDRADE, T.M.; DOURADO, I.; GALVÃO-CASTRO, B. Associations among HTLV-I, HTLV-II, and HIV in injecting drug users in Salvador, Brazil. **J. Acquir. Imm. Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.**, v. 1, n. 18, p. 186- 187, 1998.
- ANDRADE, R.G. et al. Evaluation of the use of real-time PCR for human T cell lymphotropic virus 1 and 2 as a confirmatory test in screening for blood donors. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 43, n. 2, p. 111-115, 2010.
- ANDONOV, A. et al. Insights into origins of Human T-cell Lymphotropic Virus Type 1 based on new strains from aboriginal people of Canada. **Infect. Genet. Evol.**, v. 12, n. 8, p. 1822-1830, 2012.
- ARAÚJO, T.H.A. et al. A public HTLV-1 molecular epidemiology database for sequence management and data mining. **PloS. One.**, v. 7, n. 9, p. 1-4, 2012.
- BALDAUF, S.L. Phylogeny for the faint of heart: a tutorial. **Trends.Genet.**, v. 19, n. 6, p. 345–351, 2003.
- BAGOSSI, P. et al. Discovery and significance of new human T-lymphotropic viruses: HTLV-3 and HTLV-4. **Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.**, v. 7, n. 10, p. 1235-1249, 2009.
- BARRETO, F.K. et al. A Fully Annotated Genome Sequence of Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1). **J. Bioinf. Comput. Syst. Biol.**, v. 1, n. 1, p. 1-3, 2017.
- BARTHOLOMEW, C. et al. Transmission of HTLV-1 and HIV among homosexual men in Trinidad. **JAMA.**, v. 257, n. 19, p. 2604-2608, 1987.

BERINI, C.A. et al. Comparison of four commercial screening assays for the diagnosis of human T-cell lymphotropic virus types 1 and 2. **J. Virol.Meth.**, v. 147, n. 2, p. 322-327, 2008.

BELZA, M.J. Spanish Group for the Unlinked Anonymous Survey of HIV Seroprevalence in STD Patients. Prevalence of HIV, HTLV-I and HTLV-II among female sex workers in Spain 2000-2001. **Eur. J. Epidemiol.**, v. 19, n. 3, p. 279-282, 2004.

BINDHU, M. et al. Role of accessory proteins of HTLV-1 in viral replication, T cell activation, and cellular gene expression. **Front. Biosci.**, v. 9, p. 2556-2576, 2004.

CALATTINI, S. et al. Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. **Retrovirol.**, v. 9, n. 2, p. 1-4, 2005.

CARNEIRO-PROIETTI, A.B.F. et al. HTLV in the Americas: challenges and perspectives. **Rev. Panam. Salud Públ.**, v. 19, n. 1, p. 44-53, 2006.

CARNEIRO-PROIETTI, A.B.F. et al. Mother-to-child transmission of human T-cell lymphotropic viruses-1/2: what we know, and what are the gaps in understanding and preventing this route of infection. **J. Pediatr. Infect. Dis. Soc.**, v. 3, n. 1, p. S24-S29, 2014.

CARNEIRO-PROIETTI, A. B. F. **HTLV**. 6. ed. Belo Horizonte: Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais, 2015.

CATALAN-SOARES, B. C.; PROIETTI, F.A.; CARNEIRO-PROIETTI, A.B. F. Os vírus linfotrópicos de células T humanos (HTLV) na última década (1990-2000): aspectos epidemiológicos. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 4, n. 2, p. 81-95, 2001.

CATALAN-SOARES, B.; CARNEIRO-PROIETTI, A. B. F.; PROIETTI, F. A. Heterogeneous geographic distribution of human T-cell lymphotropic viruses I and II (HTLV-I/II): serological screening prevalence rates in blood donors from large urban areas in Brazil. **Cad. Saúde. Públ.**, v. 21, n. 3, p. 926-931, 2005.

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

COURGNAUD, V. et al. Simian T-cell leukemia virus (STLV) infection in wild primate populations in Cameroon: evidence for dual STLV type 1 and type 3 infection in agile mangabeys (*Cercocebus agilis*). **J.Virol.**, v.78, n. 9, p. 4700-4709, 2004.

CURTIN, P.D. **The slave Atlantic trade: a census**. Milwaukee: The University of Wisconsin Press, 1969.

DESRAMES, A. et al. Northern African strains of human T-lymphotropic virus type 1 arose from a recombination event. **J.Virol.**, v. 88, n. 17, p. 9782-9788, 2014.

DIARRA, A.B. et al. Prevalence of HTLV-I virus in blood donors and transfusion in Mali: Implications for blood safety. **Trans.Clin.Biol.**, v. 21, n. 3, p. 139-142, 2014.

DIOP, S. et al. Seroprevalence and molecular epidemiology of human T-Cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 in blood donors from Dakar, Senegal. **J.Clin.Microbiol.**, v. 44, n. 4, p. 1550-1554, 2006.

DOURADO, I. et al. HTLV-I in the general population of Salvador, Brazil: a city with African ethnic and sociodemographic characteristics. **J. Acquir. Imm. Defic. Syndr.**, v. 34, n. 5, p. 527-531, 2003.

DUMAS, M. et al. Seroepidemiology of human T-cell lymphotropic virus type I/II in Benin (West Africa). **AIDS. Res. Hum. Retrovir.**, v. 7, n. 5, p. 447-451, 1991.

EDLICH, R.F.; ARNETTE, J.A.; WILLIAMS, F.M. Global epidemic of human T-cell lymphotropic virus type-I (HTLV-I). **Journ. Emergenc. Medicin.**, v. 18, n. 1, p. 109-119, 2000.

EDWARDS, D. et al. Orf-I and orf-II-encoded proteins in HTLV-1 infection and persistence. **Viruses.**, v. 3, n. 6, p. 861-885, 2011.

EK, O. et al. Human HTLV lymphotropic virus 1 (HTLV-1) among blood donors in Ogbomoso, Oyo State, Nigeria. **Transl. Med.**, v. 5, n. 1, p. 1-3, 2015.

FELSENSTEIN, J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. **J. Mol. Evol.**, v. 17, n. 6, p. 368-376, 1981.

FITCH, W.M.; MARGOLIASH, E. Construction of phylogenetic trees. **Science.**, v. 155, p. 279–284, 1967.

FRANCHINI, G. Molecular mechanisms of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I infection. **Blood.**, v. 86, n. 10, p. 3619-3639, 1995.

GALLO, R.C. The discovery of the first human retrovirus: HTLV-1 and HTLV-2. **Retrovirol.**, v. 2, n. 17, p. 1-7, 2005.

GALLO, R. C.; SLISKI, A.; WONG-STAAAL, F. Origin of human T-cell leukaemia-lymphoma virus. **Lancet.**, v. 2, n. 8356, p. 962-963, 1983.

GALVÃO-CASTRO, B. et al. Distribution of human T-lymphotropic virus type I among blood donors: a nationwide Brazilian study. **Transf.**, v. 37, n. 2, p. 242-243, 1997.

GALVÃO-CASTRO, B. et al. Epidemiologia e origem do HTLV-I em Salvador Estado da Bahia: a cidade com a mais elevada prevalência desta infecção no Brasil. **Gaz.Médica. Bahia.**, v. 79, n. 1, p. 3-10, 2010.

GASTALDELLO, R. et al. HTLV Type 1 Genetic types among native descendants in Argentina. **AIDS. Res. Hum. Retrovir.**, v. 24, n. 9, p. 1139-1146, 2008.

GESSAIN, A. Antibodies to Human T-Lymphotropic Virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. **Lancet.**, v. 2, n. 8452, p. 407-410, 1985.

GESSAIN, A. Human retrovirus HTLV-1: descriptive and molecular epidemiology, origin, evolution, diagnosis and associated diseases. **Bull. Soc.Pathol. Exot.**, v. 104, n. 3, p. 167-180, 2011.

GESSAIN, A.; CASSAR, O. Epidemiological aspects and world distribution of HTLV-1 infection. **Front. Microbiol.**, v. 3, n. 388, p. 1-23, 2012.

GESSAIN, A.; GALLO, R.C.; FRANCHINI, G. Low degree of human T-cell leukemia/lymphoma virus type I genetic drift in vivo as a means of monitoring viral transmission and movement of ancient human populations. **J.Virol.**, v. 66, n. 4, p. 2288-2295, 1992.

GESSAIN, A. et al. HTLV-3/4 and simian foamy retroviruses in humans: discovery, epidemiology, cross-species transmission and molecular virology. **Virol.**, v. 435, n. 1, p. 187-199, 2013.

GONCALVES, D.U. et al. Epidemiology, treatment, and prevention of human T-cell leukemia virus type 1-associated diseases. **Clin. Microbiol.Rev.**, v. 23, n. 3, p. 577-589, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia do manejo clínico do HTLV**. Brasília: Ministério da Saúde, 2003.

GREEN, P.L.; CHEN, S.Y. Human T-cell leukemia virus types 1 and 2. In: Knipe, D. M.; Howley, P. M. (eds). **Fields.Virol.**, 4. ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams e Wilkins, 2001.

GRASSI, M.F. et al. Human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) proviral load of HTLV-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) patients according to new diagnostic criteria of HAM/TSP. **J. Med. Virol.**, v. 83, n. 7, p. 1269-1274, 2011.

HALL, B.G. Phylogenetic Trees Made Easy: A How-To Manual. 3ed Edition. **Sunderland. Associates. Inc. Massachusetts.**, United States of America, 2008.

HASEGAWA, M.; KISHINO, H.; YANO, T. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. **J. Mol. Evol.**, v. 22, n. 2, p. 160–174, 1985.

HENNIG, W. Phylogenetic systematics. **University of Illinois Press, Chicago**, 1966.

HINUMA, Y. 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. U. S. A.**, v. 78, n. 10, p. 6476-6480, 1981.

HOLDER, M.; LEWIS, P.O. Phylogeny estimation: traditional and Bayesian approaches. **Nat. Rev.Genet.**, v. 4, p. 275–284, 2003.

HOUINATO, D. et al. Seroepidemiological study of retroviruses (HTLV-I/II, HIV-1, HIV-2) in the Department of Atacora, northern Benin. **Trop. Med. Int. Health. TM IH.**, v. 1, n. 2, p. 205-209, 1996.

HOUINATO, D. et al. Interest of LQAS method in a survey of HTLV-I infection in Benin (West Africa). **J. Clin. Epidemiol.**, v. 55, n. 2, p. 192-196, 2002.

ISHAK, R. et al. Molecular evidence of mother-to-child transmission of HTLV-IIc in the Kararao Village (Kayapo) in the Amazon region of Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 34, n. 6, p. 519-525, 2001.

JACOB, F. et al. Performances of HTLV serological tests in diagnosing HTLV infection in high-risk population of São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.**, v. 49, n. 6, p. 361-364, 2007.

JACOB, F. et al. Comparison of signal-to-cutoff values in first, second, and third generation enzyme immunoassays for the diagnosis of HTLV-1/2 infection in “at-risk” individuals from São Paulo, Brazil. **J. Virol. Meth.**, v. 159, n. 2, p. 288-290, 2009.

JUKES, T.H.; CANTOR, C.R. Evolution of protein molecules. **Mamm. Protein. Metab.**, v. 3, p. 21–132, 1969.

JOHNSON, J.M.; HARROD, R.; FRANCHINI, G. Molecular biology and pathogenesis of the human T-cell leukaemia/lymphotropic virus Type-1 (HTLV-1). **Int. J. Exp. Pathol.**, v. 82, n. 3, p. 135-147, 2001.

KALYANARAMAN, V.S. et al. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. **Science.**, v. 218, n. 4572, p. 571-573, 1982.

KASHIMA, S. et al. Distribution of Human T Cell Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1) Subtypes in Brazil: Genetic Characterization of LTR and Tax Region. **AIDS. Res. Hum. Retrovir.**, v. 22, n. 10, p. 953–959, 2006.

KIMURA, M. The neutral theory of molecular evolution. **Cambridge. University Press.**, 1984.

KORALNIK, I.J. et al. Phylogenetic associations of human and simian T-cell leukemia/lymphotropic virus type I strains: evidence for interspecies transmission. **J. Virol.**, v. 68, n. 4, p. 2693-2707, 1994.

LA GRENADE, L. HTLV-I-associated infective dermatitis: past, present, and future. **J. Acquir. Imm. Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.**, v. 13, n. Suppl 1, p. S46–S49, 1996.

LARSEN, O. et al. Prevalences of HTLV-1 infection and associated risk determinants in an urban population in Guinea-Bissau, West Africa. **J. Acquir. Imm. Defic. Syndr.**, v. 25, n. 2, p. 157–163, 2000.

LEMEY, P.; SALEMI, M.; VANDAMME, A.M. *The Phylogenetic Handbook. A practical approach to phylogenetic analysis and hypothesis testing.* 2nd Edition. **Cambridge University Press.**, 2010.

LI, S.; PEARL, D.K.; DOSS, H. Phylogenetic tree construction using Markov chain Monte Carlo. **J. Am. Stat. Assoc.**, v. 95, n. 450, p. 493–508, 2000.

LIU, H.F. et al. The three human T-lymphotropic virus type I subtypes arose from three geographically distinct simian reservoirs. **J. Gen. Virol.**, v. 77, n. 2, p. 359-368, 1996.

LOPES, M.S.N.; PROIETTI, A.B.F.C. HTLV-1/2 transfusional e hemovigilância: a contribuição dos estudos de look-back transfusion-transmitted HTLV-1 /2 and hemovigilance: the contribution of look-back studies. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 30, n. 3, p. 229-240, 2008.

MAGALHÃES, T. et al. Phylogenetic and molecular analysis of HTLV-1 isolates from a medium sized town in northern of Brazil: tracing a common origin of the virus from the most endemic city in the country. **J. Med. Virol.**, v. 80, n. 11, p. 2040-2045, 2008.

MAHIEUX, R.; GESSAIN, A. HTLV-3/STLV-3 and HTLV-4 viruses: discovery, epidemiology, serology and molecular aspects. **Viruses.**, v. 3, n. 7, p. 1074-1090, 2011.

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

MANEL, N. et al. HTLV envelopes and their receptor GLUT1, the ubiquitous glucose transporter: a new vision on HTLV infection? **Front. Biosci. J. Virtual Libr.**, v. 9, p. 3218-3241, 2004.

- MATSUOKA, M. Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) infection and the onset of adult T-cell leukemia (ATL). **Retrovirol.**, v. 2, p. 27, 2005.
- MATSUOKA, M.; JEANG, K.T. Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. **Nat. Rev. Cancer.**, v. 7, n. 4, p. 270-280, 2007.
- MATSUOKA, M.; GREEN, P.L. The HBZ gene, a key player in HTLV-1 pathogenesis. **Retrovirol.**, v. 6, n. 1, p. 71, 2009.
- MAU, B.; NEWTON, M.A. Phylogenetic inference for binary data on dendrograms using Markov chain Monte Carlo. **J. Comput. Graph. Stat.**, v. 6, n. 1, p. 122–131, 1997.
- MEERTENS, L. et al. Molecular and phylogenetic analyses of 16 novel simian T cell leukemia virus type 1 from Africa: close relationship of STLV-1 from *Allenopithecus nigroviridis* to HTLV-1 subtype B strains. **Virology**, v. 287, n. 2, p. 275-285, 2001.
- MESNARD, J. M.; BARBEAU, B.; DEVAUX, C. HBZ, a new important player in the mystery of adult T-cell leukemia. **Blood.**, v. 108, n. 13, p. 3979-3982, 2006.
- MICHENER, C.D.; SOKAL, R.R. A quantitative approach to a problem in classification. **Evolution.**, v.11, n. 2, p.130–162, 1957.
- MIURA, T. et al. Phylogenetic subtypes of human T-lymphotropic virus type I and their relations to the anthropological background. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 91, n. 3, p. 1124-1127, 1994.
- MIURA, T. et al. Molecular phylogeny of human T-cell leukemia virus type I and II of Amerindians in Colombia and Chile. **J. Mol. Evol.**, v. 44, n. 1, p. S76-S82, 1997.
- MOCHIZUKI, M. et al. HTLV-I uveitis. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.**, v. 13, n. Suppl 1, p. S50–S56, 1996.
- MOTA, A.C.A. et al. The close relationship between South African and Latin American HTLV type 1 strains corroborated in a molecular epidemiological study of the HTLV type 1 isolates from a blood donor cohort. **AIDS Res. Hum. Retroviruses.**, v. 23, n. 4, p. 503-507, 2007.

MOTA-MIRANDA, A.C. et al. HTLV-1 infection in blood donors from the Western Brazilian Amazon region: seroprevalence and molecular study of viral isolates. **J. Med. Virol.**, v. 80, n. 11, p. 1966-1971, 2008.

MURPHY, E. L. et al. HTLV-associated myelopathy in a cohort of HTLV-I and HTLV-II-infected blood donors. **Neurol.**, v. 48, n. 2, p. 315–320, 1997.

OKOCHI, K.; SATO, H.; HINUMA, Y. A. Retrospective study on transmission of adult T cell leukemia virus by blood transfusion: seroconversion in recipients. **Vox. Sang.**, n. 46, v. 5, p. 245-253, 1984.

OSAME, M. et al. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. **Lancet.**, v. 1, n. 8488, p. 1031-1032, 1986.

PÁDUA, E. et al. Molecular characterization of human T cell leukemia virus type 1 subtypes in a group of infected individuals diagnosed in Portugal and Spain. **AIDS. Res. Hum. Retrovir.**, v. 27, n. 3, p. 317-322, 2011.

PAIVA, A.; CASSEB, J. Origin and prevalence of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and type 2 (HTLV-2) among indigenous populations in the Americas. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.**, v. 57, n. 1, p. 1-13, 2015.

PARUK, H.; BHIGJEE, A. Health policy implications of blood transfusion-related human T-cell lymphotropic virus type 1 infection and disease. **South. Afr. J. Infect. Dis.**, v. 30, n. 4, p. 145-146, 2015.

POIESZ, B.J. et al. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 77, n. 12, p. 7415-7419, 1980.

POPOVIC, M. et al. The virus of Japanese adult T-cell leukaemia is a member of the human T-cell leukaemia virus group. **Nature.**, v. 300, n. 5887, p. 63-66, 1982.

PROIETTI, F.A. et al. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. **Oncogene.**, v. 24, n. 39, p. 6058-6068, 2005.

PROIETTI, A.B.F.C. **Cadernos Hemominas. 4 ed. Belo Horizonte: Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais. 2006.**

RANNALA, B.; YANG, Z. Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. **J. Mol. Evol.**, v. 43, n. 3, p. 304–311, 1996.

REGO, F.F. et al. HTLV type 1 molecular study in Brazilian villages with African characteristics giving support to the post-Columbian introduction hypothesis. **AIDS. Res. Hum. Retrovir.**, v. 24, n. 5, p. 673-677, 2008.

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

RZHETSKY, A.; NEI, M. A simple method for estimating and testing minimum-evolution trees. **Mol. Biol. Evol.**, v. 9, p. 945, 1992.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol. Biol. Evol.**, v. 4, n. 4, p. 406–425, 1987.

SALEMI, M.; VAN-DOOREN, S.; VANDAMME, A-M. Origin and evolution of human and simian T-cell lymphotropic viruses. **AIDS. Rev.**, p. 131–139, 1999.

SALEMI, M.; VANDAMME, A-M. The phylogenetic handbook: a practical approach to DNA and protein phylogeny. **Cambridge. University Press.**, 2003.

SANTOS, F.L.N.; LIMA, F.W.M. Epidemiology, physiopathogenesis and laboratorial diagnosis of the HTLV-I infection. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 41, n. 2, p. 105-116, 2005.

SATAKE, M.; YAMAGUCHI, K.; TADOKORO, K. Current prevalence of HTLV-1 in Japan as determined by screening of blood donors. **J. Med. Virol.**, v. 84, n. 2, p. 327-335, 2012.

SEIKI, M. et al. Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 80, n. 12, p. 3618-3622, 1983.

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

SMITH, M. R.; GREENE, W.C. Characterization of a novel nuclear localization signal in the HTLV-I tax transactivator protein. **Virol.**, v. 187, n. 1, p. 316-320, 1992.

SONODA, S. et al. Ancient HTLV type 1 provirus DNA of Andean mummy. **AIDS. Res. Hum. Retrovir.**, v. 16, n. 16, p. 1753–1756, 2000.

SUCHARD, M.A.; WEISS, R.E.; SINSHEIMER, J.S. Bayesian selection of continuous-time Markov chain evolutionary models. **Mol. Biol. Evol.**, v. 18, n. 6, p. 1001–1013, 2001.

SWITZER, W.M. et al. Ancient, independent evolution and distinct molecular features of the novel human T-lymphotropic virus type 4. **Retrovirol.**, v. 6, n. 9, p. 2-20, 2009.

TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Mol. Biol. Evol.**, v. 10, n. 3, p. 512–526, 1993.

TAKATSUKI, K.; YAMAGUCHI, K.; MATSUOKA, M. ATLL and HTLV-I related diseases. In: Takatsuki K, ed. Adult T-cell Leukemia. **Oxford. University Press.**, p.1–27, 1994.

TERRY, A.A. et al. Seroprevalence of HTLV -I/II amongst Blood Donors in Osogbo, Nigeria. **Sudan. J. Med. Sci.**, v. 6, p. 177-182, 2011.

TREVIÑO, A. et al. Molecular Epidemiology and Clinical Features of Human T Cell Lymphotropic Virus Type 1 Infection in Spain. **AIDS. Res. Hum. Retrovir.**, v.30, n. 9, p. 856-862, 2014.

TSCHACHLER, E. et al. Human T-lymphotropic virus type I tax regulates the expression of the human lymphotoxin gene. **Blood.**, v. 81, n. 1, p. 95-100, 1993.

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

VALLINOTO, A.C. et al. Serological and molecular evidence of HTLV-I infection among Japanese immigrants living in the Amazon region of Brazil. **Jpn. J. Infect. Dis.**, v. 57, n. 4, p. 156-159, 2004.

VALLINOTO, A.C.R. et al. Identification of human T-cell lymphotropic virus infection in a semi-isolated Afro-Brazilian quilombo located in the Marajó Island (Pará, Brazil). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 101, n. 1, p. 103-105, 2006.

VAN-DOOREN, S.J.A. Molecular investigation of the evolutionary history and diversity of primate T-lymphotropic virus types 1 and 3. **Doctoral. dissertation. Utrecht University.**, 2005.

VAN-DOOREN, S. et al. Evidence for a post-Columbian introduction of human T-cell lymphotropic virus [type I] [corrected] in Latin America. **J. Gen. Virol.**, v. 79, n. 11, p. 2695–2708, 1998.

VAN-TIENEN, C. et al. Molecular epidemiology of endemic human T-lymphotropic virus type 1 in a rural community in Guinea-Bissau. **PLoS. Negl. Trop. Dis.**, v. 6, n. 6, p. 1-8, 2012.

VERGER, P. Flux et reflux de la traite des nègres entre le Golfe de Benin et Bahia de Todos os Santos. **Mout. Paris.**, 1987.

VIANA FILHO, L . O negro na Bahia. **Nova Fronteira 3^{ed}**, 1988.

VICENTE, A.C.P. et al. Genetic Characterization of Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 in Mozambique: Transcontinental Lineages Drive the HTLV-1 Endemic. **PLoS.Negl. Trop.**, v. 5, n. 4, p. 1-6, 2011.

WATSON, J.D.; CRICK, F.H. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. **Nature.**, v. 171, p. 737–738, 1953.

WOLFE, N.D. et al. Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 102, n.22, p. 7994-7999, 2005.

WILLIAMS, L.O. et al. Laboratory performance in HTLV-I/II analysis. **Transf.**, v. 40, n. 12, p. 1514-1521, 2000.

YANG, Z. Among-site rate variation and its impact on phylogenetic analyses. **Trend. Ecol. Evol.**, v. 11, p. 367–372, 1996.

YANG, Y. Computational Molecular Evolution. Oxford Series in Ecology and Evolution. **Oxford. University Press.**, 2008.

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 U. S. A.**, v. 79, n. 6, p. 2031-2035, 1982.

YOUNIS, I.; GREEN, P. L, The human T-cell leukemia virus Rex protein. **Front. Biosci.**, v. 10, p. 431-445, 2005.

ZEHENDER, G. et al. Description of a “trans-Saharan” strain of human T-lymphotropic virus type 1 in West Africa. **J. Acquir. Imm. Defic. Syndr.**, v. 47, n. 3, p. 269-273, 2008.

ZUCKERKANDL, E.; PAULING, L. Molecular disease, evolution and genetic heterogeneity. In: Kasha M, Pullman B, editors. **Horiz. Biochemis. New York. Academ. Press.**, p. 189-225, 1962.

ANEXOS

- The complete LTR data set for the phylogenetic inference.

Code	Name of Country	Number of Taxa
AR	Argentina	69
BO	Bolivia	01
BR	Brazil	120
CA	Canada	02
CF	Central African Republic	06
CL	Chile	01
CM	Cameroon	09
CO	Colombia	13
DO	Dominican Republic	01
DZ	Algeria	01
EC	Ecuador	07
ES	Spain	15
GA	Gabon	02
GF	French Guiana	01
GW	Guinea-Bissau	47
JP	Japan	19
KW	Kuwait	04
MA	Morocco	02
ME	Melanesiana	07
MR	Mauritania	01
MZ	Mozambique	23
PE	Peru	25
PG	Papua New Guinea	01
SB	Solomond Islands	01
SN	Senegal	05
TW	Taiwan	01
VE	Venezuela	01
VU	Vanuatu	02
Total		390

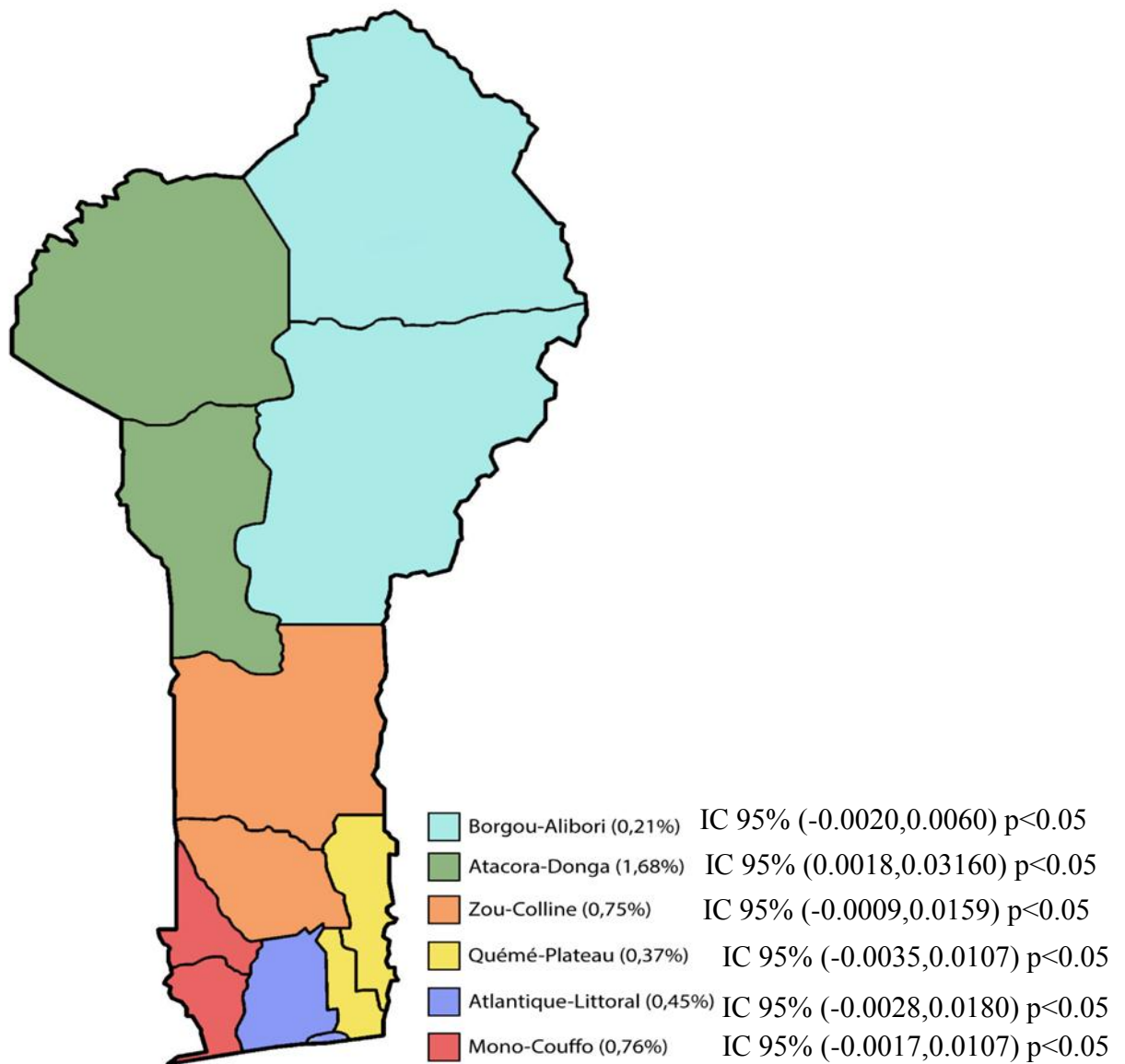
- GenBank accession numbers of the 41 LTR sequences recently described by DESRAMES et al., 2014:

(KJ544815-KJ544824, KJ544826-KJ544834, KJ544836-KJ544852, KJ544855, KJ54483-KJ54485).

➤ LTR Sequences included in each cluster for the BEAST analysis of Brazilian epidemic

Cluster	Country Code and Taxa
LTR.cluster.1	BR-EF672334, BR-JF271849, BR-DQ471208, BR-DQ005554, AR-AY324782, MZ-GU194509, MZ-GU194507, MZ-GU194504, MZ-GU194505, MZ-GU194508, MZ-AF097527, CO-GU126475, BR-EF672337, PE-Y16480, AR-DQ182407, BR-DQ471206, MZ-GU194508, BR-DQ471209, BR-EF672336, BR-JF271838, BR-JF271837, ES-GU181416, CO-KC493396, BR-DQ471207, BR-JF271839, BR-DQ005548, BR-DQ005565
LTR.cluster.2	BR-EU108723, BR-JX280950, BR-DQ471195, BR-EU108724, BR-JF271842, BR-JF271852, BR-JX280957, BR-KC493399, BR-JF271840, BR-DQ005547, BR-DQ005546, BR-DQ471187, BR-GU225732, BR-EU108721, BR-JF271848, BR-JF271846, BR-JX280948, BR-DQ471196, BR-FJ853491, BR-JX280960, BR-DQ471193, BR-JX280952, BR-DQ005550, BR-DQ471190, BR-DQ471198, BR-DQ005549, BR-DQ471192, BR-DQ005553, BR-FJ853490, BR-DQ005558, BR-DQ005557, BR-DQ471194, BR-DQ471191, BR-JX280959, BR-DQ471189, BR-JX280951, BR-CQ443755, BR-DQ471188, BR-JF271850, BR-JF271844, BR-JX280954
LTR.cluster.3	BR-AY499185, BR-EU392160, BR-JF271843, BR-JF271841, BR-JF271847, BR-JX280947, ES-GU181417, ES-GU126483, BR-JX280955, BR-DQ471205, BR-EF672335, ES-GU181409, BR-GQ443757, BR-JF271836, BR-GU126481, BR-JX280956, BR-GU225731, PE-Y16476, BR-JX280953, BR-DQ471203, BR-DQ471202, BR-DQ005555, BR-DQ471204, BR-JF271851, BR-DQ471197
Transcontinental	BR-EF672334, BR-JF271849, BR-DQ471208, BR-DQ005554, AR-AY324782, MZ-GU194509, MZ-GU194507, MZ-GU194504, MZ-GU194505, MZ-GU194508, MZ-AF097527, CO-GU126475, BR-EF672337, PE-Y16480, AR-DQ182407, BR-DQ471206, MZ-GU194508, BR-DQ471209, BR-EF672336, BR-JF271838, BR-JF271837, ES-GU181416, CO-KC493396, BR-DQ471207, BR-JF271839, BR-DQ005548, BR-DQ005565, BR-EU108723, BR-JX280950, BR-DQ471195, BR-EU108724, BR-JF271842, BR-JF271852, BR-JX280957, BR-KC493399, BR-JF271840, BR-DQ005547, BR-DQ005546, BR-DQ471187, BR-GU225732, BR-EU108721, BR-JF271848, BR-JF271846, BR-JX280948, BR-DQ471196, BR-FJ853491, BR-JX280960, BR-DQ471193, BR-JX280952, BR-DQ005550, BR-DQ471190, BR-DQ471198, BR-DQ005549, BR-DQ471192, BR-DQ005553, BR-FJ853490, BR-DQ005558, BR-DQ005557, BR-DQ471194, BR-DQ471191, BR-JX280959, BR-DQ471189, BR-JX280951, BR-CQ443755, BR-DQ471188, BR-JF271850, BR-JF271844, BR-JX280954, BR-AY499185, BR-EU392160, BR-JF271843, BR-JF271841, BR-JF271847, BR-JX280947, ES-GU181417, ES-GU126483, BR-JX280955, BR-DQ471205, BR-EF672335, ES-GU181409, BR-GQ443757, BR-JF271836, BR-GU126481, BR-JX280956, BR-GU225731, PE-Y16476, BR-JX280953, BR-DQ471203, BR-DQ471202, BR-DQ005555, BR-DQ471204, BR-JF271851, BR-DQ471197, MA-U12807, MZ-GU194511, BR-DQ005556, BR-DQ005564, ES-GU181411-aA-2009, AR-DQ182375, AR-DQ182374, AR-DQ182376-aA, AR-DQ182359, AR-DQ182358, AR-DQ182360, PE-

Y16479, PE-Y16478, ES-KC493401, BR-JX280958, PE-KC493379, PE-Y16482, BR-JF271845, EC-KC493389, BR-DQ005552, BR-DQ471201, AR-DQ182371, PE-AY324786, ES-GU181418, PE-KC493378, BR-JX280949, AR-DQ182357, AR-DQ182377, EC-KC493402, PE-GU126476, PE-GU126479, PE-KC493381, PE-Y16477, AR-DQ182356, AR-DQ182355, BR-KC493385, PE-KC493397, BR-DQ471199, BR-EU108722, EC-KC493392, CL-KC493388, ES-GU181414, BR-EU392159, AR-DQ182401, PE-GU126478, PE-Y16475, PE-AY324787, AR-DQ182367, AR-DQ182387, AR-DQ182386, AR-DQ182369, AR-DQ182368, AR-DQ182362, AR-DQ162361, AR-DQ182399, AR-DQ182409, AR-DQ182395, AR-DQ182394, AR-DQ182408, AR-DQ182392, AR-DQ182404, AR-DQ182363, AR-DQ182365, EC-KC493393, AR-DQ182388, AR-DQ182403, AR-AY324781, AR-AY324780, AR-DQ182366, AR-DQ182364, AR-DQ182393, AR-DQ182378, AR-DQ182398, AR-DQ182396, AR-DQ182400, AR-DQ182390, AR-DQ182385, AR-DQ182384, AR-DQ182383, AR-AY324784, AR-DQ182389, AR-DQ182406, AR-AY324779, AR-DQ182391, AR-DQ182380, AR-DQ182379, AR-DQ182402, AR-DQ182381, AR-AY324778, AR-DQ182382, AR-DQ182370, AR-DQ182410, AR-DQ182405, AR-DQ182372, AR-DQ182397, AR-AY324783, AR-AY324777, AR-DQ182373, AR-DQ182411, PE-KC493387, JP-AB471992, ES-GU181412, KW-L42253, KW-L42225, KW-L42255, ME-U87263, ME-U87261, S76263, ME-U87262, KW-AF032470, ME-U87260, MZ-GU194516, MZ-GU194515, MZ-GU194512, CM-AY818430, ME-U87264, CA-U32552, BR-AB036351, BR-AB036350, BR-AB036348, SB-AF124043, MZ-GU194513, MZ-AF097528, VE-KC493400, MZ-GU194518, MZ-AF097525, MZ-AF097524, MZ-AF097526, BR-DQ005570, MZ-GU194520, BR-DQ005559, MZ-GU194519, BR-DQ005562, MZ-JF271853, BR-DQ005561, BR-DQ005572, CF-L77212, BR-DQ005567, MZ-GU194510, BR-DQ005574, BR-DQ005571, PE-KC493386, CO-KC493398, JP-AB471994, GU126477, DO-KC493395, JP-AB472005, JP-AB472008, JP-AB471997, BR-DQ005566, BR-DQ005560, MZ-GU194517, BR-DQ005573, BR-DQ005568, BR-DQ005563, BR-DQ005569, ES-GU181413, BR-AB036349, EC-KC493394, ES-AF485382, ES-GU126474, ES-GU126480, ES-AF485383, EC-KC493390, EC-KC493391, BR-EF672333, BR-DQ471200, BR-GQ443756, MZ-GU194521, AR-DQ182415, BO-KC493382, AR-DQ182412, AR-DQ182413, PE-AY324788, JP-AB471998, AR-DQ182414, PE-Y16487, M37299, JP-AB472000, JP-AB036352, JP-AB471996, JP-AB472007, BR-AY499186, JP-AB472001, CA-U32557, CO-AY269836, CO-AY269829, CO-AY269828, CO-AY269827, CO-AY269835, CO-AY269831, CO-AY269833, CO-AY269830, CO-AY269834, CO-AY269832, JP-AB472004, JP-AB472009, BR-AB036353, JP-AB472006, JP-AB472010, JP-AB471999, JP-AB472002, JP-AB471995, PE-Y16484, BR-AY499187, PE-Y16483, PE-Y16485, TW-AB036354, JP-AB4712003, JP-AB471993



Supplementary Figure 1. HTLV-1/2 serologic enzyme-linked immunoassay (ELISA) screening prevalence rates among 2035 blood donors in the Benin provinces.

Table 2. Study population and prevalence rate of HTLV infection according to study variables.

Variables	N°	ELISA + (%)	ELISA - (%)	Boderline (%)
Age				
18-26	1042	5 (41.67)	1034 (51.24)	3 (42.85)
27-34	498	5 (41.67)	491 (24.33)	2 (28.57)
35-45	364	2 (16.67)	361(17.89)	1(14.28)
> 45	132	0	131 (6.49)	1(14.28)
Gender				
Male	1675	9 (75)	1662 (82.45)	4 (57.14)
Female	360	3 (25)	354 (17.55)	3 (42.85)
Religions				
Catholic	1315	12 (100)	1299 (64.43)	4 (57.15)
Muslim	337	0	334 (16.56)	3 (42.85)
Evangelic	169	0	169 (8.38)	0
Celeste	53	0	53 (2.63)	0
Traditional	94	0	94 (4.67)	0
Néant	67	0	67 (3.32)	0
Civil status				
Married	626	3 (25)	621 (31.43)	2 (28.58)
Single	1369	9 (75)	1355 (68.57)	5 (71.42)
Occupation				
Student	861	5 (41.67)	854 (42.36)	2 (28.57)
Non-medical staff	579	3 (25)	573 (28.42)	3 (42,85)
Driver	79	2 (16.66)	77 (3.82)	0
Artisans ou Business	349	1 (8.33)	346 (17.16)	2 (28.57)
Medical staff and Soldier	123	1 (8.33)	122 (6.04)	0
Others	44	0	44 (2.18)	0
Others viral markers				
HBS +	110	0	110 (100)	0
HCV +	19	0	19 (100)	0
HIV +	22	0	22 (100)	0
TPHA +	8	0	8 (100)	0

Supplementary Table 3. HTLV infection among the study population and risk factors of transmission.

Variables	No. Participants tested	HTLV positive		
		Cases no.	P Value*	OR (95% IC)
Age				
≤ 26	1038	5	0,57	0,67 (0,21-2,14)
> 26	990	7		
Gender				
Male	1671	9	0,45	0,63 (0,17-2,37)
Female	357	3		
Antecedente of transfusion				
Yes	40	0	1,00	-
No	1904	12		
Breastfeeding > 6 months				
Yes	1054	5	0,099	0,33 (0,08-1,24)
No	279	4		
Change of partner				
Yes	620	4	0,76	1,13 (0,34-3,78)
No	1408	8		
Partner number				
≤ 3	336	1	0,70	0,45 (0,05-3,54)
> 3	1692	11		
Civil status				
Married	624	3	0,76	0,72 (0,19-2,69)
Single	1364	9		

*Fisher exact test for comparisons among blood donors.

**Fiche d'enquête: Prévalence des virus HTLV 1e2 chez les donneurs
du système transfusionnel et en milieu hospitalier
béninois**

1. Identification

1.1. N° fiche /_/_/_/_/_/

1.2. Nom et prénoms: _____

1.3. Contact téléphonique: /_/_/_/_/_/_/_/_/_/_/_/_/

1.4. Code de la fiche /_/_/_/_/_/_/_/_/_/

1. Identification

1.1. N° fiche /_/_/_/_/_/

1.2. Code de la fiche /_/_/_/_/_/_/_/_/_/

1.3. Date de l'enquête: /_/_/_/_/_/_/_/_/_/

1.4. Département: _____ Lieu de l'enquête: AD /_/_/PTS /_/_/EM

1.5. Nom et prénoms de l'enquêteur: _____

2. Caractéristiques du donneur de sang

2.1. a) Age (année) : /_/_/_/_/_/_/ 2.1. b) Sexe : M = /_/_/ F= /_/_/

2.2. Lieu de résidence: Commune _____ Arrondissement _____ Village _____

2.3. Ethnie: _____

2.4. Profession: _____

2.5. Religion: _____

2.6. Situation matrimoniale: _____

3. Attitudes et pratiques

3.1. Changement de partenaire: Oui /_/_/Non/_/_/

3.2. Si oui nombre de partenaire dans votre vie? _____

3.3. Durée d'allaitement dans votre famille (plus de 6mois) : Oui /_/_/Non/_/_/

4. Antécédents transfusionnels

4.1. Avez-vous été une fois transfusé? Oui /_/_/Non/_/_/ Si oui

4.2. Nombre d'épisodes de transfusions /_/_/ Année (s) de (s) transfusion (s) _____

4.3. Types de PSL reçu: CGR /CPS /_/_/ PFC /_/_/

4.4. Nombre total de poche (s) reçue (s): CGR /CPS /_/_/ PFC /_/_/

5. Renseignements cliniques

- 5.1. Poids: /_/_/_/_/_/
- 5.2. Température du donneur /_/_/_/_/° C
- 5.3. Lombalgie: Oui /_/_/Non/_/_/
- 5.4. Autres symptômes cliniques

6. Aspects thérapeutiques

- 6.1. Traitement en cours
- 6.2. Oui /_/_/ non /_/_/ Si oui préciser:
Molécule (s) utilisé _____
- 6.3. Durée du traitement (jour) /_/_/_/_/
- 6.4. Date de la dernière prise /_/_/_/_/ /_/_/_/_/ /_/_/_/_/

7. Diagnostic biologique HTLV

- 7.1. ELISA HTLV: Positif /_/_/ Négatif /_/_/ Douteux /_/_/
- 7.2. Si ELISA HTLV Positif préciser le titre /_/_/_/_/_/_/_/_/
- 7.3. Test de discrimination : HTLV1 /_/_/ HTLV2 /_/_/ Douteux /_/_/
- 7.4. PCR HTLV: Positif /_/_/ Négatif /_/_/ Douteux /_/_/

8. Autres Sérologie (s)

- 8.1. HIV: Positif /_/_/ Négatif /_/_/ Douteux /_/_/
- 8.2. HBC: Positif /_/_/ Négatif /_/_/ Douteux /_/_/
- 8.3. HBS: Positif /_/_/ Négatif /_/_/ Douteux /_/_/
- 8.4. TPHA: Positif /_/_/ Négatif /_/_/ Douteux /_/_/