



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa

TESE DE DOUTORADO

**ESTUDO MOLECULAR DE PROTEÍNAS ESTRUTURAIS (gp21 E gp46) E
REGULATÓRIAS (HBZ) DO HTLV-1 EM INDIVÍDUOS COM DIFERENTES PERFIS
CLÍNICOS**

ALINE CRISTINA ANDRADE MOTA MIRANDA

Salvador – Brasil
2012

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa

**ESTUDO MOLECULAR DE PROTEÍNAS ESTRUTURAIS (gp21 E gp46) E
REGULATÓRIAS (HBZ) DO HTLV-1 EM INDIVÍDUOS COM DIFERENTES PERFIS
CLÍNICOS**

ALINE CRISTINA ANDRADE MOTA MIRANDA

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Júnior Alcântara
Co-Orientador: Prof. Dr. Bernardo Galvão Castro Filho

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa para a obtenção do grau de Doutor.

Salvador – Brasil
2012

*Dedico este trabalho,
e todo ensinamento e crescimento, conquistados pelo caminho,
aos meus pais Wilson e Tereza Miranda,
que são meus primeiros e eternos orientadores...*

Aline Miranda

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre ao meu lado, sendo minha alegria, minha força e minha esperança...

Aos meus pais, Vilson e Tereza, meus grandes exemplos, por doarem, inteiramente, suas vidas para minha felicidade e por serem, sempre, o motivo do meu sucesso.

Ao meu esposo Neto, por dividir comigo as alegrias e tristezas do percurso, pelo amor semeado todos os dias, pelo companheirismo, incentivo e dedicação.

A minha irmã Camila, pela torcida, pela presença e por me ensinar a nunca desistir!

Ao meu orientador, professor Dr. Luiz Alcântara, por todas as oportunidades, pela confiança e pelos ensinamentos.

Ao meu co-orientador Dr. Bernardo Galvão Castro Filho, que sempre me incentivou e cultivou credibilidade ao meu trabalho.

À Dra. Maria de Lourdes Farré Vallve (LAPEX), pela confiança e generosidade e pela colaboração na caracterização molecular do HBZ.

À Dra. Marilda Gonçalves (LPBM) pela generosa presença e auxílio constante.

À Dra. Maria Fernanda de Castro Amarante (NIH) pelo auxílio na realização da clonagem.

À Dra. Joana Monteiro (UFBA) pelo ajuda fundamental nos cultivos celulares e na criopreservação.

À Fernanda Barreto, iniciação científica deste trabalho, e, sobretudo companheira e amiga nesta caminhada. Pela dedicação, amizade e gargalhadas, mesmo em momentos difíceis.

A Éverton Batista (LAPEX), à Cristiane Nascimento (LPBI), à Silvana Paz (Plataforma de Sequenciamento), pela dedicação, generosidade e disponibilidade, sem tamanho.

A todos os amigos do grupo, pela convivência, amizade e apoio. Em especial à Gisele Calasans pela indispensável ajuda na confecção da Tese e manuscrito.

A todos do LASP, em especial à Dra. Fernanda Grassi e à Dona Eugenia.

A todos do CHTLV: à equipe médica, pela avaliação neurológica; à Sonia Rangel e a Noilson Gonçalves pelo auxílio no manejo dos pacientes; à Viviana Olavarria pela realização da Carga Proviral; a Claudio Paulo e Rodrigo Gaspar pelo suporte durante todo o percurso.

À Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa pelo suporte.

Ao Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, por toda estrutura e pelo apoio financeiro para o desenvolvimento dos trabalhos.

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

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

MIRANDA, Aline Cristina Andrade Mota. Estudo molecular de proteínas estruturais (gp21 e gp46) e regulatórias (HBZ) do HTLV-1 em indivíduos com diferentes perfis clínicos. 92 f. il. Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2012.

RESUMO

O vírus linfotrófico de células T humanas tipo 1, HTLV-1, é conhecido, principalmente, por ser o agente etiológico de uma síndrome neurológica denominada TSP/HAM. Os fatores que definem a manifestação de doença ainda não foram completamente esclarecidos. As glicoproteínas do envelope são altamente conservadas entre os isolados do HTLV-1, no entanto, substituições nucleotídicas na região gênica que codifica para estas proteínas, podem influenciar tanto na infectividade viral como na replicação do vírus. A gp46 possui domínios funcionais já associados à inibição da formação do sincício, à transmissão célula-célula e à produção de anticorpos, enquanto que a gp21 apresenta domínios que permitem a fixação dela à membrana plasmática da célula hospedeira. O HBZ, por sua vez, é relacionado à regulação positiva de fatores de transcrição importantes para o ciclo celular, além de suprimir a transcrição viral mediada por TAX. Estudos recentes revelam correlação entre os níveis dos transcritos do HBZ e a severidade da manifestação da TSP/HAM. Pelo exposto, o objetivo principal do trabalho foi buscar possíveis biomarcadores virais nos diferentes perfis clínicos: assintomáticos e TSP/HAM definidos. Nossos resultados revelaram que a mediana da carga proviral dos indivíduos assintomáticos (ASS) (n = 5) e TSP/HAM (n = 5), foi semelhante (316.227 cópias/10⁶ PBMC). Da caracterização da gp46, obtivemos 146 clones virais: 70 (ASS) e 76 (TSP/HAM). A caracterização molecular revelou uma diversidade genética de 0,4% e 0,6% nos indivíduos ASS e TSP/HAM, respectivamente. Identificamos 5 mutações com frequência acima de 20% entre os clones de cada grupo. Apenas a mutação S35L foi exclusiva de clones do grupo ASS, três mutações (F14S, N42H, G72S) foram exclusivas de clones do grupo TSP/HAM e apenas uma mutação V247I foi encontrada em clones de ambos os grupos com diferença estatística ($p = 0,0014$). Apenas a mutação G72S está presente em um domínio funcional (53-75aa) previamente identificado. Tal domínio foi o segundo domínio mais divergente entre os indivíduos TSP/HAM, sendo o RBD o mais divergente em ambos os grupos. Análises físico-químicas revelaram que o alelo mutante para a posição 14 é mais hidrofílico e flexível, e menos antigênico, para as posições 42 e 247, respectivamente. Foi possível identificar 23 e 16 epítomos ligantes de alelos de HLA classe I e II, respectivamente nos domínios 175-209aa e 53-75aa, respectivamente. A análise de domínios potenciais revelou a presença dos mesmos sítios de modificação pós-traducional com diferentes frequências entre os grupos. Identificamos a troca de estrutura em *coil* para folha beta na predição da estrutura secundária para as mutações S35L e G72S. Da caracterização molecular da gp21 dispomos apenas de 08 sequências, obtidas de PCR direto, de 4 de indivíduos ASS e 4 de indivíduos TSP/HAM. A análise molecular identificou apenas uma mutação (Y477H) em 7 sequências. Da caracterização de 10 sequências, obtidas de PCR direto do HBZ, foi possível identificar duas mutações (S9P e T95I), em 100% das sequências, e uma terceira mutação R112C em 66,7% e 25% das sequências oriundas de indivíduos ASS (n = 6) e TSP/HAM (n = 4), respectivamente. A mutação R112C pode ser responsável pela mutação P34L na proteína p12 (ORF-1 de pX).

Concluimos, portanto, a observação de 5 mutações mais frequentes, na gp46, e que estão associadas ao perfil de variação dentro de cada hospedeiro, já que, com exceção da mutação V247I, as demais mutações foram exclusivas de clones de um único hospedeiro. Uma única mutação foi encontrada na gp21 e em relação ao HBZ foi possível identificar 3 mutações sendo que nenhuma delas tinha sido descrita na literatura. Não foi possível associar nenhuma das mutações encontradas ao perfil clínico devido ao reduzido número de indivíduos incluídos no estudo. No entanto, sugerimos que novos estudos sejam conduzidos, para expandir o entendimento da diversidade molecular dessas proteínas, com o aumento no número de indivíduos avaliados, e sobretudo porque acreditamos no potencial destas mutações sugerimos também a avaliação funcional delas.

Palavras-chave: HTLV-1, mutação, gp46, gp21 e HBZ.

MIRANDA, Aline Cristina Andrade Mota. Molecular study of HTLV-1 structural (gp21 and gp46) and regulatory (HBZ) proteins from different clinical profile individuals. 92 f. il. Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2012.

ABSTRACT

The Human T cell lymphotropic virus type 1, HTLV-1, is mainly associated to the development of a neurological disorder called TSP/HAM. The crucial factors that define the presence of HTLV related diseases are not yet well defined. The envelope glycoproteins are greatly conservative among the different HTLV-1 isolates however, some nucleotides substitutions at the genic region that encodes these proteins can induce changes at the viral infectivity and replication rate. The gp46 contains functional domains already associated to the inhibition of syncitium formation, cell-to-cell transmission and antibody synthesis, while the gp21 has domains that are responsible to the fixation of the protein to the host plasma membrane. About the HBZ, it is related to the positive regulation of transcription factors, besides to the inhibition of Tax mediated viral transcription. Studies had revealed correlation between the HBZ transcripts and TSP/HAM severity. Since that, the main objective of this study was to search for viral markers at the different clinical profiles: Health Carrier (HC) and TSP/HAM. Our results revealed that the median of HTLV-1 proviral load was similar (316.227 copies/10⁶ PBMC) between the two groups: HC (n = 5) and TSP/HAM (n = 5). About the gp46 molecular characterization, we have generated 146 gp46 clones: 70 (HC group) and 76 (TSP/HAM group). The overall diversity among the gp46 clones, within HC and TSP/HAM groups, was of 0.4% and 0.6%, respectively. It was, also, possible to identify five mutations with frequency of over 20% within the viral clones of each group. The mutation S35L was exclusive to clones of HC group, others three mutations (F14S, N42H, G72S) were exclusive to clones of TSP/HAM group and, finally, only one mutation (V247I) was found in both groups, with statistically significant difference ($p = 0.0014$). Only the G72S mutation is present at one functional domain (53-75aa) previously identified. This domain is the second most divergent between the clones of TSP/HAM individuals, and the RBD was the most divergent in both group of clones. The physic-chemical analysis revealed that the mutated allele of the F14S mutation was more hydrophilic and flexible and the mutated alleles of the N42H and V247I mutations were less antigenic. It was possible to identify 23 and 16 different epitopes ligand to class I HLA alleles and class II HLA alleles, respectively at the 175-209aa and 53-75aa domains, respectively. Potential domain analysis showed the same post-translational sites in different frequency between the groups. We have identified the chance of the coil structure to beta sheet at the secondary structure prediction when analyzing the mutations S35L and G72S. About the gp21 characterization we had only 8 sequences, obtained from direct PCR, of 4 HC and 6 TSP/HAM individuals. We identified only one mutation (Y477H) in 7 sequences. About the characterization of 10 sequences, obtained from direct HBZ PCR, it was possible to identify two mutations (S9P and T95I) in 100% of the sequences, and a third mutation R112C in 66,7% and 25% of the sequences originated of HC (n = 6) and TSP/HAM (n = 4) individuals, respectively. The mutation R112C can be responsible to the mutation P34L at p12 (pX ORF-1). We conclude the observation of 5 most frequent mutations, at gp46, that are associated to the host profile, since that, exception for V247I all the mutations were exclusive to clones of only one

host. Only one mutation was found at gp21 and about the HBZ it was possible to identify 3 mutations and any one of them were already described. It was not possible to associate any of the found mutation to the clinical status, due to the reduced number of individuals at the study. We suggest new studies at the investigation of the molecular diversity of these proteins using a larger number of individuals, and we suggest also further functional assays.

Key-words: HTLV-1, gp46, gp21 and HBZ.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1	Estrutura Morfológica do HTLV: desenho esquemático.....	16
Figura 2	Organização genômica do HTLV.....	17
Figura 3	Desenho esquemático do heterodímero formado pelas glicoproteínas SU e TM	18
Tabela 1	Descrição de domínios funcionais previamente identificados na gp46, e sua localização na proteína	21
Figura 4	Estrutura da gp21: domínios estruturais e funcionais.....	22
Figura 5	Esquema ilustrativo e resumido de funções atribuídas à proteína p12.....	24
Figura 6	Transcritos gerados para a codificação do HBZ.....	25
Figura 7	Esquema ilustrativo de domínios funcionais na estrutura do HBZ.....	26
Figura 8	Esquema ilustrativo das etapas de reconhecimento e ligação do HTLV-1 com o complexo receptor na superfície da célula hospedeira.....	29
Figura 9	Esquema ilustrativo das principais vias de dispersão do HTLV-1	31
Figura 10	Distribuição do HTLV-1 no mundo.....	33
Figura 11	Prevalência de HTLV-1/2 entre doadores de sangue em capitais de 26 estados brasileiros e no Distrito Federal.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa – Aminoácido

AD- Domínio de Ativação (*Activation Domain*)

Asp-His-Ile-Leu-Glu-Pro-Ser-Ile-Pro - Asparagina-Histidina-Isoleucina-Leucina-Glutamato-Prolina-Serina- Isoleucina-Prolina

ATK1- Cepa referência do genoma do HTLV-1

ATLV- *Adult T-cell leukemia Virus*

ATL - Leucemia/linfoma de células T do adulto (*Adult T cell Leukemia*)

cAMP - Mensageiro secundário na transdução de sinal

CBP/p300 - Fator de transcrição

CD4⁺ - Linfócitos T CD4⁺

CD45RO - Linfócitos T de memória

CD8⁺ - Linfócitos T CD8⁺

CTD - Domínio citoplasmático (*Citoplasmatic Domain*)

CREB/ATF - Fator de Transcrição

CTL - Linfócito T citotóxico (*Citotoxic T Lymphocyte*)

DC - Célula dendrítica (*Dendritic Cell*)

DNA - Ácido desoxirribonucléico

ELISA - *Enzyme linked Immuno Sorbent Assay*

env – Envelope

gag - Grupo antigênico

Gln-Glu-Gln-Cys-Arg-Phe-Pro-Asn-Ile-Thr - Glicina-Glutamato-Glicina-Cisteína-Arginina-Phenilalanina-Prolina-Asparagina-Isoleucina-Threonina

GLUT-1 - Molécula transportadora de glicose GLUT-1

gp21 - Glicoproteína transmembrana

gp46 - Glicoproteína de superfície

HBZ - *HTLV-1 bZIP factor gene*

sHBZ - *Spliced HBZ*

usHBZ - *Unspliced HBZ*

HIF-1 - Fator indutor de hipóxia do tipo 1 (*Hypoxia Induction Factor 1*)

HIV-1 - Vírus da Imunodeficiência Humana (*Human Immunodeficiency Virus*)

hnRNP-A1 - Proteína nuclear de tamanho pequeno

HLA - Antígeno Leucocitário humano (*Human Leucocitary Antigen*)

HSPG - Heparan sulfato-Proteoglicano

HTLV - Vírus linfotrópico de células T humanas (*Human T cell Lymphotropic virus*)

HTLV-1 - Vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1 (*Human T cell Lymphotropic virus type 1*)

HTLV-2 - Vírus linfotrópico de células T humanas tipo 2 (*Human T cell Lymphotropic virus type 2*)

HTLV-3 - Vírus linfotrópico de células T humanas tipo 3 (*Human T cell Lymphotropic virus type 3*)

HTLV-4 - Vírus linfotrópico de células T humanas tipo 4 (*Human T cell Lymphotropic virus type 4*)

IL-2 - Interleucina do tipo 2
K55 - Peptídeo da gp46 específico do HTLV-2
kb – Kilobases
kDa - Kilo Daltons
LTR - Extremidades em repetições longas (*Long Terminal Repeat*)
LZD - Domínio Zipper de Leucina (*Leucine Zipper Domain*)
mRNA - Ácido ribonucléico mensageiro
MHC-I - Complexo de histocompatibilidade principal classe I (*Major Histocompatibility Complex I*)
MHC-II - Complexo de histocompatibilidade principal classe II (*Major Histocompatibility Complex II*)
MTA-1 - Peptídeo da gp46 específico do HTLV-1
MTOC - Organização microtubular (*Microtubule-organizing Center*)
NF-κB - Fator de transcrição (*Nuclear Factor κB*)
NRP-1 - Neurofilina 1 (*Neurophilin 1*)
OMS - Organização Mundial de Saúde
ORF - Fase de leitura aberta (*Open Reading Frame*)
p12, p30 e p13 - Proteínas acessórias
p15 - Proteína do nucleocapsídeo
p19 - Proteína da matriz
p24 - Proteína do capsídeo
pb - Pares de bases
pol – Polimerase
PRR - Região rica em prolina (*Proline Rich Region*)
PTLV - *Primate T-cell Leukemia Virus*
pX - Gene regulatório
RBD - Domínio de ligação ao receptor (*Receptor Binding Domain*)
RNA - Ácido ribonucléico
RNaseH - Enzima específica para digestão de RNA
RE - Retículo endoplasmático
Rex - Proteína regulatória
SRF - Fator de transcrição (*Serum Response Factor*)
STLV - Virus linfotrópico de células T em Símios (*Simian T cell Lymphotropic virus*)
siRNA - RNA de interferência
SU - Proteína de superfície
TATA Box - Região que antecede o sítio de transcrição
TCR - *T-cell Receptor*
TM - Proteína transmembrana
TRE - Elemento de resposta à transcrição (*Transcription Response Element*)
TSP/HAM - Paraparesia Espástica Tropical (*Tropical Spastic Paraparesis*)/
Mielopatia Associada ao HTLV (*HTLV Associated Myelopathy*)
WB - *Western Blot*

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	VÍRUS LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T HUMANAS (HTLV)	14
1.1.1	Vírus Linfotrópico de Células T Humanas do tipo 1 (HTLV-1)	15
1.2	HTLV: ESTRUTURA DA PARTÍCULA VIRAL	15
1.3	HTLV: ORGANIZAÇÃO GENÔMICA	16
1.3.1	Região Promotora	16
1.3.2	Genes Estruturais e seus produtos	18
1.3.3	Genes Regulatórios e seus produtos	22
1.4	CICLO DE REPLICAÇÃO VIRAL	26
1.4.1	Complexo Receptor	26
1.4.2	Mecanismos de Infecção	28
1.5	EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO	31
1.5.1	Vias de Transmissão	31
1.5.2	Distribuição Mundial do HTLV-1	32
1.5.3	HTLV-1 no Brasil	33
1.5.4	Epidemiologia Molecular e Origem Geográfica	35
1.6	PRINCIPAIS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS ASSOCIADAS AO HTLV-1	36
1.6.1	TSP/HAM	36
1.6.2	ATL	37
1.6.3	Outras Manifestações Clínicas Associadas ao HTLV-1	38
1.7	RESPOSTA IMUNE NA INFECÇÃO PELO HTLV-1	38
1.8	DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO	39
2.	JUSTIFICATIVA	42
3.	OBJETIVOS	44
4.	RESULTADOS	45
4.1	CAPÍTULO I (ÚNICO) - Genetic Diversity of envelope (gp46), and HBZ, of HTLV-1, in health carriers and TSP/HAM individuals: a clinical and evolutionary approach.	46
5.	CONCLUSÃO	79
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

1. INTRODUÇÃO

1.1 Vírus Linfotrópico de Células T Humanas (HTLV)

No início da década de 70, motivados pela manifestação de leucemia em animais infectados por retrovírus, pesquisadores deram início à trajetória científica que anunciaria a identificação do primeiro retrovírus humano (GALLO, 2005). O HTLV (*Human T-cell Lymphotropic Virus*) foi o primeiro retrovírus humano a ser identificado, tendo isto acontecido, independentemente, nos Estados Unidos e no Japão, na mesma época, respectivamente: em 1979, a partir de um paciente com linfoma cutâneo de células T, e cujo relato científico apenas foi publicado em 1980 (POIESZ *et al.*, 1980); e em 1982, quando foi, inicialmente, identificado como sendo ATL (*Adult T-cell Leukemia Virus*) (YOSHIDA *et al.*, 1982). A partir dos dois relatos, e do consenso estabelecido de se tratar do mesmo organismo, o HTLV-1 passou a ser assim identificado. Pouco tempo depois da identificação do HTLV-1, o HTLV-2 (*Human T-cell Lymphotropic Virus Type 2*), por sua vez, foi isolado a partir de uma linhagem de células T imortalizadas de um paciente com tricoleucemia (KALYANARAMAN *et al.*, 1982).

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

Mais recentemente, novos tipos virais descritos como HTLV-3 (*Human T-cell Lymphotropic Virus Type 3*) (CALATTINI *et al.*, 2005; WOLFE *et al.*, 2005) e HTLV-4 (*Human T-cell Lymphotropic Virus Type 4*) foram isolados pela primeira vez em indivíduos da África Central (WOLFE *et al.*, 2005). Wolfe e cols. sugerem, ainda, que o HTLV-4 represente um evento recente de transmissão cruzada de espécies a partir de um primata não humano infectado com um representante STLV altamente divergente.

1.1.1 Vírus Linfotrópico de Células T Humanas do Tipo 1 (HTLV-1)

Inicialmente, a infecção pelo HTLV-1 foi associada ao desenvolvimento da leucemia/linfoma de células T de adulto (*Adult T-cell leukemia/lymphoma-ATL*) (POIESZ *et al.*, 1980), cujas primeiras ocorrências foram relatadas em indivíduos infectados no Japão. Entre os anos de 1985 e 1986, foram descritas duas outras manifestações clínicas associadas ao HTLV-1: paraparesia espástica tropical (*Tropical Spastic Paraparesis-TSP*) e mielopatia associada ao HTLV (*HTLV Associated Myelopathy-HAM*), em infecções na Martinica e no Japão, respectivamente (GESSAIN *et al.*, 1985; OSAME *et al.*, 1986). No entanto, alguns anos depois, foi possível concluir tratar-se da mesma etiologia, de forma que, atualmente, o HTLV-1 é conhecido como o agente etiológico de uma síndrome neurológica denominada TSP/HAM. Adicionalmente, artropatias (NISHIOKA, 1996), polimiosites (MORGAN *et al.*, 1989), uveítes (MOCHIZUKI *et al.*, 1996), e dermatites infectivas (LA GRENADE, 1996) também têm sido relatadas como sendo manifestações associadas à infecção viral.

Durante as três últimas décadas, o HTLV-1 tem sido associado à diversas complicações clínicas, organizadas em três grupos: (1) doenças malignas, grupo no qual está incluída a ATL; (2) síndromes inflamatórias, grupo que abriga a TSP/HAM, uveíte e síndrome do olho seco; e por fim, (3) complicações infecciosas, como estrogiloidíase e dermatite infecciosa.

1.2 HTLV: Estrutura da Partícula Viral

A estrutura da partícula viral é constituída, basicamente, por um envelope, uma matriz protéica e um nucleocapsídeo. A morfologia do vírus é de esférica a pleomórfica, estrutura similar a de outros retrovírus. O envelope constitui o único complexo protéico presente na superfície do vírion, consistindo de duas subunidades protéicas glicosiladas: a proteína de superfície (SU), também referida como gp46, e a proteína transmembrana (TM), denominada gp21, que ancora a gp46 (**Figura 1**). Logo após a membrana do envelope encontra-se a matriz viral que é composta pela proteína da matriz, ou p19. O capsídeo, por sua vez, apresenta simetria icosaédrica, constitui o cerne da partícula viral e é composto principalmente pela proteína p24.

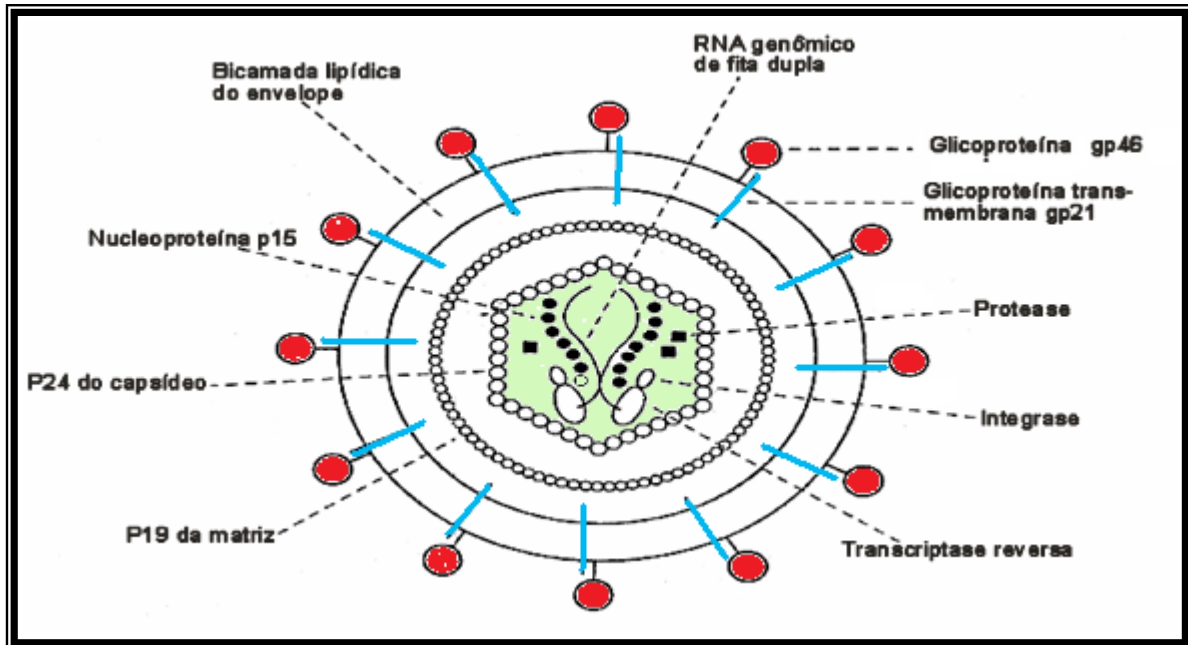


Figura 1-Estrutura Morfológica do HTLV: desenho esquemático (Adaptado SALEMI, 1999).

O genoma viral, localizado no interior do capsídeo, é composto por duas fitas simples de RNA, com extensão de 8-9 kilobases (kb), as quais estão associadas a várias pequenas proteínas, chamadas de proteínas do nucleocapsídeo (p15). Ainda associadas ao genoma viral estão proteínas importantes no processo de integração do DNA proviral ao genoma da célula hospedeira, são elas a transcriptase reversa (TR) e a integrase, enquanto outras proteínas estão envolvidas em eventos catalíticos que precedem o ciclo de replicação viral, grupo representado pela protease e RNaseH.

1.3 HTLV: Organização Genômica

Com uma organização similar a de outros retrovírus, o genoma do HTLV possui os genes estruturais *gag* (grupo antigênico), *pol* (polimerase) e *env* (envelope) além de uma seqüência próxima à extremidade 3' conhecida como região pX, a qual contém, entre outros, os genes reguladores *tax* e *rex*, responsáveis pela transativação e regulação da expressão gênica (**Figura 2**). O genoma do HTLV apresenta alta estabilidade genotípica, e tal característica é provavelmente devido à replicação viral por meio da expansão clonal das células infectadas, e ao uso mínimo da transcriptase reversa (BANGHAM; OSAME, 2005; WATTEL *et al.*, 1995). O

genoma do HTLV-1 por ser estável, é amplamente utilizado como bom marcador molecular para traçar eventos de migração das populações humanas ancestrais, bem como para o entendimento dos mecanismos da evolução viral e monitoramento dos meios de transmissão (GESSAIN *et al.*, 1992).

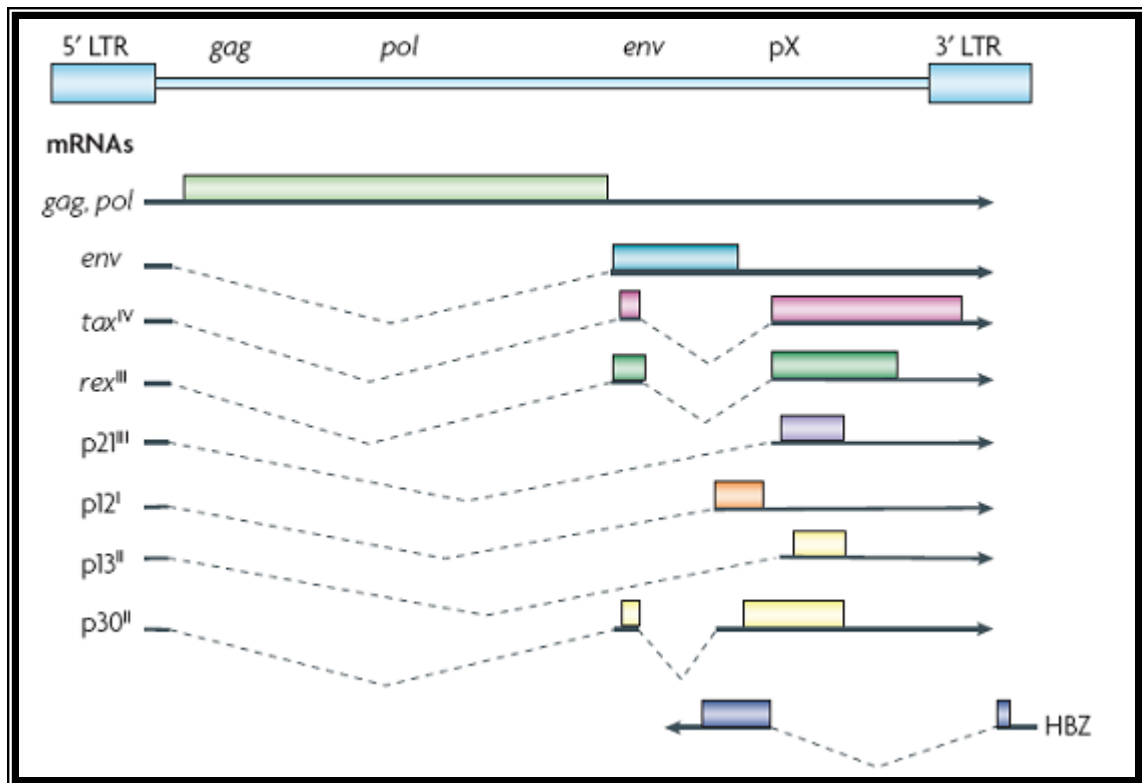


Figura 2-Organização genômica do HTLV (Adaptado de MATSUOKA; JEANG, 2007). Indicação dos genes e principais moléculas de mRNA produzidas durante a transcrição.

1.3.1 Região Promotora

Completando a estrutura geral do genoma do HTLV, estão as regiões flanqueadoras conhecidas como LTR (*Long Terminal Repeat*) que exercem função essencial na incorporação do DNA proviral ao genoma da célula hospedeira, bem como na regulação da transcrição de genes virais (GREEN; CHEN, 2001).

As regiões flanqueadoras estão presentes nas duas extremidades 5' e 3' do DNA proviral e são constituídas por três subunidades: U3, R e U5. Existem pelo menos três elementos essenciais na região U3, são eles: três repetições de 21 pares de bases, necessárias para a

transativação mediada por Tax (BRADY *et al.*, 1987); domínio TATA box, que antecede o sítio de iniciação transcricional; e o sinal de poliadenilação. Além disso, essas regiões flanqueadoras são altamente variáveis e são, portanto, utilizadas como fonte de informação em estudos de epidemiologia molecular.

No processo de transcrição, três moléculas de mRNA são produzidas: o mRNA genômico, utilizado para a síntese dos produtos dos genes *gag* e *pol*, transcrito da extremidade LTR 5' até a junção R-U5 na extremidade LTR3'; o mRNA sub-genômico, sintetizado a partir de uma única etapa de processamento e codificante do produto do gene *env*; e um segundo mRNA sub-genômico, duplamente processado através da remoção de dois íntrons, que codifica as proteínas regulatórias Tax e Rex com, pelo menos, quatro fases de leitura aberta (*Open Reading Frame-ORF*).

1.3.2 Genes Estruturais e seus produtos

O gene *gag* está compreendido entre os nucleotídeos 824 e 2113 (1218pb), tendo como referência o genoma viral completo do protótipo ATK1 (Número de Acesso J02029) (SEIKI *et al.*, 1983), e seu final 3' sobrepõe-se ao início da ORF que codifica para protease. Essa região é inicialmente traduzida como um precursor poliprotéico, cuja subsequente clivagem dá origem às proteínas estruturais maduras do gene *gag*: a proteína da matriz de 19kDa (p19), a proteína do capsídeo de 24 kDa (p24) e a proteína do nucleocapsídeo de 15kDa (p15).

A protease, por sua vez, é codificada por desvio de leitura dos genes *gag* e *pol*, entre os nucleotídeos 1849 e 2757 (909pb) no genoma viral de referência (Número de acesso D13784) (MALIK *et al.*, 1988). A protease atua sobre as cadeias poliprotéicas, clivando-as para formação das proteínas estruturais maduras encontradas na partícula viral.

O gene *pol* compreende os nucleotídeos 2520 a 5207 (2688pb) do genoma referência ATK1 do HTLV-1, de modo que a extremidade 5' do gene *pol* codifica a transcriptase reversa e a sequência *downstream* codifica a integrase. A transcriptase reversa é a enzima responsável pela síntese do DNA viral a partir do RNA de fita simples e, portanto, tem papel fundamental na fase inicial do ciclo de multiplicação do retrovírus.

O gene *env* que corresponde à sequência de nucleotídeos 5203 a 6669 (1467pb) do genoma viral referência ATK1 (Número de Acesso J02029) (SEIKI *et al.*, 1983), codifica a

proteína precursora do envelope viral (Env). A proteína precursora Env é clivada, entre os nucleotídeos 6117 e 6118, gerando os seguintes produtos maduros: a glicoproteína de superfície de 46kDa (gp46-SU) e a proteína transmembrana de 21kDa (gp21-TM).

Como no caso de outros retrovírus, ocorre associação não covalente entre a proteína de superfície e a proteína transmembrana, de modo que esta última ancora a proteína de superfície no envelope da partícula viral (**Figura 3**) (DELAMARRE *et al.*, 1996; MANEL *et al.*, 2004).

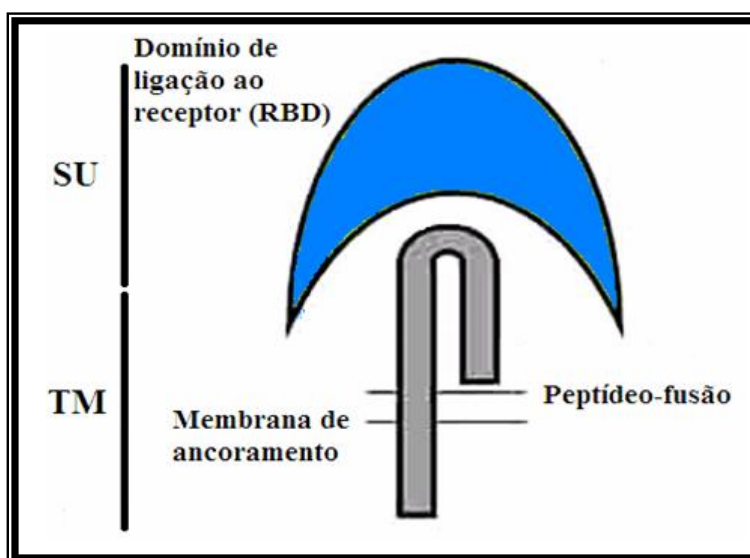


Figura 3-Desenho esquemático do heterodímero formado pelas glicoproteínas SU e TM

(Adaptado de MANEL *et al.*, 2004).

As glicoproteínas gp46 e gp21 estão diretamente associadas ao reconhecimento celular, e à conseqüente entrada do vírus na célula, portanto, inúmeros estudos têm se dedicado a investigar quais seriam as regiões gênicas envolvidas no exercício dessa função. Sagara e cols. (1996) identificaram peptídeos sintéticos, que contendo seqüências específicas dos aminoácidos 197 a 205 (Asp-His-Ile-Leu-Glu-Pro-Ser-Ile-Pro) em gp46 e 397 a 406 (Gln-Glu-Gln-Cys-Arg-Phe-Pro-Asn-Ile-Thr) em gp21, foram capazes de inibir a formação de sincício induzido pela infecção pelo HTLV-1, sugerindo se tratar de dois domínios funcionais envolvidos na função do envelope viral.

Rosenbeg e cols. (1998), por sua vez, ao estudar características conservativas das glicoproteínas do envelope, identificaram outros dois domínios imunodominantes em gp46: o primeiro se situa entre os aminoácidos 75 e 101 e o segundo, na região mais central da proteína,

compreendendo os aminoácidos 181 a 208. Desta forma, uma única troca de aminoácido no resíduo 197 (Aspartato) reduziria drasticamente a fusão celular, de forma semelhante, mutações localizadas na região N-terminal (em torno do aminoácido 90) da gp46 podem dificultar diretamente a formação de sincício e a entrada do vírus na célula hospedeira.

Alguns dos domínios funcionais, já identificados no envelope do HTLV-1, foram inclusive caracterizados como sendo conservados dentro do gênero Deltaretrovírus. A referida organização funcional de Env inclui um domínio de ligação ao receptor (*Receptor Binding Domain-RBD*) na extremidade N-terminal, seguido de uma região rica no aminoácido Prolina, e um domínio carboxi-terminal que abriga *motifs* altamente conservados (Ex. CXXC) (MANEL *et al.*, 2004).

Enfim, desde as primeiras caracterizações funcionais da gp46, por Sagara e cols. (1996) Rosenberg e cols. (1998), outros domínios foram identificados nesta glicoproteína, domínios esses associados principalmente à função da mesma em relação à sensibilização do sistema imune e reconhecimento do receptor na superfície da célula alvo (**Tabela 1**). A identificação destes domínios, bem como uma investigação mais profunda sobre eles podem ser muito úteis para traçar um mapa funcional da gp46, que relacione inclusive regiões críticas para o sucesso da infecção e, conseqüentemente, para o desenho de uma vacina, e regiões que associadas à expansão viral, estejam também associadas à manifestação de doença.

Quanto à gp21, a grande maioria dos domínios já identificados se relaciona à estrutura da proteína, que diferente da gp46, já foi cristalizada (KOBÉ *et al.*, 1999). Entre tais domínios, é importante destacar a caracterização, em seu domínio extracelular, de duas regiões funcionalmente distintas localizadas na porção N-terminal que inclui motivos estruturais, *leucine zipper-like*, que se relacionam com a fusão entre membranas e com a transmissão célula-célula. Além disso, já é sabido que os aminoácidos entre os sítios 300-331, do polipeptídeo, constituem o peptídeo fusão, enquanto que os vinte aminoácidos que sucedem a posição 444 constituem o domínio transmembrana seguido pelo domínio citoplasmático que culmina no aminoácido 481 (**Figura 4**) (LAMB *et al.*, 2008).

Tabela 1- Descrição de domínios funcionais previamente identificados na gp46, e sua localização na proteína.

DOMÍNIO/SÍTIO	DESCRIÇÃO	REFERÊNCIA
75-101aa	Domínio funcional	Rosenberg <i>et al.</i> , 1998
181-208aa	Domínio funcional	Rosenberg <i>et al.</i> , 1998
197aa	Sítio no qual, mutações estão associadas à diminuição da fusão celular.	Rosenberg <i>et al.</i> , 1998
90aa	Mutações em torno deste aminoácido dificultam o sincício e a entrada do vírus na célula alvo.	Rosenberg <i>et al.</i> , 1998
I173V e A187T	Mutações associadas à indução de anticorpos neutralizantes.	Blanchard <i>et al.</i> , 1999
53-75aa	Região caracterizada pela prevalência de epítomos lineares.	Tallet <i>et al.</i> , 2001
86-107aa	Região caracterizada pela prevalência de epítomos lineares.	Tallet <i>et al.</i> , 2001
175-209aa	Região caracterizada pela prevalência de epítomos lineares.	Tallet <i>et al.</i> , 2001
288-317aa	Região caracterizada pela prevalência de epítomos lineares.	Tallet <i>et al.</i> , 2001
90-94aa	Aminoácidos associados à interação com neurofilina 1.	Lambert <i>et al.</i> , 2009
290-312aa	Região importante para a ligação com heparan-sulfato.	Ghez <i>et al.</i> , 2010
25-190aa	Domínio de ligação ao receptor	Ghez <i>et al.</i> , 2010 e Kuo <i>et al.</i> , 2011
Y114	Sítio crítico para interação da gp46 com o sexto <i>loop</i> extracelular de GLUT-1.	Ghez <i>et al.</i> , 2010
80-83aa	<i>Motif</i> (YSLY) de endereçamento da gp46 para a membrana plasmática.	Ilinskaya <i>et al.</i> , 2010

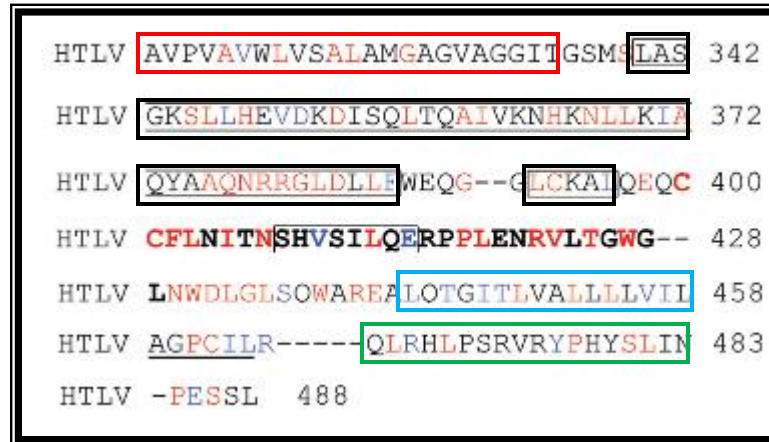


Figura 4-Estrutura da gp21: domínios estruturais e funcionais (Adaptado de LAMB *et al.*, 2008). Caixa vermelha: peptídeo fusão; Caixa preta: domínio estrutural (*Coiled-coil*); Caixa azul: domínio transmembrana; Caixa verde: domínio citoplasmático.

1.3.3 Genes Regulatórios e seus produtos

As proteínas regulatórias Tax (ORF-IV) e Rex (ORF-III), por sua vez, são codificadas pela transcrição do gene *pX*, e têm função importante na dinâmica viral, de modo que cabe à proteína Tax a ativação de genes celulares que codificam fatores de transcrição, como NF- κ B, fatores ligantes dos elementos responsivos ao cAMP, IL-2 e receptor de IL-2. Além disso, Tax abriga epítomos (11-19aa) importantes que fazem dela um alvo antigênico dominante no reconhecimento por linfócitos T citotóxicos na maioria dos indivíduos.

Além de regular a expressão de genes virais, tax interage com fatores de transcrição celulares (CREB/ATF, NF- κ B e SRF) e moléculas de sinalização para estimular ou reprimir a expressão de genes celulares. Esta proteína viral também induz o aumento da expressão de várias citocinas e seus receptores, envolvidos no crescimento e na proliferação de células T, fatores de transcrição, como HIF-1 (*Hypoxia Induction Factor 1*), e proto-oncogenes. Além dessa atividade transativadora, Tax é capaz de reprimir a expressão ou inativar um conjunto de genes celulares que atuam como inibidores do crescimento celular, podendo inibir o reparo do DNA e os eventos de morte celular programada (MATSUOKA, 2005).

A proteína Rex, por sua vez, responde pela regulação dos níveis de expressão das proteínas virais, funcionando, portanto, como um modulador da transcrição da fase inicial até a fase produtiva no ciclo de replicação viral.

Além das proteínas Tax e Rex, o gene pX codifica, através de diferentes ORFs (I e II), e portanto, diferentes formas alternativas de mRNA (**Figura 2**) outras três proteínas acessórias: p12, p13 e p30. Tais proteínas contribuem com a infectividade viral, manutenção de altas cargas provirais, ativação e regulação da transcrição gênica (MICHAEL *et al.*, 2004). A ORF-I é responsável pela síntese da proteína p12 que pode sofrer proteólise na extremidade aminoterminal e gerar a proteína p8, enquanto as proteínas p13 e p30 são resultado do *splicing* alternativo da ORF-II. A primeira clivagem proteolítica, sofrida por p12 na extremidade aminoterminal, remove o sinal de retenção do retículo endoplasmático (RE), enquanto a segunda clivagem gera a proteína p8. Deste modo, p12 localiza-se no sistema celular de endomembranas, particularmente, no RE e complexo de Golgi, enquanto que p8 é dirigida para as balsas lipídicas da membrana celular e é recrutada para a sinapse imunológica através da ligação com o receptor de célula T (TCR) (DING *et al.*, 2001; FUKUMOTO *et al.*, 2009; KORALNIK *et al.*, 1993).

Através da depleção dos estoques de cálcio do RE e do aumento de cálcio citoplasmático (**Figura 5**), p12 modula processos de proliferação de células T e replicação viral, além de ativação de fatores nucleares de ativação de células T (NFAT), que é dependente da ativação por proteínas cálcio-dependente (KIM *et al.*, 2003). É sabido ainda que p12 liga-se às cadeias pesadas recém sintetizadas do complexo de histocompatibilidade principal MHC-I (*Major Histocompatibility Complex, class I*) prevenindo sua associação com a β_2 -microglobulina, o que conduz tais cadeias à degradação pelo proteassoma, diminuindo sua expressão (**Figura 5**) (EDWARDS *et al.*, 2011; JOHNSON *et al.*, 2001). A consequente diminuição da expressão de moléculas de MHC-I previne a apresentação de peptídeos imunogênicos, e, portanto, poderia relacionar a atuação de p12 à persistência viral.

Duas formas de p12 têm sido identificadas, sendo uma com um resíduo de lisina na posição 88, e esta é comumente encontrada em indivíduos TSP/HAM, enquanto que a segunda variante da proteína abriga um resíduo de arginina nesta mesma posição e é encontrada em isolados de indivíduos ATL e carreadores assintomáticos. O alelo R88 (Arginina) da proteína confere maior estabilidade que o alelo K88 (Lisina), que é ubiquitinado e, portanto, rapidamente degradado pelo proteassoma (TROVATO *et al.*, 1999).

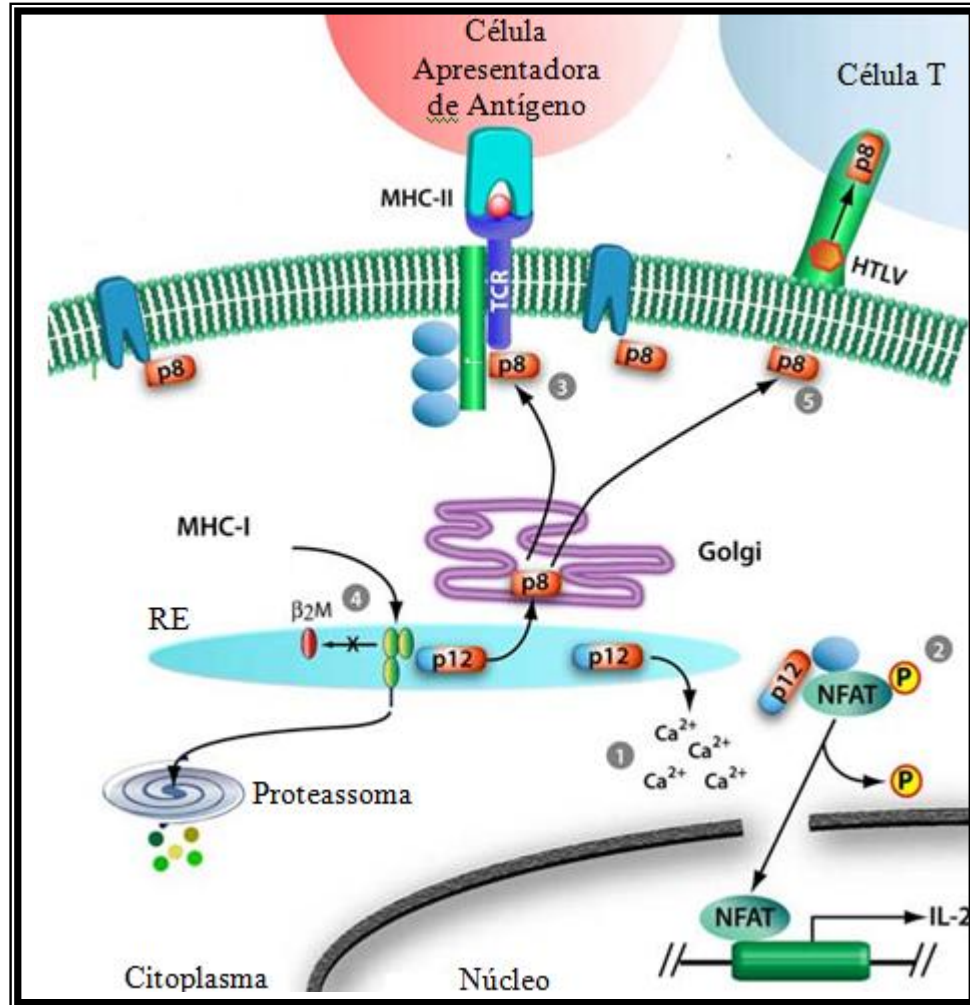


Figura 5-Esquema ilustrativo e resumo de funções atribuídas à proteína p12 (Adaptado de EDWARDS *et al.*, 2011). MHC-I (*Major Histocompatibility Complex, class I*), MHC-II (*Major Histocompatibility Complex, class II*), TCR (*T-cell receptor*), RE (Retículo Endoplasmático), NFAT (*Nuclear Factor of Activation of T-cell*), IL-2 (Interleucina do tipo 2), P (Indica eventos de fosforilação).

A proteína p30 localiza-se no núcleo e nucléolo sugerindo que sua função relacione-se com a mediação de processos como progressão do ciclo celular, reparo do DNA e exportação de moléculas de mRNA (BOISVERT *et al.*, 2007). Além disso, p30 se liga especificamente às moléculas de mRNA, duplamente processado, Tax/Rex retendo-os no núcleo, favorecendo a propagação silenciosa dos genomas provirais do HTLV-1 por divisão celular através da expansão clonal de células infectadas (NICOT *et al.*, 2004). Por fim, estudos conduzidos em modelos

animais (coelhos) mostraram a reversão de clones do HTLV-1, sem p30, para clones expressando a proteína, sugerindo a importância desta na persistência do vírus (SILVERMAN *et al.*, 2004).

Recentemente, foi identificado o gene HBZ (*HTLV-1 bZIP factor gene*) codificado pela fita complementar negativa na região 3'LTR do HTLV-1. Dois transcritos são gerados na codificação do HBZ: o *spliced* (sHBZ) e o *unspliced* (usHBZ) (**Figura 6**) (MATSUOKA; GREEN, 2009). O transcrito sHBZ tem sítio transcricional de iniciação na região 3'LTR, enquanto que o transcrito usHBZ se inicia no gene pX.

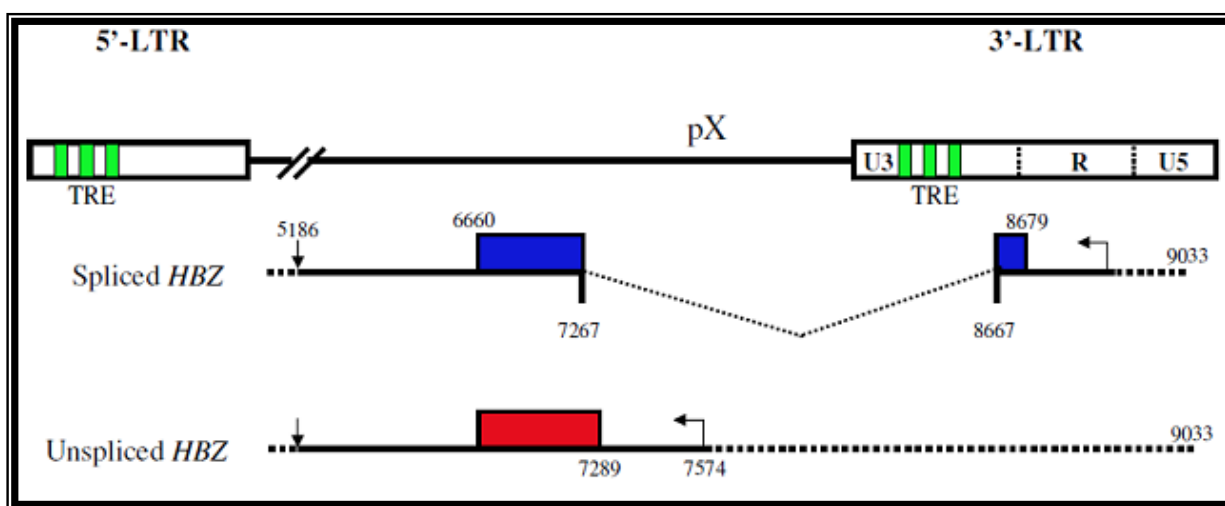


Figura 6-Transcritos gerados para a codificação do HBZ (Adaptado de MATSUOKA; GREEN, 2009). LTR (*Long Terminal Repeat*), pX (Gene regulatório), TRE (*Transcription Response Element*).

A expressão do transcrito sHBZ foi detectada não somente em indivíduos ATL, mas também em carreadores assintomáticos, aparentemente relacionado à carga proviral (SATOU *et al.*, 2006). Ainda mais contundentes são os achados que revelam correlação entre os níveis dos transcritos do HBZ e a gravidade da manifestação da TSP/HAM (SAITO *et al.*, 2009).

Tem sido demonstrado que o HBZ pode agir através de duas formas funcionais: ele pode agir tanto em sua forma de proteína não estrutural, como em sua forma de RNA. O HBZ, em sua forma de RNA, promove a proliferação celular através da regulação positiva de uma classe de fatores de transcrição (E2F1) importantes para a regulação do ciclo celular. Já a forma protéica do HBZ, suprime a transcrição viral mediada por Tax através da competição direta com esta pelo recrutamento de CREB ou CBP/p300, através do domínio de ativação (AD), um exemplo de

domínio regulatório específico para as funções exercidas por ele (**Figura 7**) (BASBOUS *et al.*, 2003; SATOU; MATSUOKA, 2010; THEBAULT *et al.*, 2004). Também já é sabido que o HBZ interage diretamente com c-Jun ou Jun-B, ou maximiza sua degradação, função mediada pelo domínio LZD, o que resulta na supressão da transcrição viral mediada por Tax, iniciada a partir da região LTR (MATSUOKA, 2005).

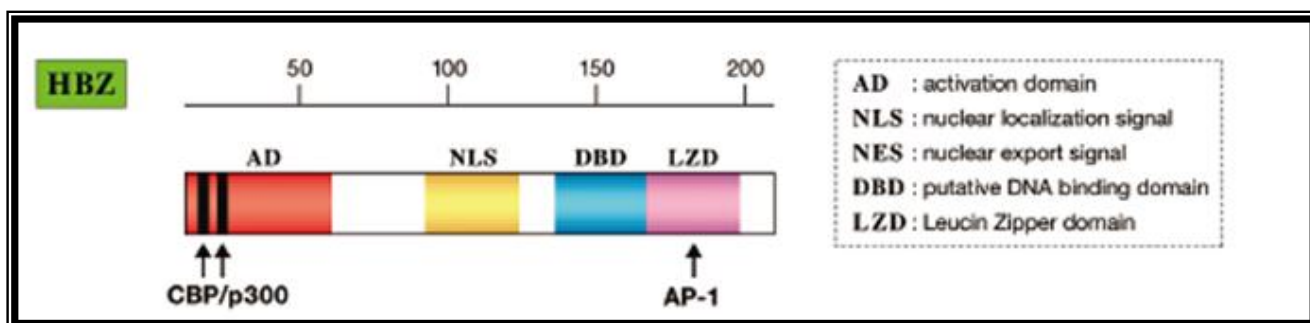


Figura 7-Esquema ilustrativo de domínios funcionais na estrutura do HBZ (Adaptado de SATOU; MATSUOKA, 2010).

Desta forma, experimentos conduzidos em modelos animais, utilizando clones mutantes do HTLV-1 forneceram evidências de que proteínas acessórias p12, p30, p13 e HBZ contribuem para a persistência da infecção *in vivo*, através do efeito direto dos produtos gênicos na replicação viral e na proliferação de células infectadas (MATSUOKA; JEANG, 2007).

1.4 Ciclo de Replicação Viral

1.4.1 Complexo Receptor

O entendimento de como se processa o reconhecimento, e conseqüentemente, a replicação viral passa pelo conhecimento de quais são os tipos celulares infectados pelo HTLV-1. Neste aspecto, embora os principais alvos sejam as células T CD4⁺ (RICHARDSON *et al.*, 1990), o vírus também tem sido encontrado, *in vivo*, em outros tipos celulares, a exemplo de células T CD8⁺ (HANON *et al.*, 2000), monócitos e células B (KOYANAGI *et al.*, 1993), macrófagos (NATH *et al.*, 2003), células dendríticas (KNIGHT *et al.*, 1993) e endoteliais (SETOYAMA *et al.*, 1998).

A primeira etapa do ciclo de replicação é o reconhecimento e conseqüente interação do vírus com a célula hospedeira, interação que ocorre entre o domínio de ligação do receptor, na glicoproteína de superfície do vírus, e o complexo receptor na superfície da célula hospedeira. O referido complexo receptor, mesmo que ainda não elucidado completamente, já evidencia algumas propriedades importantes. Uma propriedade seria o fato de que o complexo receptor não estaria constitutivamente expresso na superfície de células T CD4⁺ até a ativação delas, quando este apresentaria sua expressão aumentada (MANEL *et al.*, 2003; NATH *et al.*, 2003). Diante disto, uma segunda propriedade já pode ser relacionada, que é o fato de que uma das moléculas componentes de tal complexo deveria ser um membro da sinapse imune, o que o associa à resposta positiva após exposição ao TGF- β (JONES *et al.*, 2005). Sendo assim, tal propriedade se constituiria uma estratégia do vírus para maximizar sua infectividade, já que células T CD4⁺ infectadas pelo HTLV-1 são altamente secretoras de TGF- β (MORIUCHI; MORIUCHI, 2002).

Atualmente, diferente do proposto inicialmente, sabe-se da participação de pelo menos três moléculas distintas na entrada do vírus na célula: GLUT-1, que é um transportador de glicose, na superfície da membrana celular (BATTINI *et al.*, 2003; COSKUN; SUTTON, 2005; MANEL *et al.*, 2004); neurofilina-1 (NRP-1), que é uma glicoproteína de membrana (GHEZ *et al.*, 2006); e heparan sulfato, que é um proteoglicano (HSPG) presente na superfície da célula (PINON *et al.*, 2003).

A primeira molécula a ter função relacionada à entrada do vírus na célula foi o transportador de glicose, GLUT-1. GLUT-1 preenchia todas as propriedades pré-estabelecidas como sendo características de um receptor para o HTLV-1, como interação com o RBD na gp46, e aumento da expressão em células alvo do vírus. No entanto, alguns achados mais recentes, como o de que linhagens celulares do tipo U87 (Glioblastoma), cuja expressão de GLUT-1 é muito baixa, são facilmente infectadas por HTLV pseudovírus sugerem a participação de mais de uma molécula, além de GLUT-1 (JIN *et al.*, 2006; 2009). O mesmo sugerem os resultados de ensaios com uso de anticorpo com função de bloquear as moléculas de GLUT-1, que, entretanto, não tiveram efeito no nível de infecção com HTLV pseudovírus (JIN *et al.*, 2009).

Neste contexto, emerge o papel das moléculas de heparan sulfato presentes na matriz extracelular, já que a remoção enzimática destas moléculas da membrana plasmática diminui a ligação com a gp46, bem como a formação do sincício e a infecção por pseudovírus (PINON *et al.*, 2003). Achados semelhantes foram encontrados mais tardiamente, em células T CD4⁺, com

significativa redução da infecção pelo HTLV-1 pela remoção dos HSPG (JONES *et al.*, 2005; LAMBERT *et al.*, 2009).

Além de GLUT-1 e moléculas de HSPG, a neurofilina-1 também tem potencial na formação deste complexo receptor, e é principalmente expressa em células T e células dendríticas, além de células endoteliais. A relação desta glicoproteína com a infecção pelo HTLV-1 diz respeito ao seu papel no rearranjo do citoesqueleto, fenômeno essencial aos eventos tardios da infecção pelo vírus. Adicionalmente, foi possível demonstrar a interação entre a neurofilina 1 e a gp26 do HTLV-1 e HTLV-2, interação que parece ser funcionalmente importante já que a neurofilina 1 aumenta a formação de sincício e os títulos de anticorpos contra HTLV-1 e 2 pseudovírus (GHEZ *et al.*, 2006; 2010). Por fim, também já foi possível observar interação entre GLUT-1 e NRP-1 formando complexos citoplasmáticos em células transfectadas, interação esta aumentada na presença de Env (GHEZ *et al.*, 2006).

Deste modo, muito mais que uma molécula receptora, acredita-se que seja necessário um complexo receptor na superfície da célula hospedeira, para o sucesso da infecção pelo HTLV-1. O princípio da existência deste complexo receptor se baseia na cooperação entre as moléculas para que a infecção ocorra. Tal cooperação pode ser exemplificada pelos ensaios realizados por Jin e cols. (2009) que revelaram que a infecção pelo vírus só pode ser inibida se houver bloqueio da NRP e de GLUT-1 e, além disso, das interações entre eles.

1.4.2 Mecanismos de infecção

Apesar na nova proposta de receptor admitir um complexo multi fatorial, as fases continuam as mesmas: reconhecimento, ligação e fusão. A mais recente concepção de reconhecimento e ligação do HTLV-1 às células hospedeiras envolve os seguintes passos (**Figura 8**): ligação da gp46 às moléculas de HSPG na superfície da célula, e como as moléculas HSPG tem afinidade de ligação com moléculas NRP-1, a ligação prévia da gp46 à aquelas moléculas aumenta a probabilidade de ligação da gp46 à molécula de NRP-1; em seguida, há a formação do complexo gp46/HSPG/NRP-1 que possibilita a exposição dos domínios de ligação em GLUT-1; finalmente gp46 liga-se à GLUT-1 disparando o processo de fusão das membranas celular e viral, permitindo a entrada do vírus na célula, fusão que envolve também modificações conformacionais na glicoproteína transmembrana (gp21) (JONES *et al.*, 2011).

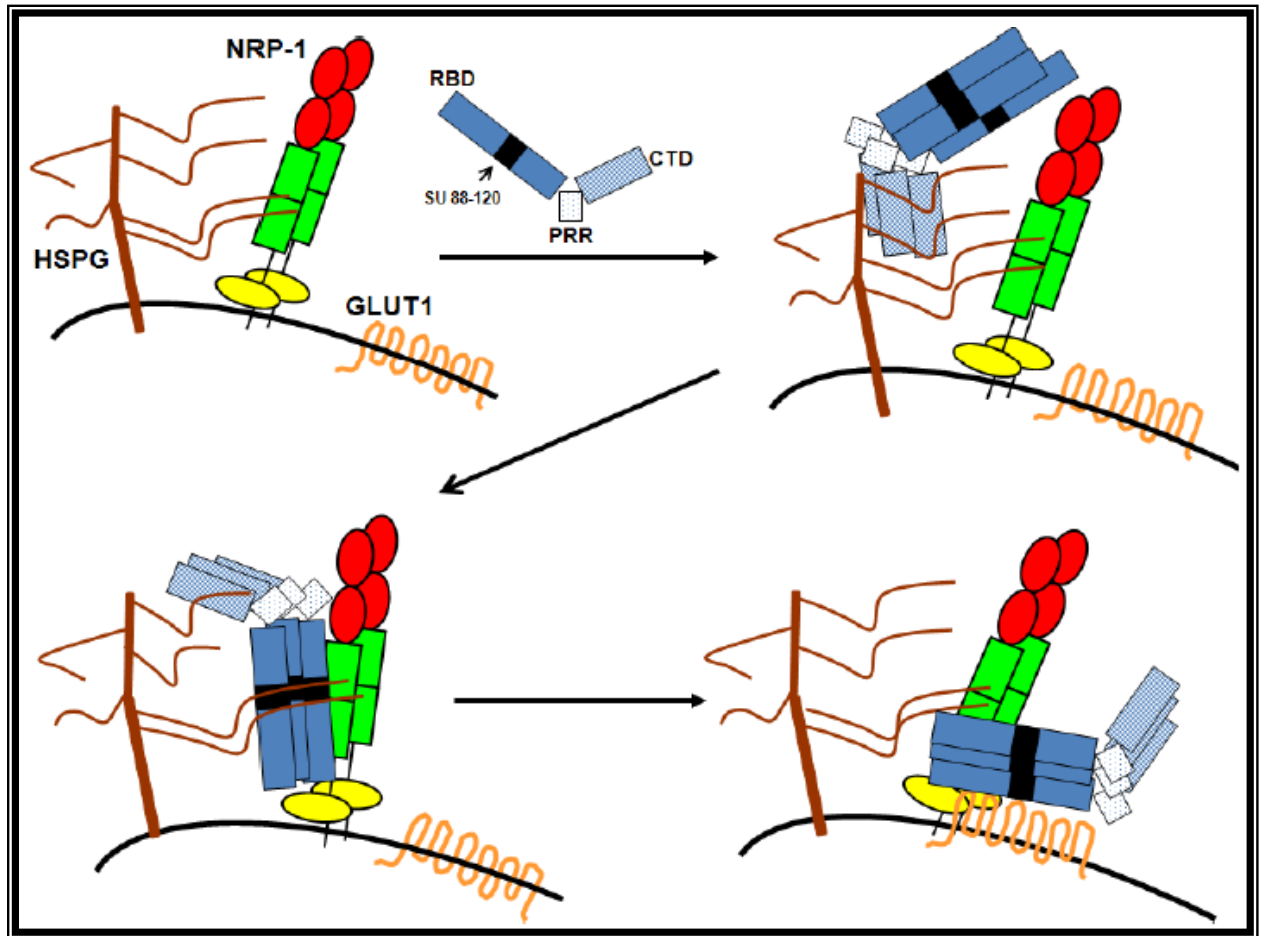


Figura 8-Esquema ilustrativo das etapas de reconhecimento e ligação do HTLV-1 com o complexo receptor na superfície da célula hospedeira (Adaptado JONES *et al.*, 2011). RBD (*Receptor Binding Domain*), PRR (*Proline Rich Region*), CTD (*Cytoplasmatic Domain*), NRP-1 (*Neurophilin 1*), HSPG (*Heparan Sulfate Proteoglicans*), GLUT-1 (*Translocador de glucose*).

Após a fusão das membranas e conseqüente internalização do material genético, ocorrerá a transcrição do genoma viral de RNA para DNA, pela enzima TR que ocorrerá dentro do cerne viral usando como oligonucleotídeo iniciador o tRNA^{Pro}, que será, tardiamente, degradado pela RNAseH. Subseqüentemente, o DNA viral entra no núcleo, e é inserido no genoma da célula hospedeira formando o provírus, função exercida pela integrase viral. O processo de integração do provírus marca o final da fase precoce do ciclo de multiplicação do vírus e inicia a fase tardia que é mediada por enzimas do hospedeiro (SEIKI *et al.*, 1984). Nesta última etapa, ocorre a síntese do RNA viral tendo como DNA molde o provírus integrado. A síntese do RNA viral leva

à formação de um longo transcrito primário, que é processado para formar as moléculas de mRNA e RNA genômico, de forma que as proteínas virais são, então, traduzidas nos ribossomos celulares e em seguida seguem para maturação.

Em modelos clássicos de replicação dos retrovírus, as proteínas recém sintetizadas são montadas em novas partículas virais infectivas, que brotam da superfície celular para reiniciar o ciclo em outra célula hospedeira.

No entanto, ensaios funcionais disponíveis, até agora, sugerem que o HTLV-1 é pouco replicativo e que a replicação viral *in vivo* ocorre, principalmente, devido à expansão clonal das células infectadas, via mitose (CIMARELLI *et al.*, 1996; WATTEL *et al.*, 1995). Além disso, o vírus induz eventos de polarização das células facilitando a passagem viral, num fenômeno conhecido como sinapse viral (BANGHAM, 2003). Quando uma célula infectada entra em contato com outra célula, porém, não infectada, há a formação de um centro de organização microtubular (MTOC-*Microtubule-organizing center*) que é polarizado na junção célula-célula, formando a interface onde ocorrerá a sinapse virológica (**Figura 9**). A formação desta estrutura permite o acúmulo de proteínas de *gag* e de material genômico (RNA), na interface da sinapse, culminado com a passagem desse material para a célula não infectada (MATSUOKA; JEANG, 2007; MAJOROVITS *et al.*, 2008). Manel e cols. (2005) demonstraram, inclusive, que nestas áreas de “sinapse viral” há um acúmulo de moléculas de GLUT 1, conhecidas por seu papel no reconhecimento celular. É possível identificar também o papel das moléculas de HSPG, na retenção do material genômico do vírus próximo à matriz extracelular de uma célula infectada, facilitando a sinapse virológica (GHEZ *et al.*, 2010).

No entanto, a reorganização do citoesqueleto com consequente formação de um centro de organização microtubular, para a sinapse virológica, parece não ser o único evento de dispersão do HTLV-1 em um organismo infectado. Recentemente, foi possível identificar a formação de modelos virais extracelulares de biofilmes, estruturas formadas por altas concentrações de vírions, moléculas de carboidratos da matriz extracelular e proteínas de adesão a exemplo das lecitinas (**Figura 9**) (NEJMEDDINE; BANGHAM, 2010; PAIS-CORREIA *et al.*, 2010). Tais estruturas facilitariam a dispersão de partículas virais para uma célula não infectada, pela alta concentração destas na superfície de uma célula infectada.

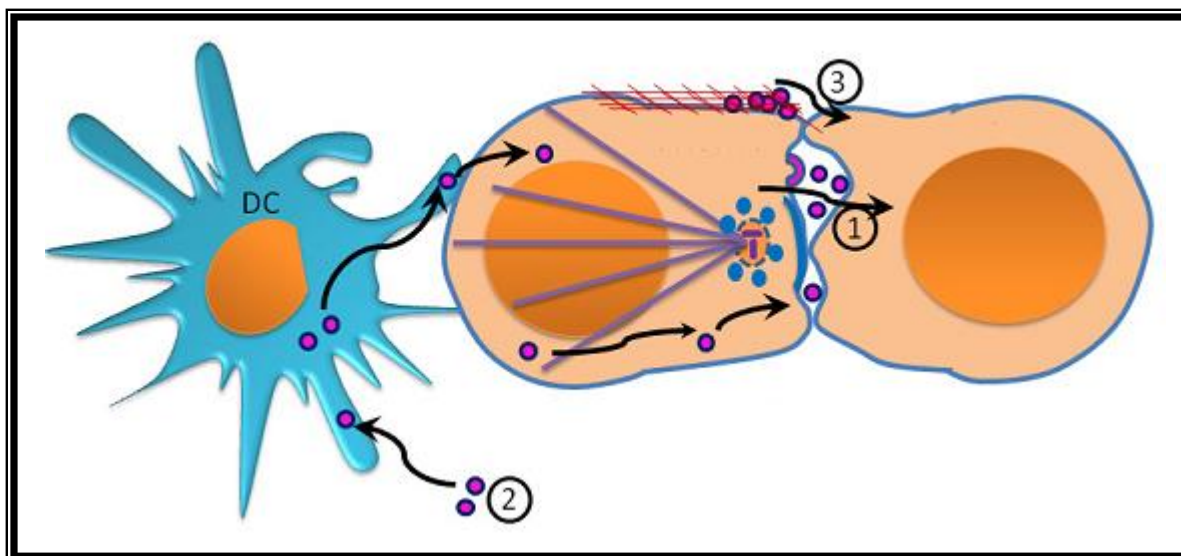


Figura 9-Esquema ilustrativo das principais vias de dispersão do HTLV-1 (Adaptado de NEJMEDDINE; BANGHAM, 2010). DC (*Dendritic cells*), 1- Indica a infecção pelo mecanismo de sinapse virológica, 2- Indica a infecção pelo mecanismo clássico de infecção, 3- Indica a infecção facilitada por mecanismos de formação de biofilmes na superfície da célula infectada.

1.5 Epidemiologia da Infecção

1.5.1 Vias de Transmissão

A transmissão do HTLV-1 ocorre, principalmente, por duas vias: horizontal ou vertical. A transmissão horizontal pode acontecer pelo contato sexual, sendo a ocorrência mais freqüente do homem para a mulher; ou pela transmissão parenteral, ocorrendo através da transfusão de sangue contaminado e seus produtos, bem como do uso de seringas, ou perfuro cortantes contaminados. A via de transmissão vertical (da mãe para o filho) é caracterizada, principalmente, pela amamentação, ou ainda por transmissão transplacentária, ou durante o parto (CARNEIRO-PROIETTI *et al.*, 2002). A transmissão do HTLV-1 é menos eficiente que a do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), devido à baixa carga proviral e ao fato de a infecção ser dependente do contato célula/célula (BANGHAM, 2003).

No entanto, não se pode descartar a influência que a rota de transmissão pode ter no desenvolvimento da resposta imune antiviral, e conseqüentemente no desenvolvimento de

doenças associadas, como é o caso da ATL que tem sido associada à transmissão vertical. Desenhos experimentais utilizando modelos murinos, relatam que a falta de resposta imune, avaliada através da produção de anticorpos, associada à intensa resposta linfo-proliferativa e à possível transformação de células infectadas, na mucosa oral, poderia explicar o desenvolvimento de ATL em indivíduos verticalmente infectados (YASUNAGA; MATSUOKA, 2007).

1.5.2 Distribuição Mundial do HTLV-1

Em quase 30 anos desde o isolamento do vírus, as taxas de prevalência da infecção se relacionam, de forma crescente, com características geográficas, composição sócio-demográfica, e comportamentos individuais de risco (GALVÃO-CASTRO *et al.*, 1997).

Dados epidemiológicos mostram que a infecção pelo HTLV-1 tem distribuição mundial (DE THE & KAZANJI, 1996), no entanto, algumas regiões são consideradas áreas endêmicas: sudoeste do Japão (MUELLER *et al.*, 1996; YAMAGUCHI, 1994), países no Caribe, (HANCHARD *et al.*, 1990), na África sub-Saara (GESSAIN & DE THE, 1996) e áreas localizadas no Irã e Melanésia (MUELLER, 1991). Taxas de prevalência, mais baixas, são encontradas em países da América do Sul, como no Brasil onde se estima que 2,5 milhões de indivíduos estejam infectados pelo HTLV-1 (**Figura 10**) (CARNEIRO-PROIETTI *et al.*, 2002; CATALAN-SOARES *et al.*, 2004). A partir da análise desses dados de distribuição do HTLV-1 em áreas endêmicas, é possível identificar aspectos, a exemplo da existência de regiões com alta prevalência da infecção circundadas por áreas de baixa ou média prevalência. De modo ainda que as referidas áreas, de maior prevalência, apresentam a mesma tendência na distribuição em latitude. Análises filogenéticas, traçando as possíveis rotas de transmissão podem explicar a formação desses aglomerados da infecção pelo HTLV-1 (GONÇALVES *et al.*, 2010).

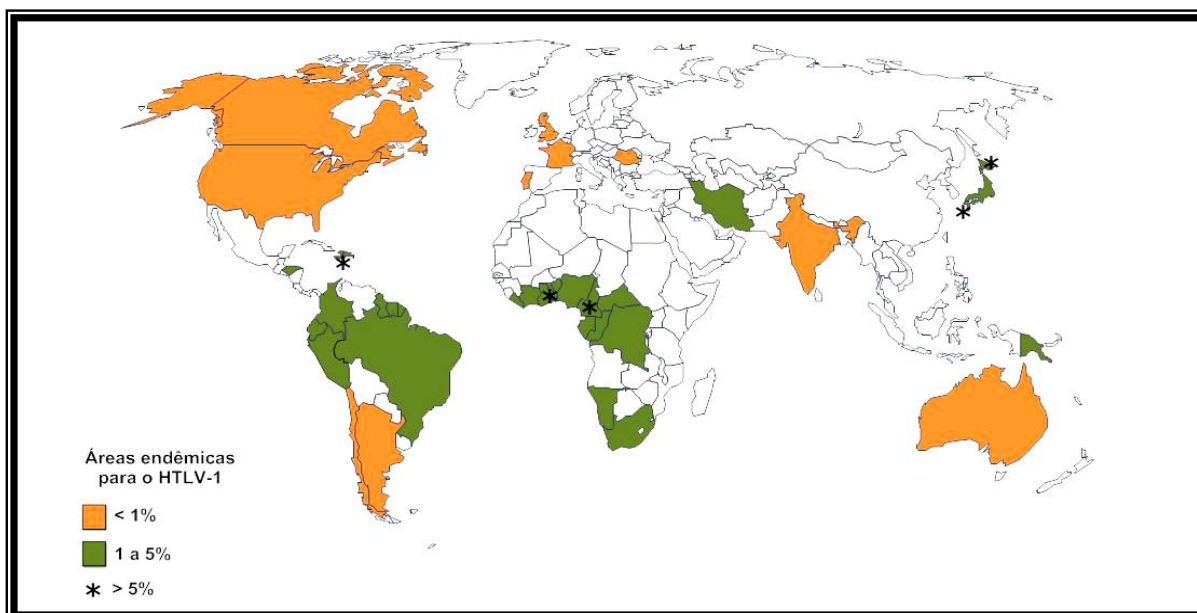


Figura 10-Distribuição do HTLV-1 no mundo (Adaptado de PROIETTI *et al.*, 2005).

1.5.3 HTLV-1 no Brasil

No Brasil, apesar dos dados epidemiológicos serem relativamente escassos, já que, em sua maioria, são restritos quase que exclusivamente à descrição da prevalência em populações específicas, também se pode observar o fenômeno de distribuição heterogênea do vírus, sendo as maiores prevalências observadas nos estados do Maranhão (São Luis- 10.0/1000 doadores de sangue), Bahia (Salvador-1,8% na população geral, ou 9.4/1000 doadores de sangue), Pará (Belém-9.1/1000 doadores de sangue) e Pernambuco (Recife-7.5/1000 doadores de sangue) (**Figura 11**) (CATALAN-SOARES *et al.*, 2005; DOURADO *et al.*, 2003).

Estudo recente, particularmente no estado de Minas Gerais, identificou redução na prevalência da infecção pelo HTLV-1/2 em doadores de sangue. Os autores, no entanto, ressaltam que este achado pode ser explicado pela redução da prevalência da infecção na população geral e que, portanto, está refletindo na população doadora (DIAS-BASTOS *et al.*, 2010).



Figura 11-Prevalência de HTLV-1/2 entre doadores de sangue em capitais de 26 estados brasileiros e no Distrito Federal (Adaptado de CATALAN-SOARES *et al.*, 2004).

A infecção pelo HTLV-1 é endêmica e largamente distribuída entre grupos indígenas e afro-descendentes em países da América do Norte, América Central e América do Sul. No Brasil, diversos grupos indígenas estão distribuídos por oito estados, que ocupam toda extensão da região amazônica (ISHAK *et al.*, 2003). Estudos epidemiológicos evidenciam que a região amazônica é uma extensa área endêmica para a ocorrência do HTLV-2 (ISHAK *et al.*, 1995) e mais recentemente, foi possível identificar a presença de HTLV-1 em tribos Wayampí (SHINDO *et al.*, 2002). Estudos de epidemiologia molecular de cepas virais demonstram a estreita relação filogenética entre isolados de HTLV-1 da América Latina e de isolados da África do Sul, quando comparado com isolados do oeste da África, dados que refletem a intensa entrada de sul-africanos no Brasil, durante o tráfico de escravos, entre os séculos XIV a XIX, e a maior prevalência do vírus em população afro-descendente no Brasil (DOURADO *et al.*, 2003; MOTA *et al.*, 2007).

1.5.4 Epidemiologia Molecular e Origem Geográfica

A endemicidade do HTLV-1 e HTLV-2, em algumas populações vivendo em áreas remotas do globo, sugerem a possibilidade desses vírus terem infectado populações humanas desde milhares de anos atrás. Através da análise de DNA mitocondrial, estima-se que a separação entre as populações humanas africanas e não-africanas tenha ocorrido há cerca de 75.000-287.000 anos (CAVALLI-SFORZA *et al.*, 1994; REICH & GOLDSTEIN, 1998), e várias observações mostraram que este fluxo gênico ocorreu normalmente dos pigmeus para as populações vizinhas (CAVALLI-SFORZA *et al.*, 1994). Baseado nessas evidências pode-se inferir que as infecções pelo HTLV-1 e HTLV-2 entre os pigmeus são as mais antigas ou resultou de transmissões interespecíes, mais recentes, a partir do STLV. Transmissões interespecíes freqüentes do STLV-1 de símios para humanos já foram demonstradas na África (LIU *et al.*, 1996; MAHIEUX *et al.*, 1998; SALEMI *et al.*, 1998; VANDAMME *et al.*, 1994).

Estudos genéticos e suas contribuições indicam pelo menos duas hipóteses para dar suporte à origem do HTLV-1 na América. A primeira hipótese é a Pré-Colombiana, baseada na migração de populações oriundas do norte da Ásia, através do Estreito de Bering, há cerca de 15.000-35.000 anos atrás (BIGGAR *et al.*, 1996; LAIRMORE *et al.*, 1990; NEEL *et al.*, 1994). A segunda, Pós-Colombiana, especula que o HTLV-1 tenha sido disseminado da África para o Novo Mundo e até para o Japão, durante o tráfico de escravos, no período compreendido entre os séculos XVI a XIX (MIURA *et al.*, 1994; VAN DOOREN *et al.*, 1998; YAMASHITA *et al.*, 1999).

Durante a colonização portuguesa, entre os séculos XVI e XIX, em torno de 4 milhões de pessoas foram trazidas da África para o Brasil, como resultado do tráfico de escravos, principalmente para as regiões nordeste e sudeste. Apesar da maioria dos africanos trazidos para a Bahia, durante o tráfico de escravos, ter vindo do oeste da África, especificamente do Benin e da Nigéria, Rodrigues (1977) mostra evidências de que africanos também foram trazidos de outras regiões do sul do continente africano, atualmente conhecidas como Angola, África do Sul e Moçambique (VERGER, 1968; RODRIGUES, 1977; VIANA FILHO, 1988).

Estudos filogenéticos baseados em análises do gene *env* e da região LTR permitiram classificar o HTLV-1 em sete subtipos: HTLV-1a ou Cosmopolita (MIURA *et al.*, 1994; 1997); HTLV-1b ou Centro Africano (HAHN *et al.*, 1984; VANDAMME *et al.*, 1994); HTLV-1c ou

oriundo da Melanésia (GESSAIN *et al.*, 1992); HTLV-1d, isolado de pigmeus em Camarões e no Gabão (CHEN *et al.*, 1995; MAHIEUX *et al.*, 1997); HTLV-1e, isolado de pigmeus na República Democrática do Congo (SALEMI *et al.*, 1998); HTLV-1f, de um indivíduo do Gabão e HTLV-1g, recentemente descrito como um novo subtipo em Camarões, na África Central (WOLFE *et al.*, 2005). O subtipo Cosmopolita reúne cepas de diferentes regiões geográficas, sendo o mais disseminado no mundo, de maneira que é subdividido em 5 subgrupos, a depender de sua localização geográfica: A – Transcontinental, B – Japonês, C – Oeste Africano, D – Norte Africano e E – Negro do Peru.

Estudos de caracterização molecular do HTLV-1 demonstram a predominância do subtipo Cosmopolita em infecções no Brasil, sendo a maioria dos isolados pertencentes ao subgrupo Transcontinental (ALCANTARA *et al.*, 2003; SEGURADO *et al.*, 2002), e em menor proporção isolados que caracterizam o subgrupo Japonês (YAMASHITA *et al.*, 1999).

1.6 Principais manifestações clínicas associadas ao HTLV-1

1.6.1 TSP/HAM

A TSP/HAM caracteriza-se por uma mielopatia lentamente progressiva, tendo como consequência a paraparesia dos membros inferiores, quadro clínico que acomete indivíduos, predominantemente, na quarta e quinta décadas de vida (ROMAN & OSAME, 1988). Anormalidades sensoriais periféricas, dor lombar persistente, hiperreflexia, disfunção da bexiga e do intestino e impotência sexual são outros sinais relacionados à doença. A prevalência da TSP/HAM é de 0,25 a 3,8% em pacientes infectados pelo vírus, sendo mais prevalente em mulheres que em homens, em proporção 2:1 a 3:1 (EDWARDS *et al.*, 2011; KAPLAN *et al.*, 1990; MORENO-CARVALHO *et al.*, 1992).

Na TSP/HAM, a patogênese tem relação com a desmielinização local atribuída à do sistema nervoso central, pela célula infectada, e o desencadeamento de uma resposta inflamatória crônica. Três principais hipóteses tentam explicar a patogênese da TSP/HAM: a hipótese da citotoxicidade direta, a hipótese da autoimunidade, e, por fim, a hipótese do dano circundante (IJICHI *et al.*, 1993; JACOBSON, 2002; OSAME, 2002; LEPOUTRE *et al.*, 2009; NAGAI *et al.*, 2000; TAYLOR, 1998). A primeira pressupõe que o HTLV-1 infecta células residentes no

sistema nervoso central, como astrócitos, neurônios e oligodendrócitos, os quais apresentariam antígenos virais em sua superfície celular. Os linfócitos T citotóxicos (CTL) específicos circulantes atravessariam a barreira hematoencefálica, e encontrariam a célula infectada causando sua morte por liberação de citocinas. A segunda hipótese presume que o mimetismo molecular de autoantígenos com proteínas virais levaria a um estado de autoimunidade, a exemplo das riboproteínas nucleares, hnRNP-A1, que apresentam reatividade cruzada com anticorpos anti-Tax. Desta forma, células T CD4⁺ encontrariam este antígeno viral na periferia e ao atravessar a barreira hematoencefálica confundiriam a célula neuronal com uma célula infectada disparando uma resposta auto-imune com morte da célula da glia. Na terceira hipótese, células T CD4⁺ infectadas com o HTLV-1 e linfócitos T CD8⁺ específicos anti-HTLV migrariam através da barreira hematoencefálica, se encontrariam no sistema nervoso central e as células da glia seriam destruídas pelas citocinas liberadas pelos CTLs contra as células T CD4⁺ infectadas.

A resposta imune individual bem como a carga proviral ainda parecem determinar o prognóstico da doença, especialmente, porque ainda não há tratamento para ela. Testes já têm sido realizados, utilizando-se de corticosteróides, IFN- α e IFN- β , o que tem demonstrado resultados limitados, e ainda menos esclarecedores são os testes se utilizando da combinação de análogos de nucleosídeos (GONÇALVES *et al.*, 2010).

1.6.2 ATL

A ATL, por sua vez, é um linfoma/leucemia agressivo, associada à infecção pelo HTLV-1, que tem seu curso clínico classificado em quatro estágios: agudo, crônico, linfoma e *smouldering* (SHIMOYAMA, 1991). Além desses tipos clínicos, existe ainda outra categoria conhecida como ATL cutânea, cujas manifestações são restritas à pele, e que subseqüentemente foi subdividida em dois outros subtipos: tumoral e eritematosa (BITTENCOURT *et al.*, 2007). ATL caracteriza-se pela infiltração de células T CD4⁺ malignas nos linfonodos, baço, trato gastro-intestinal e pele, além da presença de células T anormais com núcleo lobulado ou forma de flor (MATSUOKA, 2005). A proporção de ocorrência de ATL em homens e mulheres infectados no Japão é de 6% e 2%, respectivamente, sendo o período médio entre a infecção inicial e o desfecho clínico de 60 e 40 anos para infectados no Japão e na Jamaica, respectivamente (YASUNAGA; MATSUOKA, 2007).

1.6.3 Outras Manifestações Clínicas Associadas ao HTLV-1

A dermatite infecciosa talvez seja a condição clínica melhor caracterizada na infância de um indivíduo infectado pelo HTLV-1. A média de idade para a ocorrência da dermatite é de 2 anos, sendo aparentemente mais prevalente em mulheres que em homens. Recentemente, foram identificados, em Salvador, 23 casos da manifestação (OLIVEIRA *et al.*, 2005). A dermatite caracteriza-se por um descontrole do sistema imune, prevalecendo a resposta Th1, com intensa linfoproliferação e liberação de citocinas a exemplo do TNF- α . Acredita-se que a progressão da dermatite seja a ATL ou TSP/HAM na fase adulta (LEE; SHWARTZ *et al.*, 2011). De 74 casos de ATL diagnosticados na Bahia, nos últimos anos, 44% dos casos tinham apresentado história de eczema na infância (BITTENCOURT *et al.*, 2005).

Entre as outras manifestações da infecção, se incluem as anormalidades oftalmológicas como vasculite, degeneração da retina e ceratoconjuntivite sicca e uveíte, sendo que esta última pode estar associada à TSP/HAM (MOCHIZUKI *et al.*, 1992).

1.7 Resposta Imune na Infecção pelo HTLV-1

A resposta imune em combate às infecções virais pode ser segregada em dois grandes pólos: um de natureza antígeno-inespecífica e outro de caráter antígeno-específica. No que se refere ao segundo pólo, ao entrar em contato com proteínas virais, os linfócitos B interagem com estruturas antigênicas dos vírus através dos receptores de superfície dos linfócitos. Essas moléculas são capazes de reagir internalizando os determinantes antigênicos e dando início ao processo de ativação dos linfócitos T CD4⁺. Após a interação com os antígenos virais e conseqüente maturação em plasmócitos, anticorpos são produzidos para eliminação do antígeno por neutralização ou opsonização.

Neste contexto, existem evidências do envolvimento da resposta humoral nos eventos que acompanham a evolução da infecção crônica pelo HTLV-1 (LAL *et al.*, 1993). A maioria dos anticorpos produzidos em resposta à infecção natural pelo HTLV-1 inclui aqueles direcionados contra as glicoproteínas do envelope viral: gp46 e gp21. Desta forma, os anticorpos específicos contra determinantes antigênicos do envelope viral podem inibir a formação do sincício sugerindo uma possível proteção contra o ciclo de infecção (HADLOCK *et al.*, 2002).

O HTLV-1 infecta preferencialmente células T periféricas, predominantemente linfócitos TCD4⁺ de memória (CD45RO) e, em menor frequência, linfócitos T CD8⁺, observando-se inicialmente um padrão policlonal de integração viral.

A resposta imune do hospedeiro frente à infecção viral, principalmente a resposta celular desencadeada por células T CD8⁺ específicas anti-HTLV, é reconhecida como um evento crucial, determinando o rumo da infecção. Estudos recentes têm sugerido que esta resposta celular é influenciada pela via de infecção do hospedeiro, mucosa ou sangue periférico, além de fatores genéticos individuais como polimorfismos em genes de HLA (*Human Leucocitary Antigen*) e genes envolvidos na resposta imune. A resposta antiviral através de linfócitos T citotóxicos é ativada *in vivo* e direcionada principalmente contra epítomos específicos na proteína regulatória Tax do HTLV, e em menor proporção aos epítomos em Gag, Env e Pol (ELOVAARA *et al.*, 1993; KANNAGI *et al.*, 1991; PARKER *et al.*, 1992; PIQUE *et al.*, 1996). Desta forma, dependendo do epítomo viral e dos fatores genéticos do hospedeiro, tem se estabelecido a existência de reservatórios distintos de CTL (*Cytotoxic T lymphocyte*) em resposta aos diferentes epítomos, com a mesma função de reconhecimento de células infectadas, via HLA/peptídeo, no entanto, com proliferação e liberação de citocinas diferenciadas (LIM *et al.*, 2000). Bangham e Osame (2005) demonstraram que a taxa de lise, via CTL, de células T CD4⁺ expressando Tax foi correlacionada negativamente com a carga proviral tanto em indivíduos assintomáticos como em indivíduos TSP/HAM.

A ativação das células T CD4⁺, no entanto, parece ser um evento precoce na infecção pelo HTLV-1, já que indivíduos infectados, porém assintomáticos, possuem elevado percentual de células T CD4⁺ HLA-DR⁺, não sendo esse um bom indicador de progressão clínica para TSP/HAM. Segundo Goon e cols. (2004), a resposta CD4⁺ tanto em indivíduos assintomáticos como em indivíduos TSP/HAM é direcionada preferencialmente contra as proteínas do envelope, em contraste à resposta imunodominante de linfócitos T CD8⁺ específicos contra a proteína Tax.

1.8 Diagnóstico sorológico

Partindo do pressuposto de que a maioria das proteínas virais é imunogênica e que, portanto, anticorpos são produzidos para reagir contra elas, estes são detectados no soro de

indivíduos infectados pelo HTLV, o que torna viável a existência dos testes sorológicos para diagnóstico, como *ELISA* e *Western Blot* (WB) (CONSTATINE *et al.*, 1992).

O diagnóstico sorológico da infecção pelo HTLV baseia-se na detecção de anticorpos específicos contra o vírus. Os métodos sorológicos podem ser classificados em duas categorias: os testes de triagem e os de confirmação. Os ensaios de triagem detectam anticorpos contra o HTLV-1 e HTLV-2, porém ao serem usados em população de baixo risco como doadores de sangue, o valor preditivo positivo pode ser muito baixo, sendo necessária a confirmação do resultado por meio dos ensaios confirmatórios, que detêm maior especificidade e que podem também discriminar a presença de anticorpos específicos contra o HTLV-1 e HTLV-2. Proteínas estruturais codificadas pelos genes *gag* e *env* têm importância no reconhecimento laboratorial da infecção. Os primeiros testes foram introduzidos utilizando lisado viral como única fonte antigênica, e mais recentemente, ensaios baseados em antígenos recombinantes ou peptídeos sintéticos foram introduzidos isoladamente ou em combinação com o lisado viral. O teste mais utilizado na triagem sorológica do HTLV é o ensaio imunoenzimático (*Enzyme Immuno Assay*-EIA), onde antígenos específicos são adsorvidos a uma placa de poliestireno e a reação é revelada após a incubação do soro do indivíduo a um conjugado anti-IgG humana marcado. Para a etapa de confirmação, o ensaio mais utilizado é o teste WB (LAL *et al.*, 1992), que permite distinguir a infecção pelo vírus tipo 1 ou 2, pois este teste possui antígenos específicos tanto para o HTLV-1 (MTA-1) quanto para o HTLV-2 (K-55). A Organização Mundial de Saúde (OMS) adotou um critério que inclui a reatividade para as proteínas codificadas pelo gene *gag* (p19 e p24) e para as glicoproteínas do envelope viral (gp46 e gp21), para que uma amostra seja considerada positiva. Algumas amostras podem ter resultado positivo no WB, sem diferenciação entre os tipos 1 e 2 sendo consideradas portanto, positivas mas não tipadas. Quando uma amostra reage com uma das bandas, porém não completa o critério de positividade, seu resultado é considerado indeterminado. Apesar de ser um teste confirmatório, estudos têm demonstrado que enquanto o WB pode detectar facilmente anticorpos contra produtos do gene *gag*, ele, frequentemente, falha na detecção de anticorpos contra os produtos do gene *env*. Por isso, na maioria das vezes, para que se obtenha um diagnóstico mais seguro, é necessária uma combinação de testes, agregado ao WB, o que contribui para o alto custo e para demora na conclusão do diagnóstico (LAL *et al.*, 1992).

Algumas explicações, como imunossupressão em indivíduos co-infectados HTLV-1/HIV ou HTLV-1/2, são sugeridas para entender o fenômeno da soroideterminação. Outras razões para explicar o perfil indeterminado no WB seriam a soroconversão, especialmente em populações de risco ou em áreas endêmicas, ou a infecção por cepas virais divergentes e/ou defectivas (THORSTENSSON *et al.*, 2002).

2. JUSTIFICATIVA

Os fatores que definem a manifestação de doenças relacionadas ao HTLV-1 ou a persistência do quadro assintomático ainda não foram completamente esclarecidos. Acredita-se que o desfecho da infecção possa ser influenciado pela via de transmissão do vírus, pela carga proviral, pelo tipo e magnitude da resposta imune do hospedeiro e por componentes genéticos envolvendo os alelos de HLA. Portanto, na busca por se conhecer marcadores virais que possam ser úteis no entendimento da manifestação da TSP/HAM, é importante especular e, sobretudo, investigar o papel do envelope viral e do HBZ, enquanto gene regulatório descrito recentemente.

As glicoproteínas do envelope são altamente conservadas entre os diferentes isolados do HTLV-1, no entanto, substituições nucleotídicas na região gênica que codifica para estas proteínas, podem influenciar na infectividade viral, no tropismo celular, na taxa de replicação e na latência ou resposta aos mecanismos efetores da resposta imunológica, como produção de anticorpos (SZUREK *et al.*, 1988; PAQUETTE *et al.*, 1989). A glicoproteína de superfície, gp46, apresenta uma série de domínios funcionais, a exemplo dos primeiros identificados por Sagara e cols. (1996) e Rosenberg e cols. (1998), que poderiam ser melhor investigados quanto à contribuição destes na ocorrência da TSP/HAM. Adicionalmente, dados recentes mostram que a diversidade e a frequência do reservatório de linfócitos T CD8⁺, específicos para Env, podem estar relacionados com a resposta imune exacerbada, que é verificada em indivíduos TSP/HAM (KOSAKO *et al.*, 2011).

Portanto, é importante investigar o perfil molecular das proteínas do envelope em indivíduos com diferentes perfis clínicos, bem como dar ênfase às mutações mais frequentes e suas possíveis conseqüências para a função das proteínas do envelope, a exemplo da contribuição que este tipo de investigação molecular tem dado para a elucidação de outros processos. O estudo de mutantes do envelope viral, bem como a caracterização de anticorpos neutralizantes, dirigidos contra essa proteína estão, atualmente, contribuindo com o entendimento da interação entre o envelope viral e o complexo receptor (JONES *et al.*, 2011).

Quanto à contribuição do HBZ, na patogênese da TSP/HAM, além de estudos *in vitro* demonstrarem que a expressão ectópica do HBZ resulta na diminuição da replicação viral, ensaios quantitativos revelaram um aumento em cerca de 2 vezes o log da carga proviral em modelos animais infectados com variantes do HBZ viral, ressaltando a importância da atuação do

HBZ em eventos iniciais da infecção viral e mesmo depois da persistência do vírus (COLLINS *et al.*, 1998; BARTOE *et al.*, 2000; SILVERMAN *et al.*, 2004). Portanto, a regulação da transcrição viral por HBZ, a expressão do seu mRNA, e a supressão da expressão de Tax podem ser um dos mecanismos moleculares envolvidos na latência viral, que permite a prevenção na detecção do sistema imune do indivíduo infectado. Dessa maneira, alterações no gene HBZ podem estar relacionadas com a patogênese do HTLV-1.

A maioria dos dados sobre a patogênese do vírus provém de populações não brasileiras, e não são conclusivos quanto a real contribuição dos fatores virais e do hospedeiro na manifestação de doença e na progressão dela. Além disso, uma das mais concretas motivações para o melhor entendimento da patogênese é a diferença de manifestação e progressão da HAM/TSP em diferentes indivíduos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Buscar por biomarcadores virais que permitam alcançar um melhor entendimento de diferentes perfis clínicos associados à infecção pelo HTLV-1: assintomático e TSP/HAM.

3.2 Objetivos Específicos

1. Estudar as regiões gênicas codificantes das proteínas gp46, gp21, e HBZ, do maior número possível de clones, em indivíduos assintomáticos, e definidos TSP/HAM;
2. Identificar mutações e/ou polimorfismos nestas regiões gênicas que possam contribuir com o melhor entendimento da patogênese na infecção;
3. Caracterizar as proteínas estudadas (gp46, gp21, e HBZ) quanto ao perfil físico-químico, à apresentação de epítomos alelo-específicos, assinaturas protéicas, e eventos de seleção positiva;
4. Associar a frequência das mutações encontradas com ocorrência da manifestação clínica;

4. RESULTADOS

Todos os resultados obtidos sobre a caracterização molecular das proteínas gp21 e gp46, bem como do HBZ, foram resumidos e organizados em forma de um único artigo intitulado *Molecular study of HTLV-1 Envelope (gp46 and gp21) and HBZ protein sequences from health carriers and TSP/HAM infected individuals*. O referido artigo foi submetido para publicação na *Retrovirology*, em Dezembro do presente ano, de modo que aguardamos um retorno dos revisores da revista.

4.1- CAPÍTULO I

Molecular study of HTLV-1 Envelope (gp46 and gp21) and HBZ protein sequences from health carriers and TSP/HAM infected individuals

MOTA-MIRANDA, A. C. A.^{1,2,3}; BARRETO, F. K.¹; BATISTA, E.⁴; AMARANTE, M. F. C.⁵
FARRE-VALLVE, L.⁴; CASTRO-FILHO, B. G.^{1,2}; ALCANTARA, L. C. J.^{1,2}.

- 1- *Laboratório Avançado de Saúde Pública, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia, Brasil;*
- 2- *Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, Bahia, Brasil;*
- 3- *Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Salvador, Bahia, Brasil;*
- 4- *Laboratório de Patologia Experimental, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia, Brasil;*
- 5- *National Cancer Institute, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA.*

Corresponding author:

Luiz Carlos Junior Alcantara, Ph D

LASP/CPqGM/FIOCRUZ.

Rua Waldemar Falcão 121, Brotas, Salvador, Bahia, Brazil 40295-001.

Telephone # 55 71 3176 2255

Fax # 55 71 3176 2300

E-mail: lalcan@bahia.fiocruz.br

Background

Isolated from a patient with cutaneous T-cell lymphoma in the early 1980s, HTLV-1 was the first human retrovirus [1] to be discovered. Apart from more recent inflammatory disorders associated to HTLV-1 infection, such as arthritis, uveitis, dermatitis, lymphadenitis and Sjogren's syndrome [2], HTLV-1 is classically the etiological agent of tropical spastic paraparesis/HTLV-associated myelopathy (TSP/HAM) [3]. This clinical entity is characterized, besides the spastic paraparesis, by urinary disturbances and, in almost all patients, spasticity and/or hyper-reflexia of the lower extremities [3].

The epidemiological data reveal an estimative that around 0.25%-3.8% of the infected population develops TSP/HAM [3,4,5,6]. Despite the scarcity of data on the real prevalence of TSP/HAM in the Brazilian population, the individual risk of developing the disease is of considerable importance in HTLV-1 endemic areas such as southern Japan, the Caribbean, Central and South America (including Brazil), the Middle East, Melanesia, and equatorial regions of Africa [4].

The progression to TSP/HAM includes viral factors such as proviral load, and host genetic factors such as human leukocyte antigen (HLA). Most clinical studies associate proviral load to increased risk of progression to the disease, and in some of them, the HTLV-1 proviral load progressively increases according to TSP/HAM ascertainment level (possible, probable, and definite) of De Castro-Costa diagnostic criteria [7,8]. As regards HLA, molecular data from southern Japan indicates that possession of the alleles HLA-A*02 and Cw*08 (HLA class I) is associated with a significant reduction in both HTLV-1 proviral load and the risk of TSP/HAM, whereas possession of HLA-B*5401 (HLA class I) and HLA-DRB1*0101 (HLA class II) predisposes to TSP/HAM in the same population [9,10].

Although most studies of HTLV-1 genotype have reported no association between HTLV-1 variants and risk to TSP/HAM, it is known that TSP/HAM patients generally have higher anti-HTLV-1 antibody titer than health carrier (HC) with a similar proviral load [11]. Additionally, the antibody reactivity to Tax epitopes can be different between TSP/HAM (71%-93%) and HC (27%-37%) individuals [12]. Regards to the regulatory protein genotypes, a p12 K88 allele was found mainly among TSP/HAM individuals suggesting that it could be a pathogenesis marker, however, this allele has also been found in health carrier patients [13].

The HTLV-1 envelope glycoproteins (Env) mediate the binding of the virus to its receptor on the surface of target cells and the subsequent fusion of virus and cell membranes. The HTLV-1 envelope proteins are synthesized as a precursor, and its cleavage generates a 46-kDa surface (gp46) and 21kDa transmembrane (gp21) proteins [14]. Nowadays, through characterization of neutralizing antibodies or analysis of Env mutants, it is known that gp46 contains a great number of functional and immunodominant domains that are associated to the prevalence of linear epitopes, interaction to neuropilin 1 or heparan sulfate molecules, and induction of antibodies [15-19]. The gp21 harbor motifs that direct Env trafficking, membrane targeting and virion incorporation [17]. More recent data examining the specificity of peptide inhibitors derived from the conserved C-terminal leash and α -helical region of HTLV-1 gp21 suggest that although functional domains are associated to conserved residues, different selective pressure due to the differing immunological environments of the respective hosts may display important divergence [20].

More recently, the HTLV-1 bZIP factor gene (HBZ), which is encoded in the minus strand of the HTLV-1 genome, has been shown to be consistently expressed in ATL (Adult T-cell Leukemia) cells, and in these cells, the HBZ is indispensable for the growth, survival and proliferation [21,22]. As HBZ mRNA expression in TSP/HAM patients is well correlated with

disease severity, it can play a critical role in the development of ATL and TSP/HAM [23]. Despite the clinical importance, there is no study that focuses on the molecular diversity of HBZ in individuals with different clinical status.

It is not well understood why some HTLV-1 infected people develop disease while others do not. The complex disease outcome most likely depends on an interaction between viral, immune, and host genetic factors. In this regard, the purpose of the present study is to assess the molecular diversity of gp46, gp21 and HBZ proteins in TSP/HAM and HC individuals to identify the potential molecular biomarkers and/or the therapeutic targets for TSP/HAM.

Results

Sample Characterization

Blood samples were collected from 10 HTLV-1 infected individuals recruited from the HTLV Center: 5 health carriers (HC) and 5 TSP/HAM patients. Because the progression to TSP/HAM is multifactorial and is not only dependent on viral factors, but also on the host's genetic background, we choose all individuals with similar median proviral load and age. The median HTLV-1 proviral load of HC and TSP/HAM patients was 316,227 copies/ 10^6 PBMC (Figure 1). The median of age was of 53 (38-72) and 58 (41-73) years for HC and TSP/HAM patients, respectively.

Molecular characterization of gp46

We obtained 146 gp46 clone sequences (908pb, 302aa): 70 from HC (14 clones for each individual) and 76 from TSP/HAM (15 clones for each individual) group. The HC and TSP/HAM clone sequence overall diversity was 0.4% and 0.6%, respectively, and as regards the amino acid changes, we identified five mutations with frequency over 20% within the viral clones

organized into the two groups (Figure 2). Among the five most common mutations, one of them (S35L) was exclusive to the clones from one individual of the HC group, two mutations (F14S and G72S) were exclusive to the clones of one TSP/HAM individual, a third mutation (N42H) were exclusive to clones of other different TSP/HAM individual. Because of these results it was possible to observe that the found mutations were associated to the intra-host profile. Finally only one mutation (V247I) was found in viral clones of both groups with a statistically significant difference in the frequency within the groups (Fisher Test, $p = 0.0014$). Among the five mutations found, three of them (F14S, S35L and N42H) were not found in any of the 42 Brazilian sequences used to create the consensus. G72S was found in one sequence of the *Brazilian dataset* however, we do not have information about the geographic region of that sequence. Finally, the V247I mutation was found at sequences of all different geographic regions represented in our dataset. As regards the presence of these mutations in the *Cosmopolita dataset*, it is possible to note that the mutations F14S, S35L, N42H and V247I are not present in any sequence of this data set. Only the mutation G72S was found in sequences from Gabon, Martinique, French Guyana and Guadalupe.

We used the already known gp46 functional domains to perform the search for mutations (see Supplementary Figure 1). Among the five most common mutations already described, only the mutation G72S was presented at the 53-75aa functional domain that is associated to the prevalence of linear epitopes. Regard to the overall diversity, that evaluate frequent and not frequent mutations the Receptor Binding Domain (RBD) presented the greatest number of amino acid changes in both groups. However, the general diversity profile is different between the two groups: HC and TSP/HAM. In the HC group of clones, after the RBD the second most divergent domain was the 53-75aa that is associated to the prevalence of linear epitopes. At the TSP/HAM group of clones, the second most divergent domain was the 53-75aa that is also associated to the

occurrence of linear epitopes (see Figure 3). The 197 amino acid site, which was already associated to the decrease in cellular fusion, was mutated (D197N) at 2 clone sequences in our data set: 1 sequence from the HC group and the other sequence from the TSP/HAM group (data not shown). Besides this, one sequence of the TSP/HAM group was mutated (Y80C) at position 80aa, exactly at the motif (YSLY) of trafficking the protein to the plasma membrane.

We also performed the epitope prediction at the 53-75aa and 175-209aa domains that were associated to the most genetic diversity of TSP/HAM and HC clones, respectively. Analyzing the domain 175-209aa, sixteen and seven HLA-I and HLA-II specific epitopes were found, respectively (Table 1). On the other hand, eleven and five HLA-I and HLA-II specific epitopes were identified at the 53-75aa domain, respectively (Table 2). Since that the mutation G72S is located at the 53-75aa domain, therefore we tested both alleles: wild and mutated types. The mutated allele had changed the HLA molecule binding score in three of eleven epitopes which have this site (72aa). In the HLA A 26 and HLA A01 (HLA-I) specific epitopes, started at the 65aa and 68aa sites, the HLA molecule binding score increased and decreased, respectively (Table 3). In the HLA DRB1 0101 (HLA-II) specific epitope, started at the 64aa site, the HLA molecule binding score decreased (Table 2).

To identify if the aminoacid mutations found had been positively selected, we have performed positive selective pressure analysis. According to our results, the ω value calculated for the clone sequences from TSP/HAM individuals was higher than the ω value calculated for the clone sequences from HC individuals. Despite this result no calculated ω value was >1 .

Our results from the identification of post-translation modification sites are summarized in Table 3 and show that the same potential protein domains were found among the HC and TSP/HAM groups of sequences. However, despite being the same sites, their frequencies were

statistically different because they were more frequent among the viral clones isolated from TSP/HAM individuals (Table 3).

We submitted the wild and mutated sequences to physico-chemical analysis using the NPSA tool. The following was observed: 1) the mutated allele of the F14S mutation was more hydrophilic and flexible than the wild allele (Figure 4A), 2) the mutated allele of the N42H mutation was less antigenic than the wild allele (Figure 4B), 3) and finally, the mutated allele of the V247I mutation was less antigenic than the wild allele (Figure 4C). According to our results, other less frequent mutations were associated to changes in the physico-chemical profile and potential protein domains: the mutation T142I was associated to the loss of a N-glycosylation site and to a decrease in antigenicity; the mutation F159S presented a more hydrophilic and flexible profile, associated to the insertion of a N-Myristilation site; and the mutations H290D, C289R and F141S were characterized by an increase in hydrophilicity and flexibility, the opposite of the mutation D197N which was associated to a decrease in flexibility (Data not shown).

After submission of wild and mutated clone sequences to SWISS-MODEL server, the results showed that the mutations S35L and G72S were associated to the change of coil for extended beta at the secondary structure prediction (See Figure 5).

Molecular characterization of gp21

Due to technical limitations, it was not possible to perform the cloning to the gp21, so that it was only performed the PCR reactions and after the sequencing. Only 8 gp21 sequences (480nt) were generated and submitted to molecular characterization, because the PCR amplification was successfully performed for 8 blood samples: 4 from HC and 4 from TSP/HAM individuals. With regard to the point amino acid changes it was possible to identify one (Y477H) change with occurrence frequency of 87.5% within the sequence groups. This mutation can be a

protein assignature of these individuals, because it is not detected in others available gp21 sequences generated from HTLV-1 infected individuals in Brazil. It is sited at the cytoplasmatic domain and the prediction of secondary structure shows that there are structural differences at gp21 C-terminal region between the wild and mutated alleles (Data not shown).

Molecular characterization of HBZ

Similar to gp21 it was not possible to perform the cloning to the HBZ, so that it was only performed the PCR reactions and after the sequencing. PCR amplification was successfully performed for only 9 blood samples from the 10 individuals recruited: 5 from Health Carrier (HC) individuals and 4 from TSP/HAM. One other sequence was generated from other HC individual not included in the previous organized sampling. The 10 sequences (517nt) were generated and submitted to molecular characterization. With regard to the point amino acid changes it was possible to identify two (S9P and T95I) of them with occurrence frequency of 100% within the sequence groups. The third (R112C) most frequent mutation was found at 66.7% and 25% of HC and TSP/HAM group of sequence, respectively (Fisher test, $p = 0.5238$). It is important to note that the mutations S9P and T95I are at the activation HBZ domain, as the R112C is located at the HBZ nuclear localization signal.

Our results about the identification of post-translation modification sites show that the same potential protein domains were found among the HC and TSP/HAM groups of sequences. The post-translational modification sites found were N-Myristilation, CK 2 and PKC Phosphorilation and N-Glycosylation in all 10 HBZ sequences (Data not shown).

Considering that the HBZ protein is encoded by the negative strand into a homologous region to the positive strand that encodes the pX gene (Figure 6A), the HBZ mutations could be responsible for the changes in the proteins encoded by the pX gene. By using the HBZ sequences

and comparing them to one pX reference sequence (ATK1-J02029) it was possible to identify that the mutation R112C could be responsible for the P34L mutation in the p12 protein (ORF-I of pX) (Figure 6B).

Discussion

The low overall genetic diversity found in gp46 sequences is in agreement with the fact that the HTLV-1 genome exhibits relatively few sequence variations, emphasizing that recombinant envelope glycoproteins or synthetic peptides could be used as an effective vaccine candidate. However, it is important to note that the sequences from TSP/HAM individuals are relatively more divergent compared to those from HC individuals, confirming that the immune environment represents effective selective pressure.

We identified at least five most common mutations in all 176 gp46 sequences. The most common mutations were associated to an intra-host profile because, except for the V247I mutation, the other aminoacid changes were specifically found in the same single individual: the S35L mutation was exclusive for one HC individual, the mutations F14S and G72S were exclusive for one TSP/HAM individual, and finally the N42H change was exclusive for other TSP/HAM individual. Because of this we cannot associate any of the mutations found to the clinical profile, due to the reduced number of individuals recruited in this study.

We believe in the potential of these mutations to become clinical markers as they are located in important protein domains. The fact that some of these mutations have been associated to physico-chemical or secondary structure changes does not mean there is no need for *in vitro* assays. This investigation is important because antibodies are most likely to recognize linear epitopes but they are also dependent on the conformation of the antigen and efficient epitope recognition determines the neutralizing properties of anti-HTLV-1 antibodies [20].

Even though the HTLV-1 genome displays few variations, amino-acid changes in gp46 can modify the structure and/or the antigenicity of major neutralizing epitopes [19]. In this case, non effective antibodies could be closely related to the clinical manifestation because they can play an important role in controlling HTLV-1 dissemination and the viral burden on natural infections, in particular through antibody-dependent cellular cytotoxicity [17]. The immune responses that differentiate health carrier from TSP/HAM could be a result of the fact that infected cells, which display the envelope on the surface, remain insensitive and not vulnerable to antibody-dependent cellular cytotoxicity and antibody-mediated complement fixation.

Consequently, our group is carrying out a site-directed mutagenesis assay to test the mutations found in this characterization, with the objective of evaluating the binding of the variant protein against natural antibodies produced by HC and TSP/HAM individuals.

Interestingly, we could identify that HTLV-1 gp46 from HC and TSP/HAM individuals had different genetic diversity profile, especially at domains with prevalence of linear epitopes. At these domains, it was possible to identify different epitopes to HC and TSP/HAM individuals. Recent data revealed that patients with TSP/HAM recognized a significantly broader repertoire of Env epitopes, compared with health carrier, suggesting that the diversity, frequency and repertoire of HTLV-1 Env CD8⁺ T-cells may be related to the hyperimmune response at TSP/HAM [24]. Additionally, identification of the Env epitopes, that are most responsible to the immune system activation, could be useful to the vaccine design [25].

The genomic regions where the post-translational sites were identified, showed a high identity among the sequences, suggesting the influence of these sites on the host immune response, and virus latency. The post-translational modifications at envelope glycoproteins are not well documented therefore there is a lack of evidence of the importance of these sites for virus clonal expansion. However, these sites are frequently found in HTLV-1 envelope proteins,

and it would be interesting to investigate the functional impact of them. As regards the Tax protein, for example, much is known about the post-translational modifications and they are important in the constitutive activation of NF- κ B pathways, inhibition of DNA repair, activation of p53 tumor suppressor and cell cycle control [25].

In summary, the results presented in this study suggest that the most frequent gp46 mutations F14S, N42H, V247I and S35L, as well as the mutations (H290D, C289R, F141S, D197N and F159S) associated to the loss of a post-translational site should be evaluated in greater detail, in particular the reactivity of the mutated proteins against natural antibodies. Furthermore, we believe that analyses of a greater number of sequences can provide more information about the occurrence of these variations and the identification of others which are just as important as the ones presented here. The benefits of investigating these mutations can also be useful for the Western Blot indeterminate profile which is dependent on the efficient binding of gp46 and natural antibodies.

However, we suggest that future studies evaluating the molecular diversity of envelope proteins should take into account a larger number of individuals, and a reduced number of clones. A larger number of individuals could be useful to evaluate the association of the possible mutations to the clinical status and as well as this, the cloning could be useful for the identification of intra-host variations and possible emerging changes. In particular because three (F14S, S35L and N42H) of these mutations can be classified as a completely new signature, while the V247I mutation is an already known signature from Brazilian HTLV-1 isolates.

The same more precise evaluating should be done to gp21, that due to the reduced number of sequences in this report, it was not possible to infer association to the clinical status. The

importance of studying the gp21 is because it is associated to Env trafficking and consequently to the expression of HTLV-1 glycoproteins at infected cells surface.

Despite the reduced number of HBZ sequences, there are no reports about mutations at this genomic region, and we have identified three frequent mutations at HBZ protein at this report. Moreover, the three mutations found are located at functional HBZ domains and one of them (R112C) could be responsible for one mutation in the pX gene, therefore we believe that these aminoacid changes should be more closely investigated.

Methods

Patients

Blood samples were collected from 10 individuals who were frequently seen at the Bahia School of Medicine and Public Health, HTLV reference center in Salvador, located in northeastern Brazil, in the first period of 2010. This is a free public outpatient clinic that has provided comprehensive care to a total of 1,050 patients since 2002. All 10 patients were included in the present study with inclusion criteria consisting of a high HTLV-1 proviral load measurement and a neurological evaluation. The individuals selection was driven in order to make the clinical groups as much similar as possible, using similar median proviral load and age. All cases of co-infection were excluded, as well as symptomatic patients with other HTLV-1-associated diseases, such as infective dermatitis, uveitis, ATL, Sicca syndrome, etc. The Disability Status Scale (DSS) [25] and the Osame Motor Disability Score (OMDS) [26] were regularly applied by a neurologist. This study was approved by the Ethics Committee of the Bahia School of Medicine and Public Health. Informed consent was obtained from all enrolled patients.

Measurement of HTLV-1 Proviral Load

PBMCs were obtained from EDTA blood by density gradient centrifugation. DNA was extracted using spin column DNA extraction system (Qiagen, Hilden, Germany) and HTLV-1 proviral load was quantified using a real-time TaqMan polymerase chain reaction (PCR) method, as described previously [27]. Albumin DNA was used as an endogenous reference. The value of HTLV-1 proviral load was reported as the [(HTLV-1 average copy number)/(albumin average copy number)] x 2 x 10⁶ and expressed as the number of HTLV-1 copies per 10⁶ cells in PBMCs.

gp46 PCR, Cloning and Sequencing

The gp46 coding sequences from the viruses isolated from the PBMC of HTLV-1-infected patients were amplified by PCR. In brief, gp46F/gp46R (gp46F 5'CGCCGATCCCAAAGAAAAA3'/gp46R 5'ACATGGAGCCGGTAATCCC3') were designed and used to amplify a 936pb fragment, corresponding to the entire gp46 coding region. The PCR products were purified using the Qiaquick Gel Extraction kit (Qiagen, QIAamp DNA miniKit, Qiagen, Hilden, Düsseldorf, Germany). The amplicons were then ligated into the pCR®4-TOPO available at TOPO TA cloning® kit for sequencing (Invitrogen, CA, USA), and the mini preparations were made using the kit (Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System). All purified clones were sequenced in an ABI Prism 3100 DNA Sequencer (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA) using Taq FS Dye (Applied Biosystems) terminator cycle sequencing. Besides the same PCR primers, a new inner primer (gp46 R2 5'GACGTGCCAAGTGGATAGGC3') was used to optimize the sequencing reactions.

gp21 and HBZ PCR and sequencing

The gp21 coding sequences from the viruses isolated from the PBMC of HTLV-1-infected patients were amplified by PCR. In brief, gp21F/gp21R (5'CCATATGGGAGCCGGAGTGGCTGGC3'/5'GAATTCCAGGGATGACTCAGGGTTTAT3') were designed and used to amplify a 525pb fragment, corresponding to the entire gp21 coding region. The PCR reactions for amplification of HBZ coding sequences from the viruses isolated from the PBMC of HTLV-1-infected patients were performed as methods previously published [28]. Briefly, S1/AS4 (S1 5' GTCATCCCGCACTGCTAC 3'/S4 5' TTGCAACCACATCGCCTCCAGCCTCT 3') were used to amplify a 517pb fragment, corresponding to the unspliced HBZ. The gp21 and HBZ PCR products were purified using the Qiaquick Gel Extraction kit (Qiagen, QIAamp DNA miniKit, Qiagen, Hilden, Düsseldorf, Germany) and sequenced in an ABI Prism 3100 DNA Sequencer (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA) using Taq FS Dye terminator (Applied Biosystems) cycle sequencing. The same PCR primers were used in the sequencing reactions.

gp46 Molecular Characterization

Before analyzing the gp46 obtained sequences regarding the mutations and molecular characteristics, two datasets were constructed. The first dataset was composed by 27 gp46 sequences, already available in the NCBI/Nucleotide Sequence Database (GenBank), that were generated from viral isolates from different countries, except for Brazil, and this dataset was called "*Cosmopolita database*". A second dataset was composed of 42 gp46 sequences, already available in GenBank, that were generated from viral isolates from Brazil exclusively, and this dataset was called "*Brazilian dataset*". Both datasets were submitted separately to the Clustal X software [29] to perform the alignment which was then manually edited using the GeneDoc

program [30], and finally, the edited alignment was used to generate a unique consensus sequence of each dataset using Bioedit software [31]. The consensus sequence from “*Cosmopolita database*” was called “*Cosmopolita reference*” and the consensus sequence from the “*Brazilian dataset*” was called “*Brazilian reference*”. These consensus sequences comprise the most frequent nucleotide variants found in already published gp46 sequences from Brazil and elsewhere. These consensus sequences were used as the reference sequences to identify possible mutations in the 176 newly generated gp46 sequences.

It is therefore important to note that the 42 Brazilian sequences are classified as subtype a (Cosmopolita), and were generated from different Brazilian geographic regions: Salvador, Northern (n = 21); Londrina, South (n = 5); São Paulo, Southeast (n = 11), and five of them we could not obtain any information about geographic origin. The 27 sequences of the *Cosmopolita dataset* do not have any information about subtype and were generated from different countries: French Guyana, Central America (n = 7); Martinique, Central America (n = 1); Gabon, Central Africa (n = 12); and Guadalupe, Central America (n = 7). All accession numbers are listed at the end of this section.

The genetic distances were measured within the two distinct groups: gp46 sequences from HC and TSP/HAM HTLV-1 infected individuals. The Tamura Nei model was used with a distance matrix implemented in the MEGA 3.0 package [32], and the standard error computation was obtained by Bootstrap analysis (1000 replicates). The mutation/polymorphism identification was performed manually using the visualization of alignment in the Bioedit software [31].

To test the hypothesis that the amino acid substitutions within the gp46 sequences could have been favored or not by natural selection, the positive selection was assessed using six different codon-based maximum-likelihood substitution models [33]. All models were

implemented in the HYPHY program [34] and the ω and p values were estimated through maximum-likelihood optimization, in such a way that using the M3 model, sites with a posterior probability exceeding 90% and a ω value > 1 were labeled as being “positive selection sites” [35]. Finally, likelihood ratio test (LRT) analysis was used to determine: (1) if site heterogeneity selection was present and (2) if there were positively selected sites [35].

Epitope prediction was carried out for the HC and TSP/HAM consensus sequence to 27 HLA-I (HLA A1101, HLA A26, HLA B1510, HLA B4402, HLA A01, HLA A0201, HLA A2402, HLA A5101, HLA A03, HLA B2705, HLA A6801, HLA B08, HLA B0702, HLA B2709, HLA B 1402, HLA B1501, HLA B18, HLA B37, HLA B3801, HLAB 3901, HLA B 3902, HLA B4001, HLA B4101, HLA B 4501, HLA B 4701, HLA B 4901, HLA B5101) and 6 HLA-II alleles (HLA DRB1 0101, HLA DRB1 0401, HLA DRB1 0301, HLA DRB1 1501, HLA DRB1 0701, HLA DRB1 1101), using the online bioinformatics tool SYFPEITHI (<http://www.syfpeithi.de/Scripts/MHCServer.dll/Epitope Prediction.htm>) [36]. This tool uses an algorithm that can predict sequences that have the potential ability to bind to one or more different HLA-I and HLA-II molecules. It also provides information about the epitope sequence, the specificity to the HLA molecule and the HLA binding score for each epitope.

To investigate the possible influence of mutations described in the gp46 sequences, physico-chemical analysis was performed using Network Protein Sequence Analysis (NPSA) (<http://npsa-pbil.ibcp.fr/>) [37-41] and the potential protein domain analysis using the GeneDoc software [30] and the Prosite tool, as previously described [42].

Finally, the SWISS-MODEL online tool (<http://swissmodel.expasy.org/>) [43] was used as a fully automated protein structure homology-modeling server, to infer about possible influence of the amino acid changes at protein secondary structure.

All gp46 nucleotide sequences previously deposited in the GenBank and used in the study are listed below with their corresponding accession number: L26585, L26586, L33265, L33266, AF091494-AF091500, AF092065, L76041-L76049, L76052-L76054, L76056, L76058, L76060, DQ007189-DQ007209, HM770426-HM770440, AF077209.

gp21 and HBZ Molecular Characterization

Before analyzing the gp21 obtained sequences regarding the mutations and molecular characteristics, one dataset were constructed, using all gp21 available sequences in the NCBI/Nucleotide Sequence Database (GenBank). All the sequences of the dataset were submitted to the Clustal X software [29] to perform the alignment which was then manually edited using the GeneDoc program [30], and finally, the edited alignment was used to generate a unique consensus sequence of dataset using Bioedit software [31]. These consensus sequences were used as the reference sequence to identify possible mutations in the 8 newly generated gp21 sequences. Regard to the HBZ characterization, the strain AB219938 was used as reference to the mutation identification.

The mutation/polymorphism identification was performed manually using the visualization of alignment in the Bioedit software [31], and the potential protein domain analysis was performed using the GeneDoc software [30] and the Prosite tool, as previously described [42].

The SWISS-MODEL online tool (<http://swissmodel.expasy.org/>) [43] was used as a fully automated protein structure homology-modeling server, to infer about possible influence of the amino acid changes at protein secondary structure.

All gp21 nucleotide sequences previously deposited in the GenBank and used in the study are listed below with their corresponding accession number: U81865-U81869.

References

1. Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC: **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. Proietti FA, Carneiro-Proietti ABF, Catalan-Soares B, Murphy EL: **Global Epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases.** *Oncogene* 2005, 24: 6058-6068.
3. Osame M, Usuku K, Izumo S, Ijichi N, Amitani H, Igata A, Matsumoto M, Tara M: **HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity.** *Lancet* 1986, 1: 1031-1032.
4. Gessain A, Barin F, Vernant JC, Gout O, Maurs L, Calender A, De The G: **Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis.** *Lancet* 1985, 2: 407- 410.
5. Kaplan JE, Osame M, Kubota H, Igata A, Nishitani H, Maeda Y, Khabbaz RF, Janssen RS: **The risk of development of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis among persons infected with HTLV-I.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 1990, 3: 1096-1101.
6. Maloney EM, Cleghorn FR, Morgan OS, Rodgers-Johnson P, Cranston B, Jack N, Blattner WA, Bartholomew C, Manns A: **Incidence of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in Jamaica and Trinidad.** *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1998, 17: 167-170.
7. Nagai M, Usuku K, Matsumoto W, Kodama D, Takenouchi N, Moritoyo T, Has Hashiguchi S, Ichinose M, Bangham CR, Izumo S, Osame M: **Analysis of HTLV-I proviral load in 202 HAM/TSP patients and 243 asymptomatic HTLV-I carriers: High proviral load strongly predisposes to HAM/TSP.** *J Neurovirol* 1998, 4: 586– 593.
8. Grassi MFR, Olavarria VN, Kruschewsky RA, Mascarenhas E, Dourado I, Correia LCL, Castro-Costa CM, Galvão-Castro B: **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. *Journal of Medical Virology* 2011, 83:1269–1274.

9. Jeffery KJM, Siddiqui AA, Bunce M, Lloyd AL, Vine AM, Witkover AV, Izumo S, Usuku K, Welsh KI, Osame M, Bangham CRM: **The influence of HLA class I alleles and heterozygosity on the outcome of human T cell lymphotropic virus type I infection.** *Journal of Immunology*, 2000, 165: 7278–7284.

10. Jeffery KJM, Usuku K, Hall SE, Matsumoto W, Taylor GP, Procter J, Bunce M, Ogg GS, Welsh KI, Weber JN, Lloyd AL, Nowak MA, Nagai M, Kodama D, Izumo S, Osame M, Bangham CR: **HLA alleles determine human T-lymphotropic virus-I (HTLV-I) proviral load and the risk of HTLV-I-associated myelopathy.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, 96: 3848–3853.

11. Ishihara S, Okayama A, Stuver S, Horinouchi H, Shioiri S, Murai K, Kubota T, Yamashita R, Tachibana N, Tsubouchi H, Mueller N: **Association of HTLV-I antibody profile of asymptomatic carriers with proviral DNA levels of peripheral blood mononuclear cells.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 1994, 7: 199–203.

12. Lal RB, Giam CZ, Coligan JE, Rudolph DL: **Differential immune responsiveness to the immunodominant epitopes of regulatory proteins (tax and rex) in human T cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy.** *J Infectious Diseases* 1994, 169: 496–503.

13. Iniguez AM, Otsuki K, Magalhães GP, Silva EA, Vicente ACP: **Genetic Markers on the HTLV-1 p12I Protein Sequences from Brazilian HAM/TSP Patients and Asymptomatic HTLV-1 Carrier Isolates.** *AIDS Research and Human Retroviruses* 2005, 21(6): 580-582.

14. Seki M, Sashiyama H, Hayami M, Shida H: **Intracellular processing and immunogenicity of the envelope proteins of human T-cell leukemia virus type I that are expressed from recombinant vaccinia viruses.** *Virus genes* 1990, 3: 235 – 249.
15. Sagara Y, Inoue Y, Shiraki H, Jinno A, Hoshino H, Maeda Y: **Identification and Mapping of Functional Domains on Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 Envelope Proteins by Using Synthetic Peptides.** *J of Virol* 1996, 70(3): 1564-1569.
16. Rosenberg A, Delamarre L, Preira A, Dokhelar MC: **Analysis of functional Conservation in the Surface and Transmembrane Glycoprotein Subunits of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 (HTLV-1) and HTLV-2.** *J of Virol* 1998, 7609–7614.
17. Ilinskaya A, Heidecker G, Derse D: **Opposing Effects of a Tyrosine-based sorting motif and a PDZ-Binding motif regulate Human T-Lymphotropic Virus type 1 envelope Trafficking.** *J of Virology* 2010, 84: 6995-7004.
18. Ghez D, Lepelletier Y, Jones KS, Pique C, Hermine O: **Current concept regarding the HTLV-1 receptor complex.** *Retrovirology* 2010, 7: 99-110.
19. Tallet B, Astier-Gin T, Moynet D, Londos-Gagliardi D, Guillemain B: **Sequence variations in the amino and Carboxy-Terminal parts of the surface envelope glycoprotein of HTLV Type 1 induce specific Neutralizing antibodies.** *AIDS Research and Human Retroviruses* 2001, 17:337-348.
20. Kuo CS, Mirsaliotis A, Brighty DW: **Antibodies to the Envelope Glycoprotein of Human T cell Leukemia virus type I robustly activate cell-mediated cytotoxic responses and directly neutralize viral infectivity at Multiple steps of the Entry Process.** *J of Immunology* 2011, 187:361-371.

21. Satou Y, Yasunaga J, Yoshida M, Matsuoka M: **HTLV-I basic leucine zipper factor gene mRNA supports proliferation of adult T cell leukemia cells.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, 103: 720-725.
22. Matsuoka M, Green PL: **The HBZ gene, a key player in HTLV-1 pathogenesis.** *Retrovirology* 2009, 6:71-79.
23. Satou Y, Yasunaga J, Zhao T, Yoshida M, Miyazato P, Takai K, Shimizu K, Ohshima K, Green PL, Ohkura N, Yamaguchi T, Ono M, Sakaguchi S, Matsuoka M: **HTLV-1 bZIP Factor induces T-cell Lymphoma and Systemic Inflammation In vivo.** *PLOS Pathogens* 2011, 7.
24. Kosako T, Akimoto M, Toji S, Tomohiro Kozako, White Y, Suzuki S, Arima T, Suruga Y, Matsushita K, Shimeno H, Soeda S, Kubota R, Izumo S, Uozumi K, Arima N: **Target Epitopes of HTLV-1 Recognized by Class I MHC-Restricted Cytotoxic T Lymphocytes in Patients With Myelopathy and Spastic Paraparesis and Infected Patients With Autoimmune Disorders.** *J Medical Virology* 2011, 83: 501-509.
25. Mota-Miranda AC, de Oliveira T, Moreau DR, Bomfim C, Galvão-Castro B, Alcântara LCJ: **Mapping the molecular characteristics of Brazilian human T-cell lymphotropic virus type 1 Env (gp46) and Pol amino acid sequences for vaccine design.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007, 102(6): 741-749.
26. Shembade N, Harhaj ED: **Role of post-translational modifications of HTLV-1 Tax in NF- κ B activation.** *World J of Biological Chemistry* 2010, 26: 13-20.
27. Kurtzke JF: **A new scale for evaluating disability in multiple sclerosis.** *Neurology* 1955, 5: 580-583.
28. Izumo S, Goto I, Itoyama Y, Okajima T, Watanabe S, Kuroda Y, Araki S, Mori M, Nagataki S, Matsukura S, Akamine T, Nakagawa M, Yamamoto I, Osame M: **Interferon-alpha is**

effective in HTLV-1 associated myelopathy: A multicenter, randomized, double-blind, controlled trial. *Neurology* 1996, 46: 1016-1021.

29. Dehee A, Cesaire R, Desire N, Lezin A, Bourdonne O, Bera O, Plumelle Y, Smadja D, Nicolas JC: **Quantification of HTLV-I proviral load by a TaqMan real-time PCR assay.** *J Virol Methods* 2002, 102:37-51.

30. Murata K, Hayashibara T, Sugahara K, Uemura A, Yamaguchi T, Harasawa H, Hasegawa H, Tsuruda K, Okazaki T, Koji T, Miyanishi T, Yamada Y, Kamihira S: **A Novel Alternative Splicing Isoform of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 bZIP Factor (HBZ-SI) Targets Distinct Subnuclear Localization.** *J of Virology* 2006, 80: 2495-2505.

31. Jeanmougin F, Thompson JD, Goy M, Higgins DG, Gibson TJ: **Multiple sequence alignment with clustal X.** *Trends Biochem Sci* 1998, 23: 403-405.

32. Nicholas KB, Nicholas HBJ, Deerfield DW: **GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation.** *Embnew News* 1997, 4: 14.

33. Hall TA: **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.** *Nucl Acids Symp Ser* 1999, 41: 95-98.

34. Kumar S, Tamura K, Nei M: **MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software for microcomputers.** *Cabios* 1994, 10: 189-191.

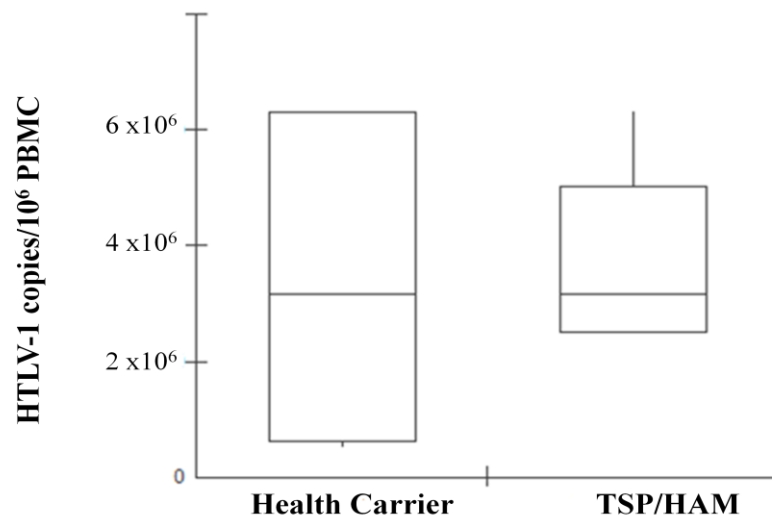
35. Yang Z, Nielsen R, Goldman N, Pedersen AM: **Codon-substitution models for heterogeneous selection pressure at amino acid sites.** *Genetics* 2000, 155: 431-449.

36. Pond SLK, Muse SP: **HyPhy: Hypothesis Testing Using Phylogenies.** 2000

37. De Oliveira T, Salemi M, Gordon M, Vandamme AM, Van Rensburg EJ, Engelbrecht S, Coovadia HM, Cassol S: **Mapping Sites of Positive Selection and Amino Acid Diversification in the HIV Genome: An Alternative Approach to Vaccine Design?** *Genetics* 2004, 167:1047-1058.

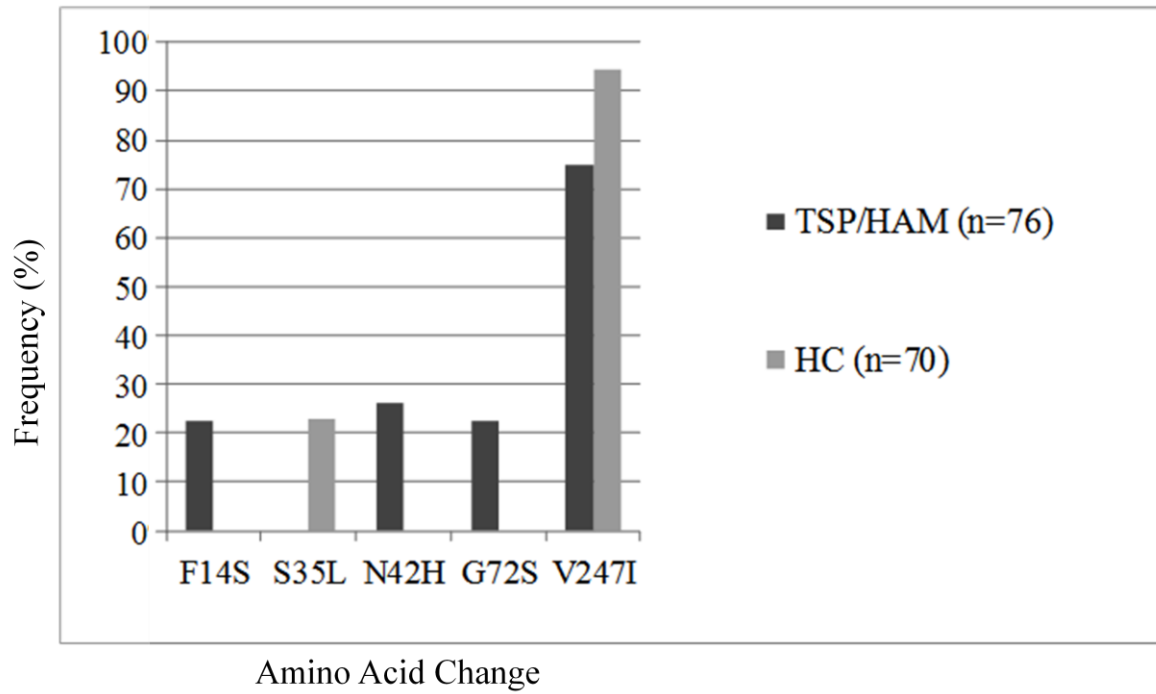
38. Rammensee HG, Bachmann J, Emmerich NPN, Bachor OA, Stevanovic S: **SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs.** *Immunogenetics* 1999, 50: 213-219.
39. Argos P, Rao JK, Hargrave PA: **Structural prediction of membrane-bound proteins.** *Eur J Biochem* 1982, 15: 565-575.
40. Kyte J, Doolittle R: **A simple method for displaying the hydropathic character of a protein.** *J. Mol. Biol.* 1982, 157: 105-132.
41. Hopp TP, Woods KR: **Physico-chemical profiles: A computer program for predicting protein antigenic determinants.** *Mol Immunol* 1983, 20: 483-489.
42. Karplus PA, Schulz GE: **Prediction of Chain Flexibility in Proteins - A tool for the Selection of Peptide Antigens.** *Naturwissenschaften* 1985, 72: 212-213.
43. Parker JMR, Guo D, Hodges RS: **New Hydrophilicity Scale Derived from High-Performance Liquid Chromatography Peptide Retention Data: Correlation of Predicted Surface Residues with Antigenicity and X-ray-Derived Accessible Sites.** *Biochemistry* 1986, 25: 5425-5431.
44. Queiroz AT, Mota-Miranda AC, De Oliveira T, Moreau DR, Uripia CDE, Carvalho CM, Galvão-Castro B, Alcantara LCJ: **Re-mapping the molecular features of the human immunodeficiency virus type 1 and human T-cell lymphotropic virus type 1 Brazilian sequences using a bioinformatics unit established in Salvador, Bahia, Brazil, to give support to the viral epidemiology studies.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2007, 102: 133-139.
45. Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T: **The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling.** *Bioinformatics* 2006, 22: 195-201.

Figure 1



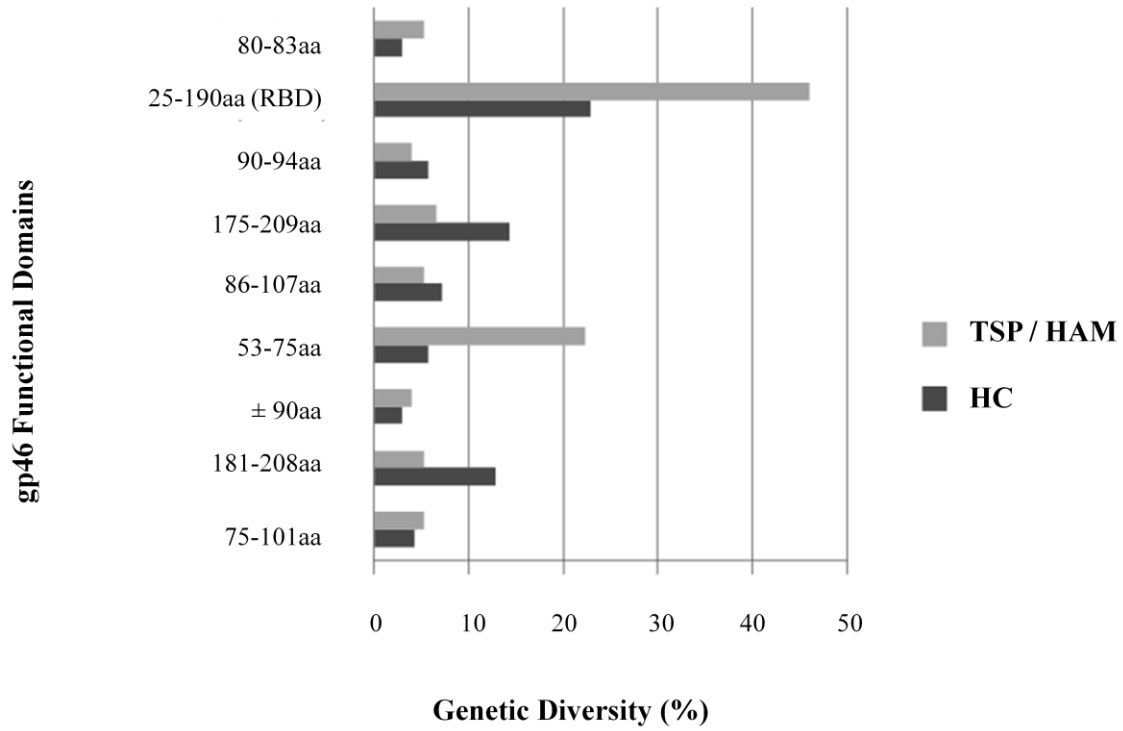
Median of HTLV-1 proviral load in infected individuals, ranging from health carrier (n = 5) and TSP/HAM (n = 5) individuals. Results are presented as number of HTLV-1 copies/10⁶ PBMC. The box-plots represent the median, interquartile range (boxes) and the 5–95% data range (whisker caps).

Figure 2



Frequency (%) of most common gp46 amino acid changes within viral clones from TSP/HAM and Health Carrier (HC) infected individuals. N is the number of clone sequences.

Figure 3



Genetic diversity (%) of HTLV-1 gp46 functional domains previously identified. The genetic diversity was evaluated as frequent and not frequent mutations found at viral clones from Health Carrier (HC) and TSP/HAM individuals. aa means amino acid.

Table 1- Possible epitopes for classes I and II HLA alleles at HTLV-1 gp46 175-209aa domain.

A-Class I HLA alleles		
AA Position	Epitope Sequence	HLA Allele
175	F L N T E P S Q L	A 0201, B 08
177	N T E P S Q L P P	A 01, A 1101, B 4501
179	E P S Q L P P T A	A 0702
182	Q L P P T A P P L	A 0201, B 08, B 4402
183	L P P T A P P L L	A 0701, B 08, B 5101
184	P P T A P P L L P	B 0702
185	P T A P P L L P H	A 1101
188	P P L L P H S N L	B 0702, B 02, B 1402, B 2705, B 37, B 5101
191	L P H S N L D H I	B 4901, B 5101
192	P H S N L D H I L	B 1510, B 3801 B 3901
193	H S N L D H I L E	A 1101
194	S N L D H I L E P	B 4501
199	I L E P S I P W K	A 03, A 1101, A 6801, B 2705
202	P S I P W K S K L	A 26, B 2705
203	S I P W K S K L L	A 0201, B 08, B 37
205	P W K S K L L T L	A 26, B 3901

B-Class II HLA alleles		
AA Position	Epitope Sequence	HLA Allele
172	P I W F L N T E P S Q L P P T	DRB 0701
180	P S Q L P P I A P P L L P H S	DRB 0301, DRB 0701
187	A P P L L P H S N L D H I L E	DRB 0301, DRB 1501
188	P P L L P H S N L D H I L E P	DRB 0701
193	H S N L D H I L E P S I P W K	DRB 0701
194	S N L D H I L E P S I P W K S	DRB1 0101
201	E P S I P W K S K L L T L V Q	DRB 1501

Table 2- Possible epitopes for classes I and II HLA alleles at HTLV-1 gp46 53-75aa domain.

A-Class I HLA alleles										
AA Position	Epitope Sequence									HLA Allele
52	L	D	L	L	A	L	S	A	D	B 37
53	D	L	L	A	L	S	A	D	Q	A 03
54	L	L	A	L	S	A	D	Q	A	A 0201, A 03
55	L	A	L	S	A	D	Q	A	L	A 0201, B 08, B 1402, B 5101
56	A	L	S	A	D	Q	A	L	Q	A 03
57	L	S	A	D	Q	A	L	Q	P	A 1101
62	A	L	Q	P	P	C	P	N	L	A 0702, B 08, B 2705, B4402
63	L	Q	P	P	C	P	N	L	V	B 3902
64	Q	P	P	C	P	N	L	V	G	B 0702, B 5101
65	P	P	C	P	N	L	V	G	Y	A 01, A 26, B 4402
68	P	N	L	V	G	Y	S	S	Y	A 01

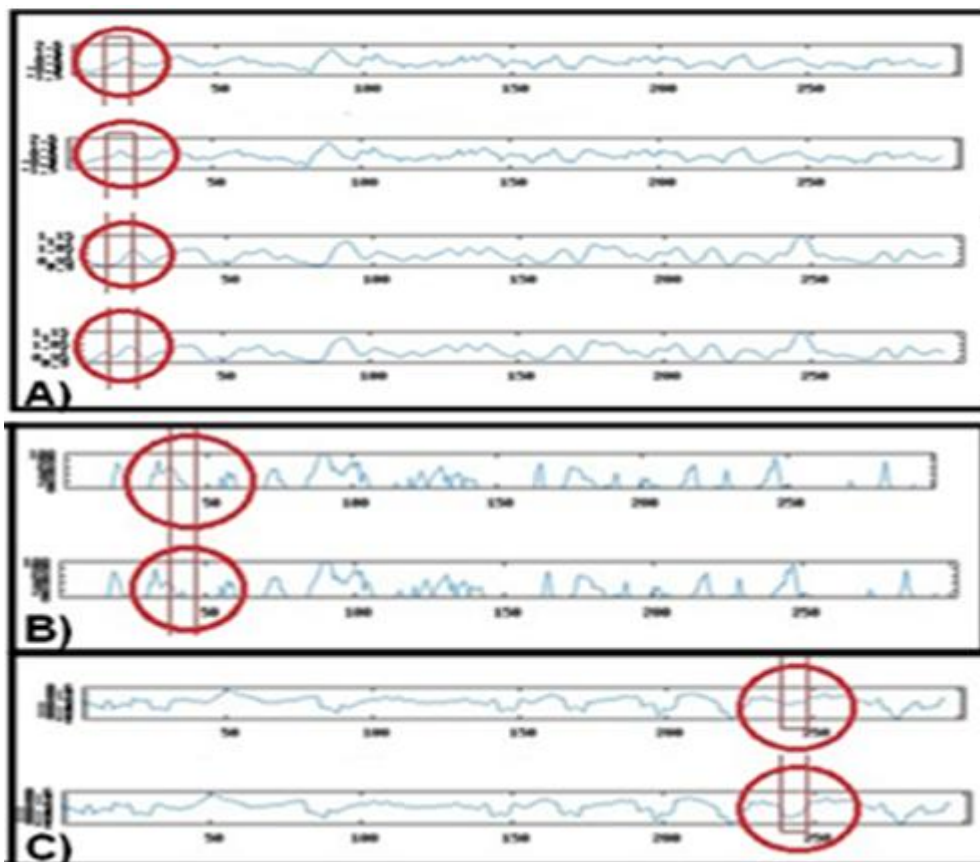
B-Class II HLA alleles																
AA Position	Epitope Sequence										HLA Allele					
51	T	L	D	L	L	A	L	S	A	D	Q	A	L	Q	P	DRB1 0101, DRB 0401
52	L	D	L	L	A	L	S	A	D	Q	A	L	Q	P	P	DRB 0301, DRB 0701
54	L	L	A	L	S	A	D	Q	A	L	Q	P	P	C	P	DRB1 0101, DRB 07071, DRB 1501
64	Q	P	P	C	P	N	L	V	G	Y	S	S	Y	H	A	DRB1 0101
67	C	P	N	L	V	G	Y	S	S	Y	H	A	T	Y	S	DRB1 0101, DRB 0401, DRB 0701, DRB 1501

Table 3 - Potential Protein Domains at HTLV-1 gp46 from Health Carrier and TSP/HAM individuals.

Potential protein domain	Health Carrier (N = 70)		TSP/HAM (N = 76)	
	Amino acid site	Frequency (%)	Amino acid site	Frequency (%)
N-Myristilation site	97-102	91.4	97-102	100 ¹
CK2-phosphorylation site	103-106	91.4	103-106	98.7 ²
	194-197	88.6	194-197	100 ³
N-glycosilation	140-143	90	140-143	98.7 ⁴
	222-225	91.4	222-225	100 ⁵
	244-247	91.4	244-247	98.7 ⁶
	272-275	92.8	272-275	98.7 ⁷
PKC-phosphorylation site	109-111	91.4	109-111	100 ⁸

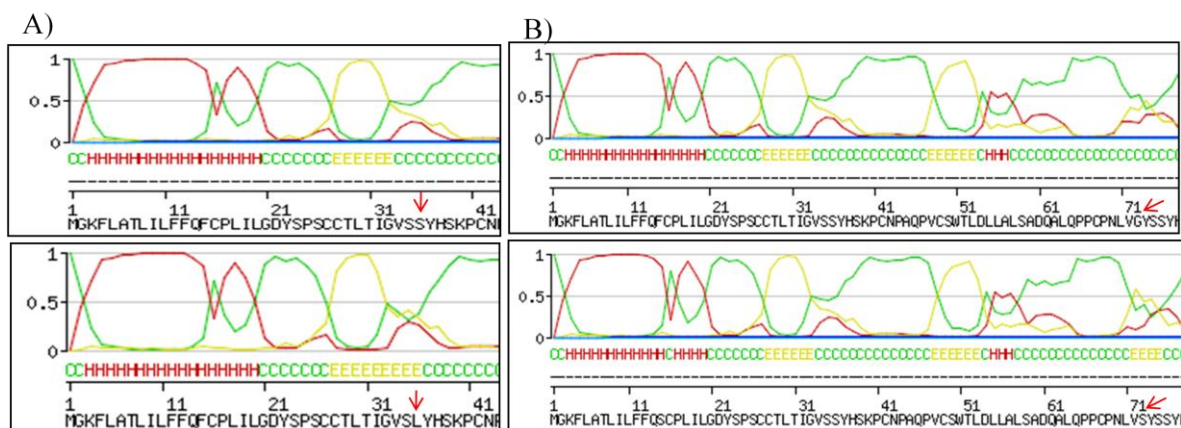
The numbers superscript at the last column represents the results from the Exact Fisher Test to the frequency of the potential protein domains in the two different groups. 1- $p = 0.028$, 2- $p = 0.0551$, 3- $p = 0.0022$, 4- $p = 0.0283$, 5- $p = 0.0108$, 6- $p = 0.0551$, 7- $p = 0.1047$, 8- $p = 0.0108$.

Figure 4



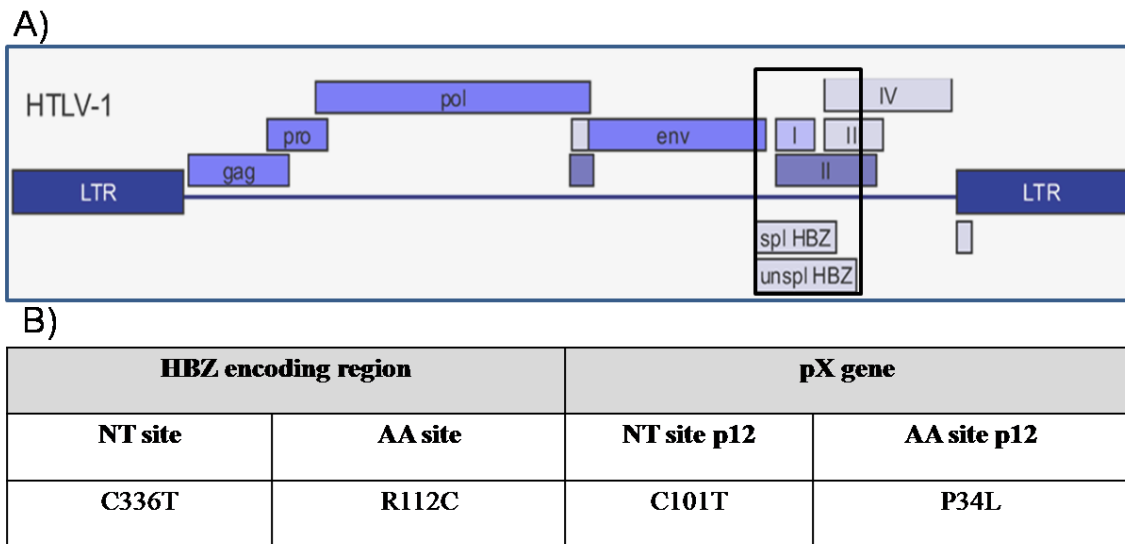
Physic-chemical analysis of wild and mutated alleles of F14S, N42H and V247I polymorphisms. In Figure 4A (F14S), the graphs are organized as follows: hydrophilicity for wild allele, hydrophilicity for mutated allele, flexibility for wild allele, and flexibility for the mutated allele. In Figure 4B (N42H) and 4C (V247I), the graphs are organized as follows: antigenicity for wild allele and antigenicity for mutated allele.

Figure 5



Results of HTLV-1 gp46 secondary structure prediction. The mutations S35L (A) and G72S (B) were associated to the switch of coil to extended beta structure.

Figure 6



Schematic figure of ORF I (pX gene) and HBZ encoding Region overlapping (A). Summarized results of HBZ characterization in relation to pX gene changes (B). NT means nucleotide and AA means amino acid.

Supplementary Figure 1- Description of previously published domains in the HTLV-1 gp46 protein and their exact aminoacid location.

DOMAIN/SITE	DESCRIPTION	REFERENCE
197-205aa	Functional domain	Sagara <i>et al.</i> , 1996
75-101aa	Functional domain	Rosenberg <i>et al.</i> , 1998
181-208aa	Functional domain	Rosenberg <i>et al.</i> , 1998
197aa	Mutations at this site are associated to a decrease in cellular fusion.	Rosenberg <i>et al.</i> , 1998
90aa	Mutations around at this site make syncytium and virus entry difficult.	Rosenberg <i>et al.</i> , 1998
I173V and A187T	Mutations associated to the induction of neutralizing antibodies	Blanchard <i>et al.</i> , 1999
53-75aa	Region that is characterized by a prevalence of linear epitopes.	Tallet <i>et al.</i> , 2001
86-107aa	Region that is characterized by a prevalence of linear epitopes.	Tallet <i>et al.</i> , 2001
175-209aa	Region that is characterized by a prevalence of linear epitopes.	Tallet <i>et al.</i> , 2001
288-317aa	Region that is characterized by a prevalence of linear epitopes.	Tallet <i>et al.</i> , 2001
90-94aa	Amino acids associated to the interaction with neurophilin 1.	Lambert <i>et al.</i> , 2009
290-312aa	Important region for the binding to Heparan Sulfate Proteoglycans.	Ghez <i>et al.</i> , 2010
25-190aa	Receptor Binding Domain (RBD)	Ghez <i>et al.</i> , 2010 and Kuo <i>et al.</i> , 2011
Y114	Critical residue for the interaction of gp46 to the 6 th extracellular loop of GLUT-1.	Ghez <i>et al.</i> , 2010
80-83aa	YSLY- Addressing motif of gp46 for the plasma membrane.	Ilinskaya <i>et al.</i> , 2010

5. CONCLUSÃO

- Na gp46, foram identificadas cinco mutações (F14S, S35L, N42H, G72S e V247I) que obedeciam a um padrão intra-hospedeiro.
- As mutações F14S, S35L e N42H são assinaturas dos isolados virais circulantes em Salvador, já que não foram encontradas em nenhuma outra seqüência gp46 já publicada.
- O RBD foi o domínio mais divergente entre os clones de indivíduos ASS e TSP/HAM.
- Existem, pelo menos, 23 epítomos, no domínio 175-209aa, e 16 epítomos no domínio 53-75aa, todos ligantes específicos de alelos de HLA-I ou HLA-II e preferencialmente apresentados nos indivíduos ASS e TSP/HAM, respectivamente.
- Algumas mutações encontradas na gp46 foram associadas à alteração do perfil físico-química da proteína e à alteração na predição de estrutura secundária.
- A análise da gp21 identificou uma mutação (Y477H) no domínio citoplasmático da proteína, que também se mostrou estruturalmente diferente entre os indivíduos ASS e TSP/HAM.
- Com a análise da proteína HBZ, foi possível identificar duas mutações (S9P e T95I) em todas as seqüências, e outra mutação (R112C) com diferença na frequência entre os grupos. Esta mutação está localizada no sítio de ativação da proteína, e é responsável por outra mutação na fita positiva onde é codificada uma proteína regulatória, p12.
- Apesar dos achados, ainda não foi possível associar as mutações encontradas com o perfil assintomático ou TSP/HAM na infecção pelo HTLV-1.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCANTARA, LCJ; VAN DOOREN, S; GONÇALVES, MS; KASHIMA, S; COSTA, MC; SANTOS, FL; BITTENCOURT, AL; DOURADO, I; FILHO, AA; COVAS, DT; VANDAMME, AM; GALVÃO-CASTRO, B. 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, 2003.

BANGHAM, CR. The Immune control and cell-to-cell spread of human T-lymphotropic virus type 1. **J Gen Virol** 84, 3177-3189, 2003.

BANGHAM, CRM & OSAME, M. Cellular immune response to HTLV-1. **Oncogene** 24, 6035–6046, 2005.

BARTOE, JT; ALBRECHT, B; COLLINS, ND; ROBEK, MD; RATNER, L; GREEN, PL; LAIRMORE, MD. Functional role of pX open reading frame II of human T-lymphotropic virus type 1 in maintenance of viral loads in vivo. **J Virol** 74, 1094-1100, 2000.

BASBOUS, J; ARPIN, C; GAUDRAY, G; PIECHACZYK, M; DEVAUX, C; MESNARD, JM. HBZ factor of HTLV-I dimerizes with transcription factors JunB and c-Jun and modulates their transcriptional activity. **J. Biol. Chem.** 278, 43620-43627, 2003.

BATTINI, JL; MANEL, N; KIM, FJ; KINET, S; TAYLOR, N; SITBON, M. The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV. **Cell** 115, 449-459, 2003.

BIGGAR, RJ; TAYLOR, ME; NEEL, JV; HJELLE, B; LEVINE, PH; BLACK, FL; SHAW, GM; SHARP, PM; HAHN, BH. Genetic variants of Human T-lymphotropic virus type II in American Indian groups. **Virology** 216, 165-173, 1996.

BITTENCOURT, AL; OLIVEIRA, MDEF; BRITES, C; VAN WEYENBERGH, J; DA SILVA VIEIRA, MG; ARAUJO, I. Histopathological and immunohistochemical studies of infective dermatitis associated with HTLV-I. **Eur J Dermatol** 15, 26-30, 2005.

BITTENCOURT, AL; VIEIRA, MG; BRITES, CR; FARRE, L; BARBOSA, HS. Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma in Bahia, Brazil. Analysis of Prognostic Factors in a Group of 70 Patients. **Am J Clin Pathol** 128, 875-882, 2007.

BLANCHARD, S; ASTIER-GIN, T; TALLET, B; MOYNET, D; LONDOS-GAGLIARDI, D; GUILLEMAIN, B. Amino Acid Changes at Positions 173 and 187 in the Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Surface Glycoprotein Induce Specific Neutralizing Antibodies. **J of Virology** 73, 9369-9376, 1999.

BOISVERT, FM; VAN KONINGSBRUGGEN, S; NAVASCUES, J; LAMOND AI. The multifunctional nucleolus. **Nat Rev Mol Cell Biol** 8, 574-585, 2007.

BRADY, J; JEANG, KT; DUVALL, J; KHOURY, G. Identification of p40x-responsive regulatory sequences with the human t cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. **J Virol** 61 (7), 2175-2181, 1987.

CALATTINI, S; CHEVALIER, SA; DUPREZ, R; BASSOT, S; FROMENT, A; MAHIEUX, R; GESSAIN, A. Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. **Retrovirology** 2, 30, 2005.

CARNEIRO-PROIETTI, ABF; RIBAS, JGR; CATALAN-SOARES, BC; MARTINS, ML; BRITO-MELO, GEA; MARTINS-FILHO, OA; PINHEIRO, SR; ARAUJO, AQC; GALVAO-CASTRO, B; POMBO DE OLIVEIRA, MS; GUEDES, AC; PROIETTI, FA. Infection and disease caused by the human T cell lymphotropic viruses type I and II in Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop** 35(5), 499-508, 2002.

CATALAN-SOARES, B; CARNEIRO-PROIETTI, ABF; PROIETTI, FA. Vírus-T linfotrópico humano em familiares de candidatos a doação de sangue soropositivos: disseminação silenciosa. **Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health** 16(6), 387-394, 2004.

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

CAVALLI-SFORZA, LL; MENOZZI, P; PIAZZA, A. The history and geography of human genes. Princeton University Press, New jersey, USA. 1994

CHEN, J; ZEKENG, L; YAMASHITA, M; TAKEISHA, J; MIURA, T; IDO, E; MBOUDJEKA, I; TSAGUE, JM; HAYAMI, M; KAPTUE L. HTLV isolated from a Pygmy in Cameroon is related but distinct from the known Central African type. **AIDS Res Hum Retroviruses** 11, 1529-1531, 1995.

CIMARELLI, A; DUCLOS, CA; GESSAIN, A; CASOLI, C; BERTAZZONI, U. Clonal expansion of human T-cell leukemia virus type II in patients with high proviral load. **Virology** 223, 362-364, 1996.

COLLINS, ND; NEWBOUND, GC; ALBRECHT, B; BEARD, JL; RATNER, L; LAIRMORE, MD. Selective ablation of human T-cell lymphotropic virus type 1 p12I reduces viral infectivity in vivo. **Blood** 91, 4701-4707, 1998.

CONSTANTINE, NT; CALLAHAN, JD; WATTS, DM. Retroviral Testing. Essential for Quality Control and Laboratory Diagnosis. **CRC Press** 105-107, 1992.

COSKUN, AK & SUTTON, RE. Expression of glucose transporter 1 confers susceptibility to human T-cell leukemia virus envelope-mediated fusion. **J Virol** 79(7), 4150-4158, 2005.

DELAMARRE, L; ROSENBERG, AR; PIQUE, C; PHAM, D; CALLEBAUT, I DOKHÉLAR, MC. The HTLV-1 envelope glycoproteins: structure and functions. **J. Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol** 13, Supplement 1, S85-S91, 1996.

DE THE, G & KAZANJI, M. An HTLV-I/II vaccine: From animal models to clinical trials? **J Acq Immun Def Synd Hum Retrovirol** 13 Suppl 1, S191–S198, 1996.

DIAS-BASTOS, MR; OLIVEIRA, CDL; CARNEIRO-PROIETTI, ABF. Decline in prevalence and asymmetric distribution of human T cell lymphotropic virus 1 and 2 in blood donors, State of Minas Gerais, Brazil, 1993 to 2007. **Rev. Soc. Bras. Med. Tropical** 43(6), 615-619, 2010.

DING, W; ALBRECHT, B; LUO, R; ZHANG, W; STANLEY, JRL; NEWBOUND, GC; LAIRMORE, MD. Endoplasmic Reticulum and *cis*-Golgi Localization of Human T-Lymphotropic Virus Type 1 p12^I: Association with Calreticulin and Calnexin. **J Virol** 75(16), 7672–7682, 2001.

DOURADO, I; ALCANTARA, LCJ; BARRETO, ML; DA GLORIA, TM; GALVAO-CASTRO, B. HTLV-I in the general population of Salvador, Brazil: a city with African ethnic and sociodemographic characteristics. **J Acquir Immune Defic Syndr** 15; 34(5), 527-531, 2003.

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

ELOVAARA, I; KOENIG, S; BREWAH, AY; WOODS, RM; LEHKY, T; JACOBSON, S. High human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-specific precursor cytotoxic T lymphocyte frequencies in patients with HTLV-1-associated neurological disease. **J Exp Med** 177, 1567–1573, 1993.

FUKUMOTO, R; ANDRESEN, V; BIALUK, I; CECCHINATO, V; WALSER, JC; VALERI, VW; NAUROTH, JM; GESSAIN, A; NICOT, C; FRANCHINI, G. In vivo genetic mutations define predominant functions of the human T-cell leukemia/lymphoma virus p12^I protein. **Blood** 113, 3726- 3734, 2009.

GALLO, RC. History of the discoveries of the first human retroviruses: HTLV-1 and HTLV-2. **Oncogene** 24, 5926-5930, 2005.

GALVÃO-CASTRO, B; LOURES, L; RODRIQUES, LG; SERENO, A; FERREIRA, JOC; FRANCO, LG; MULLER, M; SAMPAIO, AS; PASSOS, LM; PROIETTI, FA. Distribution of human T-lymphotropic virus type I among blood donors: a nationwide Brazilian study [letter]. **Transfusion** 37, 242-243, 1997.

GESSAIN, A; BARIN, F; VERNANT, JC; GOUT, O; MAURS, L; CALENDER, A; DE THE, G. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. **Lancet** 2, 407-410, 1985.

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

GESSAIN, A & DE THE, G. Geographic and molecular epidemiology of primate T lymphotropic retroviruses: HTLV-I, HTLV-II, STLV-I, STLVPP, and PTLV-L. **J Acq Immun Def Synd Hum Retrovirol** 13 Suppl 1, S228–S235, 1996.

GHEZ, D; LEPELLETIER, Y; LAMBERT, S; FOURMEAU, JM; BLOT, V; JANVIER, S; ARNULF, B; VAN ENDERT, PM; HEVEKER, N; PIQUE, C; HERMINE, O. Neuropilin-1 is involved in Human T-cell Lymphotropic virus type 1 entry. **J Virol** 80, 6844-6854, 2006.

GHEZ, D; LEPELLETIER, Y; JONES, KS; PIQUE, C; HERMINE, O. Current concepts regarding the HTLV-1 receptor complex. **Retrovirology** 7, 2010.

GONÇALVES, DU; PROIETTI, FA; RIBAS, JGR; ARAÚJO, MG; PINHEIRO, SR; GUEDES, AC; CARNEIRO-PROIETTI, AB. Epidemiology, Treatment, and Prevention of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1-Associated Diseases. **Clin. Microbiol. Rev.** 23, 577-589, 2010.

GOON, PKC; IGAKURA, T; HANON, E; MOSLEY, AJ; BARFIELD, A; BARNARD, AL; KAFTANTZI, L; TANAKA, Y; TAYLOR, GP; WEBER, JN; BANGHAM, CRM. Human T Cell Lymphotropic Virus Type I (HTLV-I)-Specific CD4⁺ T Cells: Immunodominance Hierarchy and Preferential Infection with HTLV-I. **J of Immunol** 172, 735–1743, 2004.

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

HADLOCK, GK; YANG, Q; ROWE, J; FOUNG, SKH. Epitope Mapping of Human Monoclonal Antibodies Recognizing Conformational Epitopes within HTLV Type 1 gp46, Employing HTLV Type 1/2 envelope Chimeras. **AIDS Res Hum Retroviruses** 18, 57-70, 2002.

HAHN, BH; SHAW, GM; POPOVIC, MLO, MONICO, A; GALLO, RC; WONG-STAAAL, F. Molecular cloning and analysis of a new variant of human T-cell leukemia virus (HTLV-Ib) from an African patient with adult T-cell leukemia-lymphoma. **Int J Cancer** 34, 613-618, 1984.

HANCHARD, B; GIBBS, WN; LOFTERS, W; CAMPBELL, M; WILLIAMS, E; WILLIAMS, N; JAFFE, E; CRANSTON, B; PANCHOOSINGH, LD; LAGRENADE, L; WILKS, R; MURPH, E; BLATTNER, W; MANN, A. **Human Retrovirology: HTLV**. Blattner WA (ed). Raven Press: New York pp. 173–183, 1990.

HANON, E; STINCHCOMBE, JC; SAITO, M; ASQUITH, BE; TAYLOR, GP; TANAKA, Y; WEBER, JN; GRIFFITHS, GM; BANGHAM, CR. Fratricide among CD8(+) T lymphocytes naturally infected with human T cell lymphotropic virus type I. **Immunity** 13, 657-664, 2000.

IJICHI, S; IZUMO, S; EIRAKU, N. An autoaggressive process against bystander tissues in HTLV-I-infected individuals: a possible pathomechanism of HAM/TSP. **Medical Hypotheses** 41, 542-547, 1993.

ILINSKAYA, A; HEIDECKER, G; DERSE, D. Opposing Effects of a Tyrosine-based sorting motif and a PDZ-Binding motif regulate Human T-Lymphotropic Virus type 1 envelope Trafficking. **J of Virology** 84, 6995-7004, 2010.

ISHAK, R; HARRINGTON, JRW; AZEVEDO, VN; EIRAKU, N; ISHAK, MOG; GUERREIRO, JF; SANTOS, SEB; KUBO, T; MONKEN, C; ALEXANDER, S; HALL, WW. Identification of human T-cell lymphotropic virus type IIa infection in the Kayapó, an Indigenous population of Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses** 11, 813-821, 1995.

ISHAK, R; VALLINOTO, ACR; AZEVEDO, VN; ISHAK, MOG. The epidemiological aspects of retrovirus (HTLV) infections among Indian populations of the Amazon region of Brazil. **Cad Saúde Pública** 19, 901-914, 2003.

JACOBSON, S. Immunopathogenesis of human T-cell lymphotropic virus type I-associated neurologic disease. **J Infect Dis** 186(2), 187-192, 2002.

JIN, Q; AGRAWAL, L; VANHORN-ALI, Z; ALKHATIB, G. GLUT-1-independent infection of the glioblastoma/astroglioma U87 cells by the human T cell leukemia virus type 1. **Virology** 353, 99-110, 2006.

JIN, Q; ALKHATIB, B; COMETTA, K; ALKHATIB, G; Alternate receptor usage of neuropilin-1 and glucose transporter protein 1 by the Human T-cell Leukemia virus type 1. **Virology** 396, 203-212, 2009.

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

JONES, KS; PETROW-SADOWSKI, C; BERTOLETTE, DC; HUANG, Y; RUSCETTI, FW. Heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of human T-cell leukemia virus type 1 virions into CD4+ T cells. **J Virol** 79, 12692-12702, 2005.

JONES, KS; LAMBERT, S; BOUTTIER, M; BÉNIT, L; RUSCETTI, FW; HERMINE, O; PIQUE, C. Molecular Aspects of HTLV-1 Entry: Functional Domains of the HTLV-1 Surface Subunit (SU) and Their Relationships to the Entry Receptors. **Viruses** 3, 794-810, 2011.

KALYANARAMAN, VS; SARNGADHARAN, MG; ROBERT-GUROFF, M; MIYOSHI, I; GOLDE, D; GALLO, RC. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. **Science** 218(4572), 571-573, 1982.

KANNAGI, M; HARADA, S; MARUYAMA, I; INOKO, H; IGARASHI, H; KUWASHIMA, G; SATO, S; MORITA, M; KIDOKORO, M; SUGIMOTO, M; FUNAHASHI, S; OSAME, M; SHIDA, H. Predominant recognition of human T cell leukemia virus type I (HTLV-I) pX gene

products by human CD81 cytotoxic T cells directed against HTLV-I-infected cells. **Int Immunol** 3(8), 761–767, 1991.

KAPLAN, JE; OSAME, M; KUBOTA, H. The risk of development of HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis among persons infected with HTLV-I. **J Acquir Immune Defic Syndr** 3,1096-1101, 1990.

KIM, SJ; DING, W; ALBRECHT, B; GREEN, PL; LAIRMORE, MD. A conserved calcineurin-binding motif in human T lymphotropic virus type 1 p12I functions to modulate nuclear factor of activated T cell activation. **J Biol Chem** 278, 15550-15557, 2003.

KNIGHT, SC; MACATONIA, SE; CRUICKSHANK, K; RUDGE, P; PATTERSON, S. Dendritic cells in HIV-1 and HTLV-1 infection. **Adv. Exp. Med. Biol.** 329, 545-549, 1993.

KOBE, B; CENTER, RJ; KEMP, BE; POUMBOURIOS, P. Crystal structure of human T cell leukemia virus type 1 gp21 ectodomain crystallized as a maltose-binding protein chimera reveals structural evolution of retroviral transmembrane proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 96, 4319-4324, 1999.

KORALNIK, IJ; FULLEN, J; FRANCHINI, G. The p12I, p13II, and p30II proteins encoded by human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I open reading frames I and II are localized in three different cellular compartments. **J Virol** 67, 2360-2366, 1993.

KOYANAGI, Y; ITOYAMA, Y; NAKAMURA, N; TAKAMATSU, K; KIRA, J; IWAMASA, T; GOTO, I; YAMAMOTO, N. In vivo infection of human T-cell leukemia virus type I in non-T cells. **Virology** 196, 25-33, 1993.

KOZAKO, T; ARIMA, T; KUBOTA, R; AKIMOTO, M; SURUGA, Y; IZUMO, S; TOJI, S; MATSUSHITA, K; UOZUMI, K; WHITE, Y; SUZUKI, S; SHIMENO, H; ARIMA, N; SOEDA, S. Target Epitopes of HTLV-1 Recognized by Class I MHC-Restricted Cytotoxic T Lymphocytes in Patients With Myelopathy and Spastic Paraparesis and Infected Patients With Autoimmune Disorders. **J Medical Virology** 83, 501-509, 2011.

KUO, CS; MIRSALIOTIS, A; BRIGHTY, DW. Antibodies to the Envelope Glycoprotein of Human T cell Leukemia virus type I robustly activate cell-mediated cytotoxic responses and directly neutralize viral infectivity at Multiple steps of the Entry Process. **J of Immunology** 187, 361-371, 2011.

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

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

LAL, RB; BRODINE, S; KAZURA, J; MBIDDE-KATONGA, E; YANAGIHARA, R; ROBERT, C. Sensitivity and Specificity of a Recombinant Transmembrane Glycoprotein (rgp21)-Spiked Western Immunoblot for Serological Confirmation of Human T-Cell Lymphotropic Virus Type I and Type II Infections. **J of Clin Microbiol** , 296-299, 1992.

LAL, RB; BUCKNER, C; KHABBAZ, RF; KAPLAN, JE; REYES, G; HADLOCK, K; LIPKA, J; FOUNG, SK; CHAN, L; COLIGAN, JE. Isotypic and IgG subclass restriction of the humoral immune responses to human T-lymphotropic virus type-I. **Clin Immunol Immunopathol** 67(1), 40-49, 1993.

LAMBERT, S; BOUTTIER, M; VASSY, R; SEIGNEURET, M; PETROW-SADOWSKI, C; JANVIER, S; HEVEKER, N; RUSCETTI, FW; PERRET, G; JONES, KS; PIQUE, C. HTLV-1 uses HSPG and neuropilin-1 for entry by molecular mimicry of VEGF165. **Blood** 113, 5176-5185, 2009.

LAMB, D; SCHÜTTELKOPF, AW; VAN AALTEN, DMF; BRIGHT, DW. Highly specific inhibition of leukaemia virus membrane fusion by interaction of peptide antagonists with a conserved region of the coiled coil of envelope. **Retrovirology** 5, 70, 2008.

LEE, R & SCHWARTZ, RA. Human T-lymphotropic virus type 1-associated infective dermatitis: a comprehensive review. **J Am Acad Dermatol** 64(1), 152-60, 2011.

LEPOUTRE, V; JAIN, P; QUANN, K; WIGDAHL, B; KHAN, ZK. Role of resident CNS cell populations in HTLV-1-associated neuroinflammatory disease. **Front Biosci** 14, 1152-68, 2009.

LIM, DG; BOURCIER, KB; FREEMAN, GJ; HAFNER, DA. Examination of CD81 T Cell Function in Humans Using MHC Class I Tetramers: Similar Cytotoxicity but Variable Proliferation and Cytokine Production Among Different Clonal CD81 T Cells Specific to a Single Viral Epitope. **The J of Immunol** 165, 6214-6220, 2000.

LIU, HF; GOUBAU, P; VAN BRUSSEL, M; VAN LAETHEM, K; CHEN, YC; DESMYTER, J; VANDAMME, AM. The three human T-lymphotropic virus type I subtypes arose from three geographically distinct simian reservoirs. **J Gen Virol** 77, 359-368, 1996.

MAHIEUX, R ; IBRAHIM, F ; MAUCLERE, P ; HERVE, V ; MICHEL, P ; TEKAIA, F ; CHAPPEY, C ; GARIN, B ; VAN DER RYST, E ; GUILLEMAIN, B ; LEDRU, E ; DELAPORTE, E ; DE THÉ, G ; GESSAIN, A. Molecular epidemiology of 58 new African human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) strains: identification of a new and distinct HTLV-1 molecular subtype in Central Africa and in Pygmies. **Journal of Virology** 71, 1317-1333, 1997.

MAHIEUX, R; VCHAPPEY, C; GEORGES-COURBOT, MC; DUBREUIL, G; MAUCLERE, P; GEORGES, A; GESSAIN, A. Simian T-cell lymphotropic virus type I from *Mandrillus sphinx* as a simian counterpart of human T-cell lymphotropic virus type I subtype D. **J Virol** 72, 10316-10322, 1998.

MAJOROVITS, E; NEJMEDDINE, M; TANAKA, Y; TAYLOR, GP; FULLER, SD; BANGHAM, CRM. Human T-Lymphotropic Virus-1 Visualized at the Virological Synapse by Electron Tomography. **Plos One** 3, 2008.

MALIK, KT; EVEN, J; KARPAS, A. Molecular cloning and complete nucleotide sequence of an adult T cell leukaemia virus/human T cell leukaemia virus type I (ATLV/HTLV-I) isolate of Caribbean origin: relationship to other members of the ATLV/HTLV-I subgroup. **J Gen Virol** 69, 1695-1710, 1988.

MANEL, N; KIM, FJ; KINET, S; TAYLOR, N; SITBON, M; BATTINI, JL. The Ubiquitous Glucose Transporter GLUT-1 Is a Receptor for HTLV. **Cell** 115, 449-459, 2003.

MANEL, N; KINET, S; JIM, FJ; TAYLOR, N; SITBON, N; BATTINI, JL. GLUT-1 is the receptor os retrovirus HTLV. **Med Sci** 20 (3), 277-279, 2004.

MANEL, N; BATTINI, JL; TAYLOR, N; SITBON, N. HTLV-1 tropism and envelope receptor. **Oncogene** 24 (39), 6016-6025, 2005.

MARTIN, F; BANGHAM, CRM; CIMINALE, V. LAIRMORE, MD; MURPHY, EL; SWITZER,WM; MAHIEUX, R. Conference highlights of the 15th international conference on human retrovirology: HTLV and related retroviruses, 4-8 june 2011, Leuven, Gembloux, Belgium. **Retrovirology** 8, 86, 2011.

MATSUOKA, M. Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) infection and the onset of adult T-cell leukemia (ATL). **Retrovirology** 2, 2005.

MATSUOKA, M & JEANG, KT. Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. **Nature** 7, 2007.

MATSUOKA, M & GREEN, PL. The HBZ gene, a key player in HTLV-1 pathogenesis. **Retrovirology** 6, 71, 2009.

MICHAEL, B; NAIR, AM; LAIRMORE, MD. Role of accessory proteins of HTLV-1 in viral replication, T cell activation and cellular gene expression. **Front. Biosci.** 9, 2527-2539, 2004.

MIURA, T; FUKUNAGA, T; IGARASHI, T; YAMASHITA, M; IDO, E; FUNAHASHI, S; ISHIDAC, T; WASHIO, K; UEDAC, S; HASHIMOTO, K; YOSHIDA, M; OSAME, M; SINGHAL, BS; ZANINOVIC, V; CARTIER, L; SONODA, S; TAJIMA, K; INA, Y; GOJOBORI, T; HAYAMI, M. Phylogenetic subtypes of human T-lymphotropic virus type I and their relations to the anthropological background. **Proc Natl Acad Sci USA** 91, 1124-1127, 1994.

MIURA, T; YAMASHITA, M; ZANINOVIC, V; CARTIER, L; TAKEHISA, J; IGARASHI, T; IDO, E; FUJIYOSHI, T; SONODA, S; TAJIMA, K; HAYAMI, M. Molecular phylogeny of human T-cell leukemia virus type I and II of Amerindians in Colombia and Chile. **J Mol Evol** 44, S76-S82, 1997.

MOCHIZUKI, M; WATANABE, T; YAMAGUCHI, K; TAJIMA, K; YOSHIMURA, K; NAKASHIMA, S; SHIRAO, M; ARAKI, S; MIYATA, N; MORI, S; TAKATSUKI, K. Uveitis associated with human T lymphotropic virus type I: seroepidemiologic, clinical and virologic studies. **The Journal of Infectious Diseases** 166, 943-4, 1992.

MOCHIZUKI, M; ONO, A; IKEDA, E; HIKITA, N; WATANABE, T; YAMAGUCHI, K; SAGAWA, K; ITO, K. HTLV-I uveitis. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol** 13 Suppl 1, S50-56, 1996.

MORENO-CARVALHO, OA; SANTOS, JI; Di CREDICO, G. Evidence of preferential female prevalence of HTLV-I associated tropical spastic paraparesis in Bahia-Brazil. **Arq. Neuropsiquiatr.** 50, 183-188, 1992.

MORGAN, OS; RODGERS-JOHNSON, P; MORA, C; CHAR, G. HTLV-1 and polymyositis in Jamaica. **Lancet** 18 (2), 1184-1187, 1989.

MORIUCHI, M & MORIUCHI, H. Transforming growth factor- β enhances human T-cell leukemia virus type I infection. **J Medical Virology** 67, 427-430, 2002.

MOTA, AC; VAN DOOREN, S; FERNANDES, FM; PEREIRA, SA; QUEIROZ, AT; GALAZZI, VO; VANDAMME, AM; GALVÃO-CASTRO, B; ALCANTARA, LC. 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** 23(4), 503-507, 2007.

MUELLER, N. The epidemiology of HTLV-I infection. **Cancer Causes Control** 2(1), 37-52, 1991.

MUELLER, N; OKAYAMA, A; STUVER, S; TACHIBANA, N. Findings from the Miyazaki Cohort Study. **J Acq Immun Def Synd Hum Retrovirol** 13 Suppl 1, S2-S7, 1996.

NAGAI, M; BRENNAN, MB; SAKAI, JA; MORA, CA; JACOBSON, S. CD8⁺ T-cells are an in vivo reservoir for human T-cell lymphotropic virus type I. **Blood** 98, 1858-1861, 2000.

NATH, MD; RUSCETTI, FW; PETROW-SADOWSKI, C; JONES, KS. Regulation of the cell-surface expression of an HTLV-I binding protein in human T-cells during immune activation. **Blood** 101, 3085-3092, 2003.

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

NEJMEDDINE, M & BANGHAM, CRM. The HTLV-1 Virological Synapse. **Viruses** 2, 1427-1447, 2010.

NICOT, C; DUNDR, M; JOHNSON, JM; FULLEN, JR; ALONZO, N; FUKUMOTO, R; PRINCLER, GL; DERSE, D; MISTELI, T; FRANCHINI, G. HTLV-1-encoded p30^{II} is a post-transcriptional negative regulator of viral replication. **Nature Medicine** 10, 197-201, 2004.

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

OLIVEIRA, MDEF; BRITES, C; FERRAZ, N; MAGALHAES, P; ALMEIDA, F; BITTENCOURT, AL. Infective dermatitis associated with the human T cell lymphotropic virus type I in Salvador, Bahia, Brazil. **Clin Infect Dis** 40, 90-6, 2005.

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

OSAME, M. Pathological Mechanisms of human T-cell lymphotropic virus typeI-associated myelopathy (HAM-TSP). **J Neurovirol** 8 (5), 359-364, 2002.

PAIS-CORREIA, AM; SACHSE, M; GUADAGNINI, S; ROBBIATI, V; LASSERRE, R; GESSAIN, A; GOUT, O; ALCOVER, A; THOULOZE, MI. Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses. **Nat Med** 16(1), 83-90, 2010.

PAQUETTE, Y; HANNA, Z; SAVARD, P; BROUSSEAU, R; ROBITAILLE, Y; JOLICOUER, P. Retrovirus-induced murine motor neuro disease: mapping the determinant of spongiform degeneration with the envelope gene. **Proc Natl Acad Sci USA** 86 (10), 3896-3900, 1989.

PARKER, CE; DAENKE, S; NIGHTINGALE, S; BANGHAM, CRM. Activated, HTLV-I-specific cytotoxic T-lymphocytes are found in healthy seropositives as well as in patients with tropical spastic paraparesis. **Virology** 188, 628-636, 1992.

PINON, JD; KLASSE, PJ; JASSAL, SR; WELSON, S; WEBER, J; BRIGHTY, DW; SATTENTAU, QJ. Human T-cell leukemia virus type 1 envelope glycoprotein gp46 interacts with cell surface heparan sulfate proteoglycans. **J Virol** 77, 9922-9930, 2003.

PIQUE, C; CONNAN, F; LEVILAIN, JP; CHOPPIN, J;DOKHÉLAR, MC. Among all Human T-cell Leukemia Virus Type 1 Proteins, Tax, Polymerase, and Envelope Proteins are Predicted as Preferential targets for the HLA-A2 Restricted Cytotoxic T-cell Response. **J of Virol** 4919-4926, 1996.

POIESZ, BJ; RUSCETTI, FW; GAZDAR, AF; BUNN, PA; MINNA, JD; GALLO, RC. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. **Proc Natl Acad Sci USA** 77, 7415-7419, 1980.

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

REICH, DE & GOLDSTEIN, DB. Genetic evidence for a paleolithic human population expansion in Africa. **Proc Natl Acad Sci USA** 95, 8119-8123, 1998.

RICHARDSON, JH; EDWARDS, AJ; CRUICKSHANK, JK; RUDGE, P; DALGLEISH, AG. In vivo cellular tropism of human T-cell leukemia virus type 1. **J Virol** 64, 5682-5687, 1990.

RODRIGUES, N. **Os africanos no Brasil**. 9: 13-70. Companhia Editora Nacional (5^a ed), São Paulo, Brasil. 1977

ROMAN, GC & OSAME, M. Identity of HTLV-I-associated tropical spastic paraparesis and HTLV-I-associated myelopathy. **Lancet** 19;1(8586), 651, 1988.

ROSENBERG, A; DELAMARRE, L; PREIRA, A; DOKHELAR, MC. Analysis of functional Conservation in the Surface and Transmembrane Glycoprotein Subunits of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 (HTLV-1) and HTLV-2. **J of Virol** 7609–7614, 1998.

SAGARA, Y; INOUE, Y; SHIRAKI, H; JINNO, A; HOSHINO, H; MAEDA, Y. Identification and Mapping of Functional Domains on Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 Envelope Proteins by Using Synthetic Peptides. **J of Virol** 70 (3), 1564-1569, 1996.

SAITO, M; MATSUZAKI, T; SATOU, Y. In vivo expression of the HBZ gene of HTLV-1 correlates with proviral load, inflammatory markers and disease severity in HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). **Retrovirology** 6, 19, 2009.

SALEMI, M; VAN DOOREN, S; AUDENAERT, E; DELAPORTE, E; GOUBAU, P; DESMYTER, J; VANDAMME, AM. Two new human T-lymphotropic virus type I phylogenetic subtypes in seroindeterminates, a Mbuti pygmy and a Gabonese, have close relatives among African STLV-I strains. **Virology** 246, 277-287, 1998.

SALEMI, M. **Molecular investigations of the origin and genetic stability of the human T-cell lymphotropic viruses**. PHD tesis in Katholieke Universiteit Leuven. Rega Instituut. 1999.

SATOU, Y; YASUNAGA, JI; YOSHIDA, M; MATSUOKA, M. HTLV-I basic leucine zipper factor gene mRNA supports proliferation of adult T cell leukemia cells. **Proc Natl Acad Sci USA** 17, 103(3), 720–725, 2006.

SATOU, Y & MATSUOKA, M. HTLV-1 and the Host Immune System : How the Virus Disrupts Immune Regulation, Leading to HTLV-1 Associated Diseases. **J Clin Exp Hematopathol** 50, 2010.

SEGURADO, ACC; BIASUTTI, C; ZEIGLER, R; RODRIGUES, C; DAMAS, CD; JORGE, MLSG; MACHIORI, PE. Identification of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) subtypes using restricted fragment length polymorphism in a cohort of asymptomatic carriers and patients with HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis from São Paulo, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 97, 329-333, 2002.

SEIKI, M; HATTORI, S; HIRAYAMA, Y; YOSHIDA, M. Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. **Proc Natl Acad Sci USA** 80, 3618-3622, 1983.

SEIKI, M; EDDY, R; SHOWS, TB; YOSHIDA, M. Nonspecific integration of the HTLV provirus genome into Adult t-cell leukemia cells. *Nature* 309, 640-642, 1984.

SETOYAMA, M; KERDEL, FA; ELGART, G; KANZAKI, T; BYRNES, JJ. Detection of HTLV-1 by polymerase chain reaction in situ hybridization in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Am J Pathol* 152, 683–689, 1998.

SHIMOYAMA, M. Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukaemia-lymphoma. A report from the Lymphoma Study Group (1984-87). *Br J Haematol* 79(3), 428-437, 1991.

SHINDO, N; ALCANTARA, LCJ, Van Dooren, S; SALEMI, M; COSTA, MCR; KASHIMA, S; COVAS, DT; TEVA, A; PELLEGRINI, M; BRITO, I; VANDAMME, AM; GALVAO-CASTRO, B. Human Retroviruses (HIV and HTLV) in Brazilian Indians: Seroepidemiological Study and Molecular Epidemiology of HTLV Type 2 Isolates. *AIDS Res and Hum Retrov* 18(1), 71-77, 2002.

SILVERMAN, LR; PHIPPS, AJ; MONTGOMERY, A; RATNER, L; LAIRMORE, MD. Human T-cell lymphotropic virus type 1 open reading frame II-encoded p30II is required for in vivo replication: evidence of in vivo reversion. *J Virol* 78, 3837-3845, 2004.

SLATTERY, JP; FRANCHINI, G; GESSAIN, A. Genomic Evolution, Patterns of Global Dissemination, and Interspecies Transmission of Human and Simian T-cell Leukemia/Lymphotropic Viruses. *Genome Res.* 9, 525-540, 1999.

SZUREK, PF; YUEN, PH; JERZY, R; WONG, PK. Identification of point mutations in the envelope gene of Moloney murine leukemia virus TB temperature-sensitive paratitogenic mutant ts1: molecular determinants for neurovirulence. *J Virol* 62 (1), 357-360, 1988.

TALLET, B; ASTIER-GIN, T; MOYNET, D; LONDOS-GAGLIARDI, D; GUILLEMAIN, B. Sequence Variations in the Amino- and Carboxy-Terminal Parts of the Surface Envelope Glycoprotein of HTLV Type 1 Induce Specific Neutralizing Antibodies. *AIDS Res. And Hum. Retrov.* 17, 337-348, 2001.

TAYLOR, GP. Pathogenesis and treatment of HTLV-1 associated myelopathy. *Sex Transm Inf* 74, 316-322, 1998.

THÉBAULT, S; BASBOUS, J; HIVIN, P; DEVAUX, C; MESNARD, JM. HBZ interacts with JunD and stimulates its transcriptional activity. *FEBS lett.* 562, 165-170, 2004.

THORSTENSSON, R; ALBERT, J; ANDERSON, R;. Strategies for diagnosis of HTLV-I and – II. *Transfusion.*42, 780-791, 2002.

TROVATO, R; MULLOY, JC; JOHNSON, JM; TAKEMOTO, S; DE OLIVEIRA, MP; FRANCHINI, G. A lysine-to-arginine change found in natural alleles of the human T-cell lymphotropic/leukemia virus type 1 p12(I) protein greatly influences its stability. *J Virol* 73, 6460-6467, 1999.

VANDAMME, AM; LIU, HF; GOUBAU, P; DESMYTER, J. Primate T-lymphotropic virus type I LTR sequence variation and its phylogenetic analysis: compatibility with an African origin of PTLV-I. **Virology** 202, 212-223, 1994.

VAN DOOREN, S; GOTUZZO, E; SALEMI, M; WATTS, D; AUDENAERT, E; DUWE, S; ELLERBROK, H; GRASSMANN, R; HAGELBERG, E; DESMYTER, J; VANDAMME, AM. Evidence for a post-Columbian introduction of HTLV-I in Latin America. **J Gen Virol** 79, 2695-2708, 1998.

VERGER, P. **Flux et reflux de la traite des nègres entre le Golfe de Benin et Bahia de Todos os Santos**. Mouton, Paris. 1968

VIANA FILHO, L. **O negro na Bahia**. 31-224. Nova Fronteira (3^a ed), Rio de Janeiro, Brasil. 1988.

YAMAGUCHI, K. Human T-lymphotropic virus type I in Japan. **Lancet** 343, 213–216, 1994.

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

YASUNAGA, JI & MATSUOKA, M. Human T-Cell Leukemia Virus Type I Induces Adult T-Cell Leukemia: From Clinical Aspects to Molecular Mechanisms. **Cancer Control** 14, 133-140, 2007.

YOSHIDA, M; MIYOSHI, I; HINUMA, Y. Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of Human Adult T-cell Leukemia and its implication in the disease. **Proc. Natl. Acad. Sci USA** 79, 2031-2035, 1982.

WATTEL, E; VARTANIAN, JP; PANNETIER, C; WAIN-HOBSON, S. Clonal expansion of human T-cell leukemia virus type I-infected cells in asymptomatic and symptomatic carriers without malignancy. **J Virol** 69(5), 2863-2868, 1995.

WOLFE, ND; HENEINE, W; CARR, JK; GARCIA, AD; SHANMUGAM, V; TAMOUFE, U; TORIMIRO, JN *et al.*: Emergence of unique primate T-Lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. **Proc Natl Acad Sci USA** 22, 7994-7999, 2005.