



ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E SAÚDE HUMANA

ALISSON DE AQUINO FIRMINO

**QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PROVIRAL DO HTLV-1 E AVALIAÇÃO DA
SUSCETIBILIDADE CÉRVICO-VAGINAL NA COINFECÇÃO COM HPV**

TESE DE DOUTORADO

SALVADOR
2023

ALISSON DE AQUINO FIRMINO

**QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PROVIRAL DO HTLV-1 E AVALIAÇÃO DA
SUSCETIBILIDADE CÉRVICO-VAGINAL NA COINFECÇÃO COM HPV**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
Stricto Sensu em Medicina e Saúde Humana da
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública como
requisito parcial para obtenção do título de Doutor
em Medicina e Saúde Humana.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Fernanda Rios
Grassi

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Gustavo Regis da
Silva

SALVADOR
2023

Ficha Catalográfica elaborada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas

F525 Firmino, Alisson de Aquino

Quantificação da carga proviral do HTLV-1 e avaliação da suscetibilidade
cérvico-vaginal na coinfeção com HPV. / Alisson de Aquino Firmino – 2023.
110f.: 30cm.

Orientadora: Prof.^a Dra. Maria Fernanda Rios Grassi

Coorientador: Prof.^o Dr. Carlos Gustavo Regis da Silva

Doutor em Medicina e Saúde Humana

Inclui bibliografia

1. HTLV-1. 2. Carga proviral. 3. HPV. 4. Câncer cervical. I. Grassi, Maria
Fernanda Rios. II. Quantificação da carga proviral do HTLV-1 e avaliação da
suscetibilidade cérvico-vaginal na coinfeção com HPV.

CDU: 616.9

ALISSON DE AQUINO FIRMINO

**“QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PROVIRAL DO HTLV-1 E AVALIAÇÃO DA
SUSCETIBILIDADE CÉRVICO-VAGINAL NA COINFECÇÃO COM HPV”**

Tese apresentada à Escola Bahiana de
Medicina e Saúde Pública, como
requisito parcial para a obtenção do
Título de Doutor em Medicina e Saúde
Humana.

Salvador, 19 de dezembro de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Ana Rita Coimbra Motta de Castro
Doutora em Biologia Parasitária.

Universidade Federal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, UFMS

Dra. Fernanda Khouri Barreto
Doutora em Biotecnologia em Medicina e Saúde Investigativa
Universidade Federal da Bahia, UFBA

Dra. Márcia Sacramento Cunha Machado
Doutora em Medicina e Saúde Humana
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, EBMSP

Dra. Rita Elizabeth Moreira Mascarenhas
Doutora em Biologia Celular e Molecular
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, EBMSP

Prof. Dr. Clarkson Plácido Conceição dos Santos
Doutor em Medicina e Saúde Humana
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, EBMSP

Aos meus pais Elza e Joel por todo amor incondicional; aos meus irmãos Vinicius e Cláudia.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela onipresença durante essa importante etapa da minha vida acadêmica e profissional.

À minha querida orientadora, Dr.^a Maria Fernanda Rios Grassi, por esses 10 anos de ensinamentos, conselhos, dedicação e amizade. Serei eternamente grato por ter encontrado a melhor pessoa dentre tantas outras para trilhar essa longa trajetória.

Ao Dr. Bernardo Galvão Castro Filho por todo conhecimento transmitido, pela imensa generosidade, pelo privilégio de conhecê-lo e por ser essa referência a ser seguida.

Ao meu coorientador, Dr. Carlos Gustavo Regis da Silva, pelos direcionamentos laboratoriais e pelo auxílio científico.

À Dr.^a Luana Leandro Gois por todo suporte nas análises laboratoriais e nas produções acadêmicas.

À Dr.^a Adenilda Lima Lopes Martins e ao Dr. Paulo Roberto Tavares Gomes Filho pelas parcerias firmadas para a realização deste trabalho.

Aos alunos de iniciação científica Taiane Silva Paixão, Jean Paulo Lacerda Araújo e Mariana Lima Drumond pelas contribuições na execução das atividades.

Aos pacientes do Centro de HTLV que aceitaram voluntariamente participar deste estudo, sempre dispostos a colaborar.

Ao Laboratório BMCITO pela contribuição nas análises citopatológicas.

Ao Instituto Nacional do Câncer – INCA pela execução do sequenciamento de nova geração.

Aos profissionais do Centro de HTLV e da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública pela presteza e constante apoio.

Aos funcionários do Laboratório Avançado de Saúde Pública – LASP da Fundação Oswaldo Cruz – BA por serem solícitos, sempre dispostos a auxiliar em qualquer eventual necessidade de suporte.

Aos colegas e professores da Pós-graduação em Medicina e Saúde Humana da EBMSP por todos os ensinamentos, parcerias e companheirismo no decurso do mestrado e do doutorado.

E por fim, aos meus amados pais, irmãos, sobrinhos e amigos por todo carinho, cuidado, amor e, principalmente, incentivo durante todos esses anos.

*“Se toda coincidência
Tende a que se entenda
E toda lenda
Quer chegar aqui
A ciência não se aprende
A ciência apreende
A ciência em si.”*

(Gilberto Gil)

INSTITUIÇÕES ENVOLVIDAS

Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP)

Instituto Gonçalo Moniz - Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-BA)

Instituto Nacional de Câncer (INCA)

FONTES DE FINANCIAMENTO

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

Instituto Gonçalo Moniz - Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-BA)

RESUMO

Introdução: Estima-se que 5-10 milhões de pessoas estejam infectadas pelo Vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1 (HTLV-1) no mundo. A prevalência da infecção é maior em mulheres e a relação sexual tem sido descrita como uma importante via de transmissão. A presença do HTLV-1 no ambiente cérvico-vaginal desencadeia uma resposta imunológica local, e em algumas mulheres, pode levar a uma menor lubrificação vaginal. A alteração do ambiente vaginal induzida pela infecção do HTLV-1 pode aumentar a suscetibilidade a outras infecções sexualmente transmissíveis, como o papilomavírus humano (HPV). **Objetivos:** Avaliar a carga proviral (CPV) do HTLV-1 no fluido vaginal e caracterizar a infecção cérvico-vaginal por HPV em mulheres vivendo com HTLV-1. **Métodos:** Trata-se de um estudo de corte transversal. Através de atendimentos consecutivos em um centro multidisciplinar para pacientes com HTLV em Salvador, Bahia, Brasil, mulheres infectadas pelo HTLV-1 e mulheres não infectadas (acompanhantes ou familiares das pacientes), foram atendidas em consultas clínicas e submetidas a punção venosa para coleta de sangue, além de exames ginecológicos para obtenção de amostras de fluido vaginal que foram coletadas com *swabs* estéreis da ectocérvice, endocérvice e paredes vaginais. A CPV do HTLV-1 foi quantificada pela reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) e expressa como o número de cópias de células do HTLV-1/ 10^6 em amostras de sangue e fluido vaginal. O diagnóstico do HPV foi realizado por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando primers para amplificar um fragmento de DNA da região L1 do genoma viral. Todas as amostras positivas para PCR de HPV foram submetidas ao sequenciamento de nova geração (NGS) por meio da plataforma Illumina e ao método de Sanger. A microscopia óptica foi utilizada para avaliar a citopatologia cérvico-vaginal e a microbiota vaginal. **Resultados:** A CPV vaginal do HTLV-1 foi avaliada em 56 mulheres infectadas pelo HTLV-1 (43 assintomáticas e 13 com diagnóstico de mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP)). A CPV foi menor no fluido vaginal [mediana: 451,9 cópias/ 10^6 células (IIQ: 0 - 2,490)] quando comparada às células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) [mediana: 23,264 cópias/ 10^6 células (IIQ: 6,776 - 60,036)] ($p < 0,0001$). Observou-se que a CPV no fluido vaginal se correlaciona diretamente com a CPV nas PBMCs ($r = 0,37$, $p = 0,006$). A CPV foi detectada no fluido vaginal de 24 de 43 (55,8%) mulheres assintomáticas em comparação com 12 de 13 (92,3%) pacientes com HAM/TSP, $p = 0,02$. As análises citopatológicas não revelaram diferenças entre mulheres com CPV detectável ou indetectável. Outro grupo de 155 mulheres (79 infectadas pelo HTLV-1 e 76 não infectadas) foi avaliado para a caracterização do HPV em fluido cérvico-vaginal. A PCR para HPV revelou 23 amostras positivas, 15 em mulheres infectadas pelo HTLV-1 (19%) e 8 em não infectadas (10,5%) ($p = 0,13$). Foram identificados vinte e três tipos de HPV nos grupos estudados, apenas três tipos (31, 54 e 58) foram detectados em ambos. Observou-se uma distribuição percentual equilibrada desses tipos de HPV, com exceção do tipo 58 de alto risco, que estava presente em 38,1% das mulheres infectadas pelo HTLV-1. 61,9% das mulheres infectadas pelo HTLV-1 apresentaram um ou mais tipos de HPV de provável ou efetivo alto risco oncogênico em suas análises. Nas mulheres não infectadas, essa proporção foi de 44,44%. Não foram encontradas diferenças significativas em relação aos achados citopatológicos. **Conclusão:** A CPV do HTLV-1 é detectável no fluido vaginal e se correlaciona diretamente com a do sangue periférico. As mulheres infectadas pelo HTLV-1 têm uma maior frequência do HPV do tipo 58 de alto risco. Mais estudos são necessários para determinar se a presença do HTLV-1 no ambiente vaginal influencia o curso da infecção pelo HPV e o desenvolvimento do câncer cervical.

Palavras-chave: HTLV-1. Carga proviral. HPV. Câncer cervical

ABSTRACT

Introduction: It is estimated that 5-10 million people are infected with Human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) worldwide. The prevalence of infection is higher in women and sexual intercourse has been described as an important route of transmission. The presence of HTLV-1 in the cervicovaginal environment triggers a local immunological response, and in some women, it can lead to less vaginal lubrication. The alteration of the vaginal environment induced by HTLV-1 infection may increase susceptibility to other sexually transmitted infections, such as human papillomavirus (HPV). **Objective:** To evaluate the proviral load (PVL) of HTLV-1 in vaginal fluid and characterize cervicovaginal HPV infection in women living with HTLV-1. **Methods:** This is a cross-sectional study. Through consecutive care at a multidisciplinary center for patients with HTLV in Salvador, Bahia, Brazil, women infected with HTLV-1 and uninfected women (companions or family members of the patients) were seen in clinical consultations and underwent venipuncture to collect blood, in addition to gynecological examinations to obtain samples of vaginal fluid that were collected with sterile swabs from the ectocervix, endocervix and vaginal walls. PVL of HTLV-1 was quantified using real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) and expressed as the number of copies of HTLV-1/ 10^6 cells in blood and vaginal fluid samples. HPV diagnosis was performed by polymerase chain reaction (PCR) using primers to amplify a DNA fragment from the L1 region of the viral genome. All HPV PCR-positive samples were subjected to next-generation sequencing (NGS) using the Illumina platform and to Sanger sequencing. Light microscopy was used to evaluate cervicovaginal cytopathology and vaginal microbiota. **Results:** HTLV-1 vaginal PVL was assessed in 56 HTLV-1-infected women (43 asymptomatic and 13 diagnosed with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP)). PVL was lower in vaginal fluid [median: 451,9 copies/ 10^6 cells (IQR: 0 – 2.490)] than in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) [median: 23.264 copies/ 10^6 cells (IQR: 6.776 - 60.036)] ($p < 0.0001$). PVL in vaginal fluid was observed to directly correlate with PVL in PBMCs ($r = 0.37$, $p = 0.006$). PVL was detected in the vaginal fluid of 24 of 43 (55.8%) asymptomatic women compared with 12 of 13 (92.3%) patients with HAM/TSP, $p = 0.02$. Cytopathological analyzes revealed no differences between women with detectable or undetectable PVL. Another group of 155 women (79 HTLV-1-infected and 76 uninfected) was evaluated for the characterization of HPV in cervicovaginal fluid. HPV PCR revealed 23 positive samples, 15 in women infected by HTLV-1 (19%) and 8 in uninfected women (10.5%) ($p = 0.13$). Twenty-three types of HPV were identified in the groups studied, only three types (31, 54 and 58) were detected in both. A balanced percentage distribution of these HPV types was observed, with the exception of high-risk type 58, which was present in 38.1% of HTLV-1-infected women. 61.9% of women infected with HTLV-1 had a high-risk type or a probable high-risk type in their analyses. In uninfected women, this proportion was 44.44%. No significant differences were found in relation to cytopathological findings. **Conclusion:** HTLV-1 PVL is detectable in vaginal fluid and directly correlates with that in peripheral blood. Women infected with HTLV-1 have a higher frequency of high-risk HPV type 58. Further studies are needed to determine whether the presence of HTLV-1 in the vaginal environment influences the course of HPV infection and the development of cervical cancer.

Keywords: HTLV-1. Proviral load. HPV. Cervical cancer

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Organização genômica do HTLV-1	19
Figura 2. Distribuição geográfica dos principais focos de infecção pelo HTLV-1 no mundo. 20	
Figura 3. Mapa da prevalência de infecção por HTLV-1 em doadores de sangue no Brasil ... 21	
Figura 4. Fluxograma de testes laboratoriais para o diagnóstico da infecção por HTLV no Brasil, empregando testes confirmatórios sorológicos ou moleculares	25
Figura 5. Representação esquemática do genoma do HPV	28
Figura 6. Prevalência de HPV entre mulheres com citologia cervical normal no mundo.....	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Doenças associadas com a infecção pelo HTLV-1.....	23
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIS – Adenocarcinoma *in situ*

ASC-H – *Atypical Squamous Cells Cannot Exclude High-grade Squamous Intraepithelial Lesions* (Atipia de Células Escamosas, Sem Excluir Lesão Intraepitelial de Alto Grau)

ASC-US – *Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance* (Atipia de Células Escamosas de Significado Indeterminado)

ATLL – *Adult T-cell Leukemia/Lymphoma* (Leucemia/Linfoma de células T do Adulto)

BLV – *Bovine leukemia virus* (Vírus da Leucemia Bovina)

CAF – Cirurgia de Alta Frequência

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

CKC – *Cold Knife Conization* (Excisão de Cone com Faca Fria)

CPV – Carga Proviral

DIH – Dermatite Infecciosa Associada ao HTLV-1

DNA – *Deoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucleico)

ELISA – *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática)

EBMSP – Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

HAM/TSP – *HTLV-1-Associated Myelopathy / Tropical Spastic Paraparesis* (Mielopatia Associada ao HTLV-1/Paraparesia Espástica Tropical)

HBZ – (*HTLV-I bZIP factor gene*)

HPV - *Human Papillomavirus* (Papilomavírus humano)

HSIL – *High-Grade Squamous Intraepithelial Lesion* (Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau)

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

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

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

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

IDH – Índice de Desenvolvimento Humano

IL – Interleucina

IST – Infecções Sexualmente Transmissíveis

LAMP – *Loop-mediated Isothermal Amplification* (Amplificação Isotérmica de Ácidos Nucleicos Mediada por Alça)

LCR – Líquido Cefalorraquidiano

LCR – *Long Control Region*

LIA – *Line Immunoassay*

LSIL – *Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion* (Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau)

LTR – *Long Terminal Repeat* (Repetições Terminais Longas)

NGS – *Next-Generation Sequencing* (Sequenciamento de Nova Geração)

NIC – Neoplasia Intraepitelial Cervical

NILM – *Negative for Intraepithelial Lesion or Malignancy* (Negativo para Lesão Intraepitelial ou Malignidade)

PBMCs – *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (Células Mononucleares do Sangue Periférico)

PBS – *Phosphate Buffered Saline* (Tampão Fosfato-Salino)

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

PTLVs – *Primate T-lymphotropic viruses* (Vírus Linfotrópicos de Células T de Primatas)

PVHTLV – Pessoas vivendo com o HTLV

RNA – *Ribonucleic acid* (Ácido ribonucleico)

RT-qPCR – *Real-time quantitative polymerase chain reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real)

STLV – *Simian T-Cell Leukemia Virus* (Vírus da Leucemia de Células T Símias)

VLPs – *Virus-like particles* (Partículas Semelhantes a Vírus)

TCLE – Termo de Consentimento Live e Esclarecido

Th1 – *T helper 1*

Th2 – *T helper 2*

Th17 – *T helper 17*

Tris-EDTA – *Hydroxymethyl-Ethylenediaminetetraacetic acid* (Hidroximetil-Etileno Diamino Tetra-Acético)

WB – *Western Blot*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	Geral	17
2.2	Específicos	17
3	REVISÃO DA LITERATURA	18
3.1	Vírus Linfotrópico de Células T Humanas (HTLV)	18
3.1.1	Vírus Linfotrópico de Células T Humanas tipo 1 (HTLV-1)	18
3.1.1.1	Caracterização do HTLV-1	18
3.1.1.2	Epidemiologia.....	19
3.1.1.3	Transmissão	21
3.1.1.4	Manifestações Clínicas	22
3.1.1.5	Coinfecções.....	23
3.1.1.6	Diagnóstico	24
3.1.1.7	Carga proviral	25
3.2	Papilomavírus Humano (HPV)	27
3.2.1	Caracterização do HPV	27
3.2.2	Epidemiologia.....	28
3.2.3	Transmissão	30
3.2.4	Manifestações Clínicas	30
3.2.5	Diagnóstico	31
3.2.6	Tipos de HPV	33
3.2.7	Tratamento e Prevenção	34
4	RESULTADOS	36
4.1	HTLV-1 Proviral Load in Vaginal Fluid Correlates with Levels in Peripheral Blood Mononuclear Cells	36
4.2	HTLV-1 Infection and Cervicovaginal Susceptibility to High-Risk HPV: Findings from Women Living with HTLV-1 in Salvador, Brazil	47
5	DISCUSSÃO	73
6	CONCLUSÃO	76
	REFERÊNCIAS	77
	APÊNDICES	95
	ANEXOS	107

1 INTRODUÇÃO

Estima-se que 5-10 milhões de pessoas estejam infectadas pelo Vírus Linfotrópico de Células T Humanas tipo 1 (HTLV-1) no mundo. O vírus está presente em diferentes regiões no Brasil com prevalências variando de acordo com a região geográfica, totalizando em torno de 800 mil portadores no país ⁽¹⁾. A Bahia é um dos estados com maior prevalência do HTLV-1 com cerca de 130 mil pessoas infectadas ⁽²⁾. Em Salvador, a frequência da infecção na população geral é de 1,8%, variando de 1,2% no sexo masculino a 2,0% no sexo feminino. Com maior prevalência em mulheres, o vírus atinge 10% daquelas com idade acima dos 50 anos ⁽³⁾. A transmissão do HTLV-1 ocorre através da via horizontal (contato sexual, transfusão de sangue, compartilhamento de seringas e materiais perfurocortantes contaminados) e pela via vertical (amamentação, transmissão transplacentária ou durante o parto) ^(1,4,5). Um estudo de base populacional indicou que a transmissão sexual entre adultos é a principal via de infecção na população geral de Salvador ⁽⁶⁾.

O HTLV-1 se integra ao genoma da célula na forma de um provírus. As células T infectadas produzem poucas partículas virais livres; portanto, a quantificação do vírus integrado (provírus) é expressa como carga proviral (CPV) ⁽⁷⁾. Apesar de se manter estável, a carga proviral varia consideravelmente entre indivíduos, sendo um importante preditor de doenças associadas ao HTLV-1. É classificada como um fator de risco para o desenvolvimento da Mielopatia Associada ao HTLV-1/Paraparesia Espástica Tropical (HAM/TSP), além de ser frequentemente avaliada em pacientes com a Leucemia/ Linfoma de células T do Adulto (ATLL), doenças que costumam apresentar níveis elevados ⁽⁸⁻¹¹⁾. A presença do HTLV-1 foi detectada no sêmen e nas secreções cérvico-vaginais de pessoas vivendo com o HTLV (PVHTLV) ^(12,13). Embora tenha sido relatada maior eficácia da transmissão sexual de homem para mulher, a transmissão de mulher para homem também ocorre e, portanto, não deve ser negligenciada ⁽¹⁴⁻¹⁷⁾. O HTLV-1 infecta principalmente linfócitos T CD4+, bem como linfócitos T CD8+ em menor extensão ⁽¹⁸⁾. Em geral, a proporção de linfócitos é maior no líquido seminal do que no fluido vaginal de indivíduos saudáveis ⁽⁷⁾, o que pode explicar em parte a maior eficácia da transmissão do HTLV-1 de homem para mulher. Estudos indicam que estas células desempenham um papel importante no controle de infecções sexualmente transmissíveis (ISTs) como o Papilomavírus humano (HPV). É possível que a disfunção relativa dos linfócitos T em mulheres infectadas pelo HTLV-1 module a persistência da infecção pelo HPV ⁽¹⁹⁻²²⁾.

O HPV é a IST mais comum no mundo e está diretamente associado ao câncer cervical ⁽²³⁻²⁵⁾, um dos cânceres mais prevalentes em vários países, incluindo o Brasil ^(26,27). Estima-se

que pelo menos 50% dos indivíduos sexualmente ativos entrem em contato com o HPV em algum momento de suas vidas e que 80% das mulheres tenham esse contato até os 50 anos (28,29). Mais de 200 tipos diferentes de HPV foram identificados e alguns deles classificados como de baixo ou alto risco para o câncer cervical (30,31). Quinze tipos foram classificados como de alto risco oncogênico (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82), três tipos (26, 53 e 66) foram considerados de provável alto risco, doze tipos (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 e 89) foram classificados como baixo risco, e três tipos (34, 57 e 83) foram associados com risco indeterminado (32). Os tipos 16 e 18 do HPV são responsáveis por cerca de 70% dos casos de câncer cervical invasivo. Os tipos 6 e 11 do HPV, encontrados na maioria das verrugas genitais e papilomas laríngeos, não parecem representar um alto risco para o desenvolvimento de doenças malignas, embora estejam presentes em uma pequena proporção de tumores invasivos (33-35).

Apesar da relevância temática, não há consenso sobre os aspectos epidemiológicos da coinfeção HTLV-1/HPV nos poucos estudos que investigaram os efeitos desta associação viral no ambiente cérvico-vaginal (36-38). Um estudo piloto com 90 mulheres mostrou maior prevalência de HPV no grupo de pacientes infectadas pelo HTLV-1 (36). Outro estudo relatou que a infecção pelo HTLV-1 estava associada à infecção pelo HPV de alto risco, sendo o HPV16 o tipo mais comum (37). Em contraste, outro estudo que avaliou a associação entre 24 tipos específicos de HPV e a infecção pelo HTLV-1, encontrou associação em somente um tipo, o HPV53, de provável alto risco oncogênico (38). Nossos trabalhos anteriores evidenciaram que a carga proviral do HTLV-1 é detectável no fluido vaginal e que a infecção pelo vírus induz uma ativação imunológica local, caracterizada pela elevação das concentrações de citocinas Th1, Th2 e IL17. Observamos, também, que mulheres infectadas pelo HTLV-1 portadoras de HAM/TSP apresentam diminuição da lubrificação vaginal em comparação com mulheres assintomáticas e mulheres não infectadas. Esses achados nos permitiram investigar se um ambiente vaginal mais inflamado e menos protegido pela lubrificação natural contra agentes patogênicos externos podem aumentar a vulnerabilidade local de mulheres infectadas pelo HTLV-1 a outras infecções sexualmente transmissíveis, como o HPV (39,40).

Avaliar a presença do HTLV-1 no fluido vaginal, bem como verificar se há maior suscetibilidade cérvico-vaginal das mulheres infectadas pelo HTLV-1 à infecção pelo HPV caracterizando os tipos de HPV encontrados de acordo ao seu risco oncogênico, podem auxiliar na compreensão das possíveis alterações patológicas e inflamatórias associadas ao HTLV-1 neste ambiente, além de ser importante para elucidar aspectos relevantes da transmissão pela via sexual e durante o parto.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a carga proviral do HTLV-1 no fluido vaginal e caracterizar a infecção cérvico- vaginal por HPV em mulheres vivendo com HTLV-1.

2.2 Específicos

- Quantificar e correlacionar a carga proviral do HTLV-1 no fluido vaginal e nas células mononucleares do sangue periférico (PBMCs);
- Comparar a carga proviral do HTLV-1 no fluido vaginal e em PBMCs de mulheres assintomáticas e com HAM/TSP;
- Determinar a frequência da infecção pelo HPV em mulheres infectadas e não infectadas pelo HTLV-1;
- Caracterizar os tipos de HPV encontrados de acordo ao seu risco oncogênico;
- Descrever os achados citopatológicos cérvico-vaginais da população avaliada.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Vírus Linfotrópico de Células T Humanas (HTLV)

O Vírus Linfotrópico de Células T Humanas do tipo 1 (HTLV-1) foi o primeiro retrovírus humano identificado, a partir de amostras sanguíneas coletadas de um paciente com linfoma cutâneo de células T. Dois anos mais tarde, o HTLV tipo 2 (HTLV-2) também foi identificado numa linhagem imortalizada de células T obtidas de um paciente com leucemia de células pilosas^(41,42). Em 2005, foram identificados o HTLV tipo 3 (HTLV-3) e o HTLV tipo 4 (HTLV-4) em populações do sul de Camarões, na África⁽⁴³⁾, entretanto, até o momento, esses tipos não foram isolados fora da região geográfica citada e não foram relacionados a doenças^(44,45). Outros membros do grupo de retrovírus incluem o Vírus da Leucemia Bovina (BLV) e o Vírus da Leucemia de Células T Símias (STLV) tipos 1, 2 e 3⁽⁴⁶⁾. O STLV-1 é encontrado em macacos e grandes símios. Acredita-se que o HTLV-1 e o STLV-1 se originam de ancestrais comuns. Juntamente com os STLVs, os HTLVs formam o grupo dos Vírus Linfotrópicos de Células T de Primatas (PTLVs)⁽⁴⁷⁾. Com base na existência dessas infecções na África Equatorial e em descendentes de africanos no Caribe e na América Latina, sugere-se que a África seja a fonte primária deste vírus, tendo sua transmissão inicial ocorrido através do contato entre humanos e primatas⁽⁴⁸⁾.

3.1.1 Vírus Linfotrópico de Células T Humanas tipo 1 (HTLV-1)

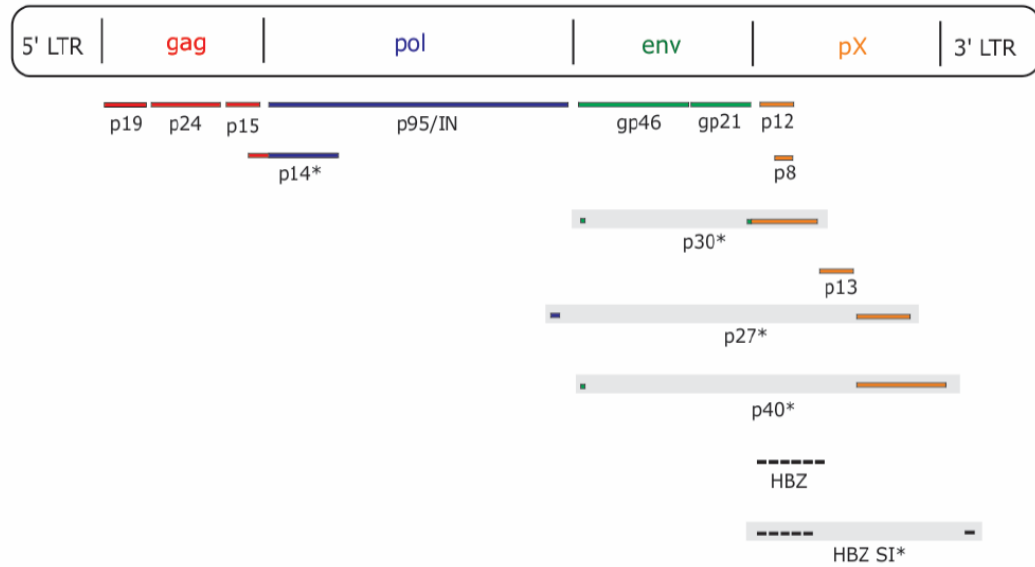
3.1.1.1 Caracterização do HTLV-1

O HTLV-1 pertence à família Retroviridae, à subfamília Orthoretrovirinae e ao gênero *Deltaretrovirus*, com aproximadamente 100 nm de diâmetro. A estrutura viral é composta por um envelope lipídico, uma matriz proteica e um nucleocapsídeo. No interior do nucleocapsídeo está presente o material genético formado por duas fitas simples de RNA e composto por regiões gênicas denominadas *gag* (grupo antigênico), *pol* (polimerase) e *env* (envelope), seguida de uma região exclusiva denominada pX, responsável por codificar os genes regulatórios *tax*, *rex* e *HTLV-I bZIP factor gene* (HBZ). O RNA transcrito a partir do gene *gag* codifica a proteína p55, que é clivada em proteases (p19, p24 e p15). No caso do RNA transcrito a partir do gene *env*, a proteína codificada é a gp63, originando após clivagem as proteínas do envelope gp46 e

gp21. Esse genoma é flanqueado por duas regiões de repetições terminais longas (LTR - *Long Terminal Repeat*), conforme representado na Figura 1 ⁽⁴⁹⁻⁵²⁾.

Figura 1. Organização genômica do HTLV-1

Fonte: Barreto FK, et al., 2017

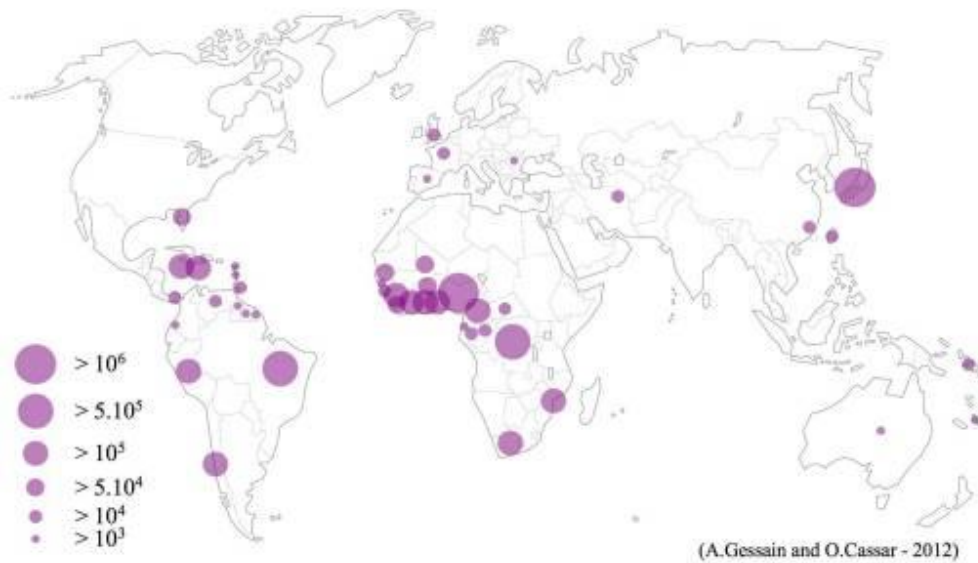


3.1.1.2 Epidemiologia

Poucos estudos fornecem dados abrangentes sobre a prevalência mundial do HTLV-1. Estima-se que 5-10 milhões de pessoas estejam infectadas pelo HTLV-1 no mundo. As principais áreas endêmicas da infecção pelo vírus são África, América do Sul e Central, leste da Ásia, Melanésia e Oriente Médio (Figura 2) ⁽¹⁾.

Figura 2. Distribuição geográfica dos principais focos de infecção pelo HTLV-1 no mundo

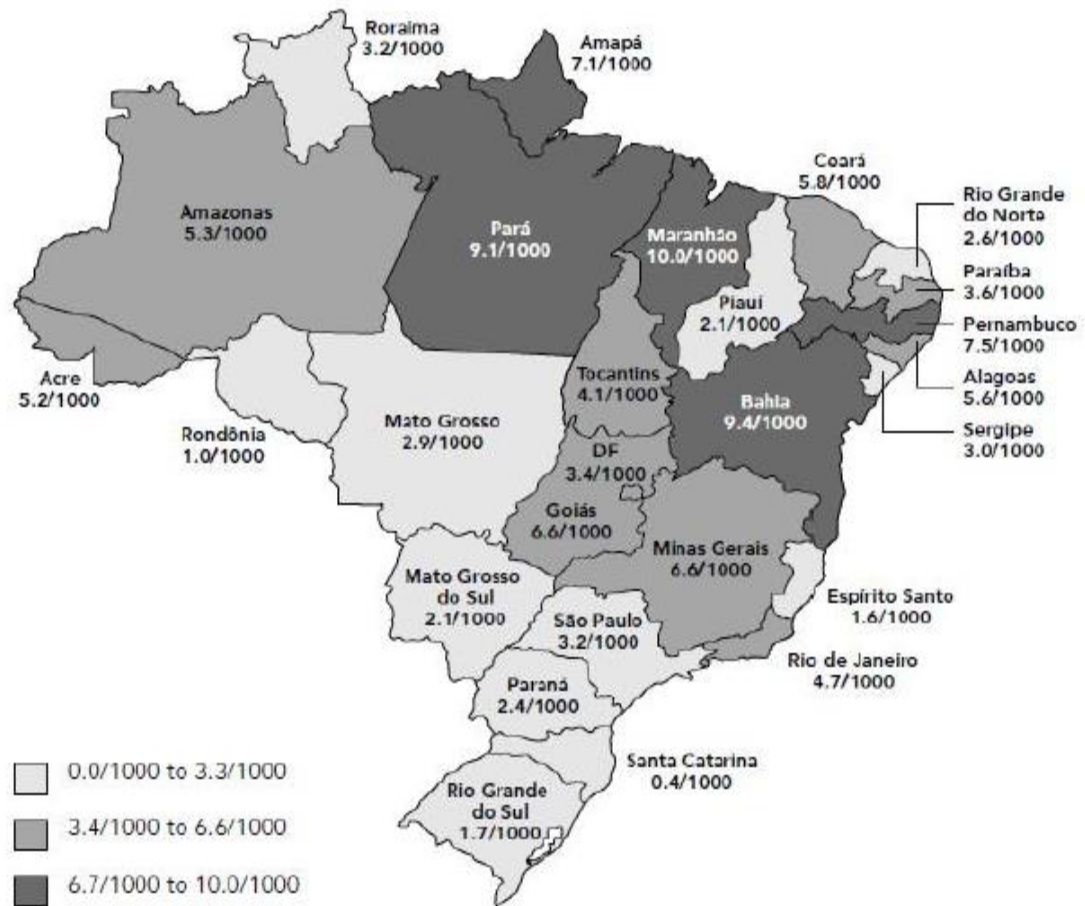
Fonte: Gessain A and Cassar O, 2012



A prevalência varia de acordo com a localização geográfica, fatores étnicos, sexo, idade, exposição a fatores de risco, renda e escolaridade, atingindo países com piores cenários socioeconômicos ⁽⁵³⁾. O HTLV-1 foi detectado pela primeira vez no Brasil em imigrantes japoneses na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, em 1986 ⁽⁵⁴⁾. Cerca de 800 mil pessoas estão infectadas por HTLV-1 no país, o que representa o maior número de portadores no continente americano em números absolutos ⁽¹⁾. A prevalência do HTLV-1 é heterogênea no território brasileiro. As mais elevadas estão presentes nas regiões Norte e Nordeste, que apresentam menor Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) quando comparadas às regiões Sul e Sudeste ⁽⁵⁵⁾. Um estudo de prevalência ecológica publicado em 2019 relatou que o HTLV-1 está disseminado em todo o estado da Bahia e que pelo menos 130.000 indivíduos foram infectados pelo vírus ⁽²⁾. Além disso, um recente boletim epidemiológico evidenciou que 39,3% das PVHTLV é residente da capital ⁽⁵⁶⁾. De fato, Salvador e São Luiz são as cidades que apresentam as maiores prevalências em doadores de sangue no território nacional ^(57,58) (Figura 3). Em Salvador, a prevalência na população geral é de 1,8%, variando de 1,2% em homens e 2,0% em mulheres. A soropositividade para a infecção é maior em mulheres, atingindo 10% daquelas com idade acima de 50 anos. A prevalência elevada da infecção por HTLV-1 nesta cidade se deve, possivelmente, a constituição da população ser predominantemente de origem africana. Caracteriza-se, também, por atingir as camadas da população menos favorecidas socioeconomicamente ^(3,59).

Figura 3. Mapa da prevalência de infecção por HTLV-1 em doadores de sangue no Brasil

Fonte: Catalan-Soares et al, 2005



3.1.1.3 Transmissão

O indivíduo pode se infectar por HTLV-1 através de duas vias de transmissão: A via vertical, que ocorre majoritariamente através da amamentação, mas pode ocorrer, também, por transmissão transplacentária ou durante o parto, e a via horizontal, que pode ocorrer por meio de contato sexual, transfusão de sangue ou hemoderivados, materiais perfurocortantes contaminados e compartilhamento de seringas ^(5,53,55). Um estudo indicou que a transmissão horizontal entre adultos é a principal via de infecção pelo HTLV-1 na população geral de Salvador e que é provável que ocorra por contato sexual ⁽⁶⁾. No entanto, há evidências de que a transmissão vertical também ocorre no estado da Bahia, uma vez que a prevalência da infecção pelo HTLV-1 em mulheres grávidas tem sido consistentemente estimada em cerca de 1% ⁽⁶⁰⁻⁶²⁾, além disso, aproximadamente 2% dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 têm 15 anos ou menos ⁽²⁾. A transmissão heterossexual é mais eficiente de homens para mulheres ^(14,63,64), já no

caso da transmissão homossexual, é mais frequente entre homens que assumem papel passivo na relação sexual ⁽⁶⁵⁾. Em relação às vias de disseminação intrafamiliar do HTLV-1 no Brasil, estudos realizados em comunidades com alta prevalência do HTLV-1, como aquelas com imigrantes japoneses e seus descendentes ou brasileiros de ascendência africana vivendo em comunidades isoladas, sugeriram que tanto a transmissão vertical quanto a sexual contribuem para a manutenção da propagação do HTLV-1 entre gerações ^(66,67). Um recente estudo realizado na Bahia corroborou esses dados, demonstrando que as vias de transmissão sexual e vertical contribuem para a disseminação intrafamiliar do HTLV-1 no estado ⁽⁶⁸⁾.

3.1.1.4 Manifestações Clínicas

Nos primeiros trabalhos que avaliaram a patogênese do HTLV-1, acreditava-se que grande parte dos indivíduos infectados pelo vírus eram assintomáticos. Entretanto, com o passar do tempo, cada vez mais estudos têm demonstrado que pacientes classificados como assintomáticos apresentam diversas manifestações clínicas que podem ocorrer em menor ou maior grau ⁽⁶⁹⁻⁷¹⁾.

O HTLV-1 é o agente etiológico da Mielopatia Associada ao HTLV-1/Paraparesia Espástica Tropical (HAM/TSP), uma doença inflamatória do sistema nervoso central onde os pacientes podem apresentar sinais e sintomas neurológicos como fraqueza dos membros inferiores, dor lombar e disfunção intestinal e vesical, como resultado de lesões na medula espinhal e perda de mielina. ^(72,73). Também é o agente da Leucemia/ Linfoma de células T do adulto (ATLL), uma doença maligna de células T altamente agressiva que afeta células T CD4+ infectadas pelo HTLV-1. Embora o mecanismo exato da patogênese da ATLL não esteja totalmente elucidado, os pacientes podem apresentar diversas complicações clínicas como linfadenopatia, esplenomegalia, hepatomegalia, hipercalcemia, infiltração de órgãos e envolvimento cutâneo. Dependendo do tipo da patologia, podem apresentar inúmeros outros sinais e sintomas como febre, tosse, icterícia, ascite, derrame pleural e infecções oportunistas ⁽⁷⁴⁻⁷⁶⁾. Além destas, a infecção pelo vírus é fortemente associada a doenças inflamatórias como a uveíte ⁽⁷⁷⁾ e a dermatite infecciosa ⁽⁷⁸⁾ e em menor grau a artrites ^(79,80), alveolite ⁽⁸¹⁾, poliomiosites ⁽⁸²⁾ e a ceratoconjuntivite seca ⁽⁸³⁾. Também está associada a outras doenças infecciosas, como *estrongiloidíase* ⁽⁸⁴⁾ e *tuberculose* ⁽⁸⁵⁾.

Manifestações clínicas do HTLV-1 associadas à saúde sexual têm sido relatadas tanto em homens, como em mulheres. Alguns estudos evidenciaram que a disfunção erétil é fortemente correlacionada com a infecção pelo vírus e aumenta consideravelmente em

pacientes portadores de HAM/TSP ^(86,87). De modo similar, a disfunção sexual feminina está associada à HAM/TSP em mulheres infectadas pelo HTLV-1 em idade reprodutiva ⁽⁸⁸⁾. Na tabela 1 estão descritas as principais patologias referidas e o grau de associação com a infecção pelo HTLV-1 ⁽⁸⁹⁾.

Tabela 1. Doenças associadas com a infecção pelo HTLV-1

Doença no adulto	Associação
Leucemia/ Linfoma de células T do adulto	++++
Mielopatia Associada ao HTLV-1/Paraparesia Espástica Tropical	++++
Uveíte	++++
Dermatite infecciosa	+++
Poliomiosite	++
Artrite associada ao HTLV-1	++
Pneumonia infiltrativa	++
Síndrome de Sjögren	+

++++, associação provada; +++, associação provável; ++, associação possível e +, associação improvável.

Fonte: Adaptada de Proietti, 2006

3.1.1.5 Coinfecções

Os dados relativos ao impacto das coinfecções na evolução do HTLV-1 são escassos, entretanto, há evidências de que o HTLV-1 está associado a diversas outras infecções, principalmente as ISTs. Apesar de não estar claro se há uma maior suscetibilidade, pessoas que vivem com HTLV-1 apresentam maior frequência de coinfecções com sífilis ⁽⁹⁰⁾, clamídia ⁽⁹¹⁾, Herpes ⁽⁹²⁾ e HPV ^(36,37). Além dessas, os vírus das hepatites B e C ^(93,94), que também são transmitidos pelo sangue, costumam ter taxas mais altas em pacientes HTLV-1 positivos ⁽⁹⁵⁾. Outros relatos de doenças oportunistas apontam para o envolvimento imunológico de pacientes coinfectados. Maiores frequências de infecções por *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium leprae*, agentes etiológicos da tuberculose e hanseníase, respectivamente, são observadas em portadores de HTLV-1 ^(96,97). Ademais, relatos de escabiose crostosa ⁽⁹⁸⁾ e persistência de patógenos como *Schistosoma mansoni* ⁽⁹⁹⁾ e *Strongyloides stercoralis* ⁽¹⁰⁰⁾ também têm sido descritos ⁽⁹⁵⁾.

Uma importante meta-análise que teve como objetivo sintetizar evidências de estudos

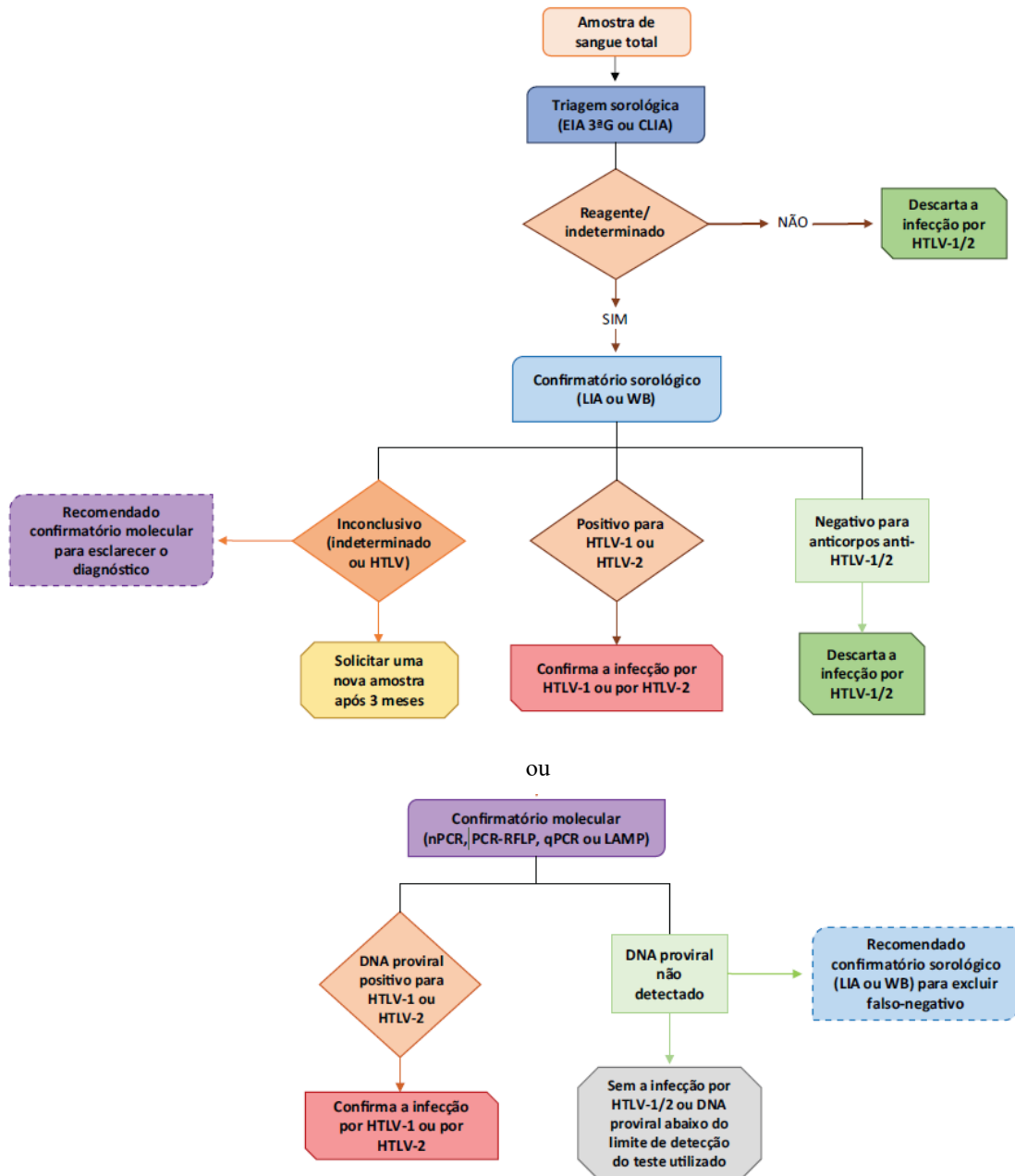
epidemiológicos sobre associações entre HTLV-1 e doenças, mostrou que a infecção pelo vírus está ligada ao aumento do risco de vida e a diversas condições clínicas associadas ao HTLV-1 como dermatite seborreica, síndrome de Sjögren, eczema, doenças pulmonares (bronquiectasia, bronquite e bronquiolite), pneumonia, asma, fibromialgia, artrite reumatoide, artrite, tuberculose, infecções renais e da bexiga, dermatofitoses, estrongiloidíase, linfoma, câncer de fígado e câncer cervical ⁽¹⁰¹⁾.

3.1.1.6 Diagnóstico

O diagnóstico da infecção pelo HTLV-1 é realizado habitualmente com testes sorológicos. Em alguns casos, utiliza-se testes moleculares para confirmação ou complementação diagnóstica. Estas análises baseiam-se na pesquisa de anticorpos específicos no soro e de segmentos de DNA proviral em células do sangue periférico do indivíduo. Segundo o Ministério da Saúde do Brasil, o diagnóstico da infecção pelo HTLV-1 deve seguir 2 etapas. Na Etapa I é realizada a triagem sorológica: Amostras não reagentes terão seus resultados definidos como “Amostra negativa” para anticorpos anti-HTLV-1; as amostras reagentes ou inconclusivas devem ser submetidas à Etapa II, onde serão feitos testes complementares para a definição do diagnóstico laboratorial. Esta etapa pode ser realizada de duas maneiras: Confirmação sorológica: É realizada por meio da execução do teste de *Western Blot* (WB) ou *Line Immunoassay* (LIA) para HTLV-1. Para a interpretação, deverão ser observados os critérios estabelecidos pelos fabricantes. As amostras negativas nestes testes têm seu resultado definido como “Amostra Negativa para HTLV-1”. Resultado positivo no teste de WB inclui a reatividade para proteínas da região gag (p19 e p24) e para proteínas do envelope viral (gp46 e gp21), logo, têm seu resultado definido como “Amostra positiva para HTLV-1”. Confirmação molecular: Para os testes moleculares (PCR - Reação em Cadeia da Polimerase ou LAMP - amplificação isotérmica de ácidos nucleicos mediada por alça) os resultados serão: a) “Detectado” (amostra positiva para HTLV-1); b) “Não detectado” (amostra negativa ou abaixo do limite de detecção do teste) (Figura 4) ⁽¹⁰²⁾.

Figura 4. Fluxograma de testes laboratoriais para o diagnóstico da infecção por HTLV no Brasil, empregando testes confirmatórios sorológicos ou moleculares

Fonte: Adaptado de Brasil. Ministério da Saúde, 2021



3.1.1.7 Carga Proviral

O HTLV-1 infecta principalmente linfócitos T CD4+, bem como linfócitos T CD8+ em menor extensão ⁽¹⁸⁾. O vírus se integra ao genoma da célula na forma de um provírus. As células T infectadas produzem poucas partículas virais livres; portanto, a quantificação do vírus integrado (provírus) é expressa como carga proviral (CPV) ⁽⁷⁾. A carga proviral representa a

proporção de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) que carregam uma cópia integral do DNA viral. As regiões gênicas *pol* e *gag*, e as proteínas *tax* e *rex* são as mais utilizadas para quantificação do DNA do HTLV⁽⁸⁾.

Apesar de poder variar em até 1000 vezes entre indivíduos, é comum que a carga proviral se mantenha estável ao longo dos anos⁽⁹⁾. É um importante preditor das doenças associadas ao HTLV-1, principalmente a HAM/TSP e a ATLL. Considerada um marcador para a progressão de HAM/TSP, está frequentemente aumentada em indivíduos com esta doença, embora muitos pacientes com carga elevada permaneçam portadores assintomáticos ao longo da vida^(8,10,11). O papel da CPV como preditor para o desenvolvimento de outras doenças associadas ao HTLV-1 tem sido sugerido. Pacientes com dermatite infecciosa, uveíte, ceratoconjuntivite seca^(77,78,83), além de alterações neurológicas isoladas como neuropatia periférica e bexiga neurogênica também podem apresentar CPV mais elevada do que pacientes assintomáticos^(103,104).

Outras doenças também têm sido relacionadas ao HTLV-1 e às concentrações de CPV nos pacientes avaliados. Um estudo realizado no Brasil concluiu que a quantidade de provírus presente no sangue e na saliva pode influenciar no aparecimento de complicações de saúde. Pessoas que vivem com HTLV-1 têm mais chances de ter problemas bucais se tiverem uma alta quantidade de CPV na saliva. Também se observou em pacientes com HAM/TSP uma maior quantidade de CPV no sangue e na saliva quando comparados a portadores assintomáticos⁽¹⁰⁵⁾. Outra complicação associada ao HTLV-1 é a ceratoconjuntivite seca, uma inflamação da córnea e da conjuntiva que reduz a lubrificação ocular. Essa condição também está relacionada à quantidade de CPV no sangue periférico, que pode servir como um indicador biológico da doença⁽⁸³⁾. Ao longo dos anos, alguns trabalhos demonstraram a importância da carga proviral no leite materno como preditor da transmissão do HTLV-1 de mães para filhos. Os resultados indicam que o leite materno é o principal veículo para transmissão vertical do HTLV-1, mesmo em mulheres que apresentam cargas provirais baixas. Também foi observado que há uma forte correlação entre a CPV do HTLV-1 no sangue e no leite materno. Isto indica que a quantificação da CPV nas PBMCs, que geralmente é feita na rotina clínica, pode ser usada para prever a CPV no leite^(106,107). Além disso, um outro estudo sugere que o envolvimento pulmonar pode ocorrer em um subconjunto de portadores de HTLV-1 sem HAM/TSP e que o aumento da carga de DNA proviral do HTLV-1 pode estar implicado na patogênese do envolvimento pulmonar em infectados pelo vírus⁽¹⁰⁸⁾. Um trabalho realizado avaliando pacientes com HAM/TSP e assintomáticos verificou que a carga proviral do HTLV-1 estava aumentada no compartimento celular do líquido cefalorraquidiano (LCR), em comparação com a das PBMCs⁽¹⁰⁹⁾.

Com relação ao ambiente vaginal, um estudo realizado com mulheres infectadas pelo HTLV-1 assintomáticas concluiu que a carga proviral era detectável no fluido vaginal de mais de 50% das mulheres avaliadas e que as concentrações de CPV neste ambiente eram consideravelmente menores quando comparadas aos níveis encontrados em sangue periférico ⁽³⁹⁾.

3.2 Papilomavírus Humano (HPV)

3.2.1 Caracterização do HPV

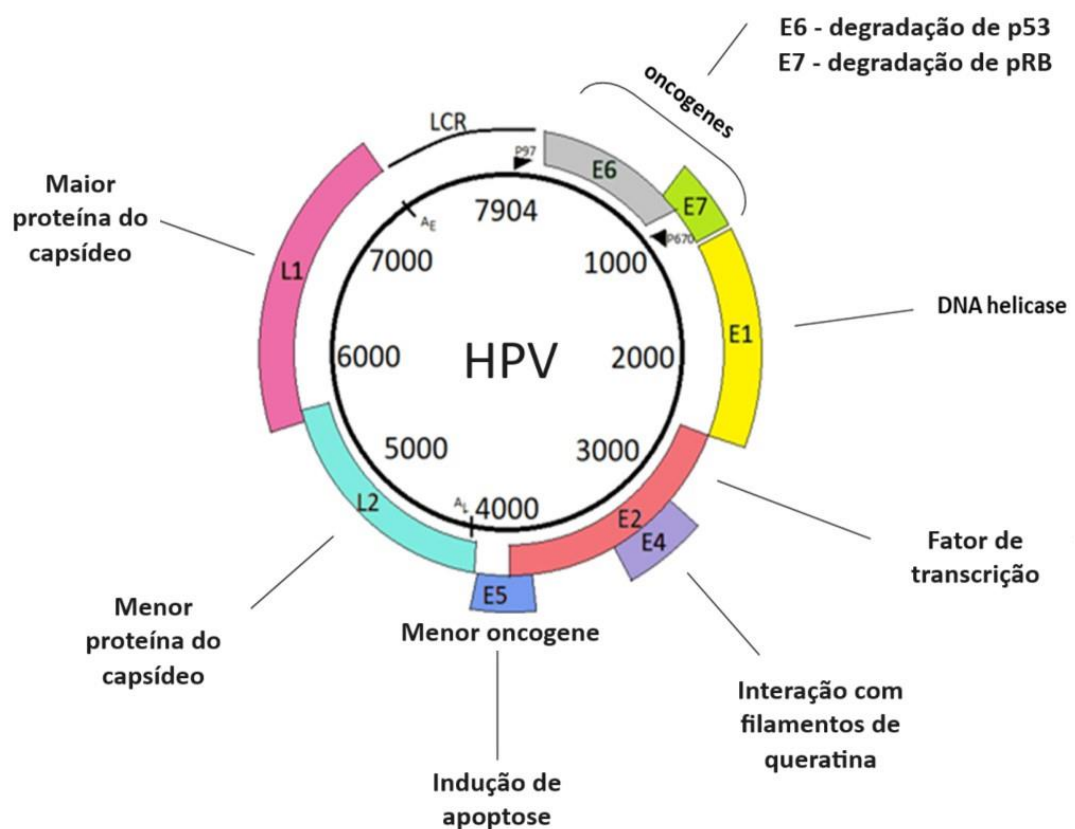
O HPV é um DNA vírus circular de dupla hélice com aproximadamente 8.000 pares de bases nitrogenadas que codificam sete proteínas regulatórias e duas proteínas estruturais. A partícula viral possui aproximadamente 55 nanômetros (nm) de diâmetro, sem envelope lipídico e pertencem à família Papillomaviridae ^(31,110). O vírus possui predileção por tecidos de revestimento (pele e mucosas) e provocam na região infectada alterações localizadas que resultam no aparecimento de lesões decorrentes do crescimento celular irregular ^(30,111).

Os papilomavírus se replicam e se agrupam exclusivamente no núcleo. O vírus infecta os queratinócitos nas camadas basais de um epitélio escamoso estratificado, com a expressão e replicação do gene viral prosseguindo de forma rigorosamente controlada, regulada pela diferenciação dos queratinócitos. Embora o mecanismo sobre como essa diferenciação regula a expressão do gene do HPV não seja totalmente compreendido, há um consenso de que a ativação do gene viral leva à expressão de seis proteínas regulatórias virais não estruturais (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) na região precoce e duas proteínas estruturais do capsídeo viral (L1 e L2) na região tardia do genoma (Figura 5) ^(112,113). E1 e E2 estão envolvidas no controle da replicação do DNA viral, atividade de helicase, recrutamento de polimerases e proteínas acessórias e na regulação da transcrição dos genes precoces. E4 expresso em uma infecção produtiva está associado ao colapso do filamento de citoqueratina, além de maturação e liberação das partículas virais. E5, E6 e E7 são oncogenes virais, onde a expressão dessas induz a imortalização e transformação celular. Em particular, E6 e E7 são duas oncoproteínas virais que alteram a atividade de proteínas que controlam proliferação, apoptose, adesão e crescimento celular e inativam, respectivamente, p53 e pRb, duas proteínas supressoras de tumor celular ^(114,115). As proteínas presentes no capsídeo viral, L1 e L2, são expressas tardiamente nas camadas mais diferenciadas do epitélio. A principal delas é a L1, fundamental no mecanismo de entrada viral, altamente imunogênica e a mais abundante das proteínas virais, constituindo

cerca de 80% do total. Já a proteína L2 é a menos abundante, atuando como um elemento estrutural adicional do capsídeo. Acredita-se que esta proteína tenha uma função importante na incorporação do vírion dentro do DNA da célula hospedeira. A LCR (*Long Control Region*) compreende cerca de 10% do genoma do HPV e localiza-se entre os genes L1 e E6. Corresponde à região regulatória do vírus, onde se ligam os fatores de transcrição celulares e virais que regulam a replicação ^(29,115).

Figura 5. Representação esquemática do genoma do HPV

Fonte: Adaptado de Hareža et al, 2022

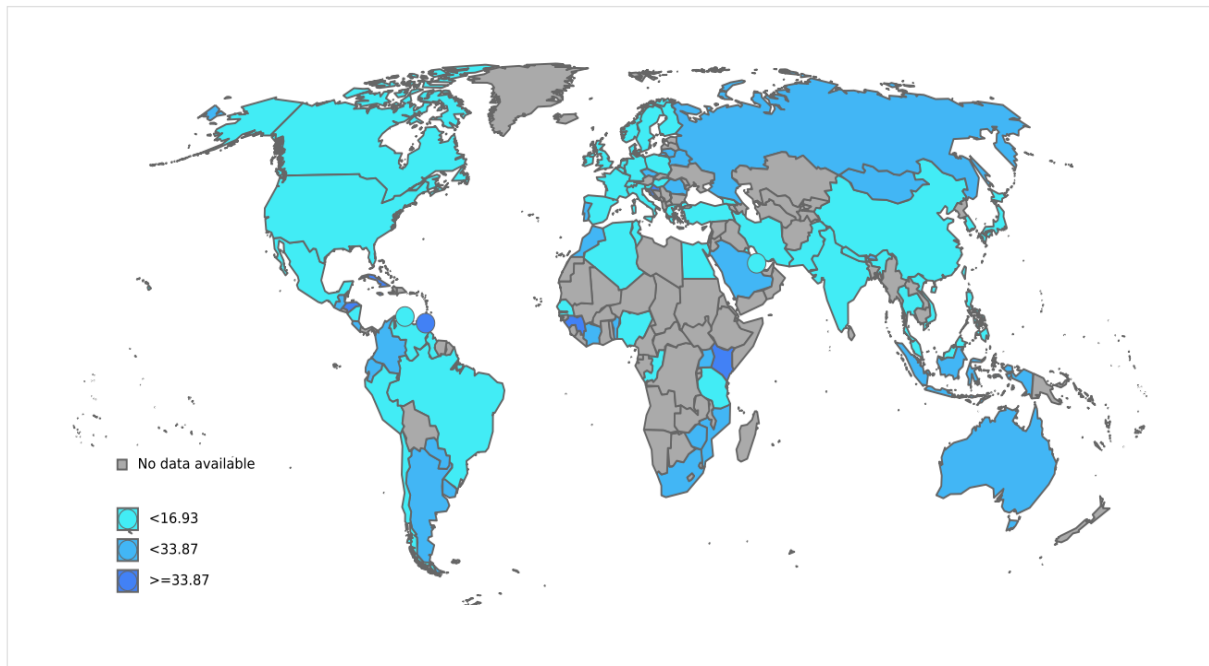


3.2.2 Epidemiologia

A probabilidade de um indivíduo adquirir HPV ao longo da vida varia de pelo menos 50% a quase 100%, ou seja, mesmo nos estudos mais conservadores há uma indicação de que pelo menos metade dos adultos sexualmente ativos adquirirão HPV durante a vida ⁽¹¹⁶⁾. Uma importante meta-análise que incluiu 194 estudos abrangendo 1.016.719 mulheres com achados citológicos normais demonstrou que a prevalência global estimada de infecção cervical por HPV foi de 11,7%. A África Subsaariana (24,0%), a Europa Oriental (21,4%) e a América Latina (16,1%) apresentaram as prevalências mais elevadas (Figura 6) ⁽¹¹⁷⁾.

Figura 6. Prevalência de HPV entre mulheres com citologia cervical normal no mundo

Fonte: Adaptado de HPV Information Centre; Bruni L et al, 2015



A prevalência do HPV é alta na população brasileira e varia de acordo com o risco populacional e a localização anatômica do corpo, com taxas mais baixas na cavidade oral em comparação com as regiões cervical, peniana e anal. Estudos sobre HPV foram desenvolvidos, principalmente, para avaliar infecção e câncer na região cervical. Há uma profunda falta de dados sobre HPV em muitas regiões geográficas do Brasil e para diferentes locais anatômicos ⁽¹¹⁸⁾. A prevalência de infecção cervical por HPV no Brasil varia entre 5,14 e 73%. Uma meta-análise recente com mais de 50.000 pessoas demonstrou que em estudos realizados em todas as regiões do país, a prevalência geral de infecções cervicais por HPV em mulheres foi de 25,41%. A região Nordeste foi considerada a mais prevalente com média de 32,82%, seguida das regiões Centro-Oeste (31,89%), Sudeste (25,65), Sul (21,59%) e Norte (20,40%) ^(118,119). Um outro estudo onde foram avaliados jovens entre 16 e 25 anos no Brasil, verificou-se alta prevalência de HPV genital nessa faixa etária com mais da metade dos participantes sendo positivos para algum tipo viral (53,6%) ⁽¹²⁰⁾. Em um trabalho realizado no Sul da Bahia, quase metade das mulheres avaliadas (47,7%) teve PCR positiva para o genoma do HPV ⁽¹²¹⁾. É possível que essas diferenças possam estar relacionadas a aspectos socioeconômicos, principalmente quando a análise é realizada em locais altamente populosos, mais pobres e consequentemente com piores indicadores gerais de saúde.

3.2.3 Transmissão

Existem múltiplas vias de transmissão do HPV em diferentes locais do corpo. A transmissão pode ocorrer de forma direta entre indivíduos (incluindo a vertical e a sexual) e a forma indireta, através do contato com as mãos (incluindo autoinoculação em um hospedeiro). Na maioria dos casos, a infecção pelo HPV ocorre por contato sexual direto ou através do toque próximo pele a pele durante o sexo com algum indivíduo que tenha o vírus. Uma pessoa infectada pode transmitir o HPV mesmo quando não apresenta sinais ou sintomas ^(122,123).

A autoinoculação entre os locais genital e oral ou anal pode ocorrer por meio do contato intermediário com as mãos ou através da disseminação do vírus na região anogenital. Mulheres com infecção cervical comprovada por HPV, displasia cervical ou câncer invasivo apresentam maior prevalência de HPV em amostras orais, indicando uma relação entre tais infecções ⁽¹²³⁻¹²⁶⁾. Um estudo realizado entre homens heterossexuais demonstrou que quando estes apresentam infecções genitais prévias por HPV, possuem maior risco de adquirir infecções anais pelo mesmo tipo viral, o que sugere autoinoculação ⁽¹²⁷⁾. Já a transmissão vertical do HPV pode ocorrer no útero através de infecção ascendente (transmissão transplacentária), durante o parto vaginal, na cesariana ou através do leite materno ⁽¹²⁸⁻¹³¹⁾. Além dessas, há possibilidade de transmissão logo após o parto através de contatos corpo a corpo ⁽¹³²⁾. No que se refere à via horizontal, as transmissões do HPV ocorrem através do contato com a pele e as mucosas de indivíduos infectados pelo vírus. A via de transmissão mais comum é através do sexo com penetração. A exposição é, portanto, determinada por fatores de risco bem conhecidos para a maioria das infecções sexualmente transmissíveis, tais como o número de parceiros sexuais ao longo da vida, o número recente de parceiros sexuais, a frequência do sexo ou de outro contato íntimo pele a pele, além dos antecedentes sexuais e comportamentos dos parceiros sexuais ^(133,134).

3.2.4 Manifestações Clínicas

Na maioria dos indivíduos, a infecção pelo HPV não produz qualquer sintoma clínico ou manifestação subclínica, por isso, grande parte dos casos são assintomáticos e não resultam em doença. O período de latência pode variar de meses a anos. Quando ocorrem, as manifestações da infecção por HPV incluem verrugas cutâneas nas mãos, pés e regiões anogenitais, papilomatose respiratória recorrente, lesões precursoras do câncer cervical

(neoplasia intraepitelial cervical) e cânceres, incluindo câncer cervical, anal, vaginal, vulvar, peniano e orofaríngeo ^(122,135,136).

Embora a incidência seja alta, a maioria das infecções por HPV são resolvidas espontaneamente em até dois anos. Uma pequena proporção de pessoas permanece infectada, o que é um fator de risco muito importante para o desenvolvimento do câncer cervical ⁽¹³⁷⁾. A infecção por HPV ocorre no epitélio basal. Nas mulheres, lesões intraepiteliais escamosas do colo do útero, anteriormente chamadas de neoplasia intraepitelial cervical (NIC), podem ser detectadas por meio da triagem citopatológica. Lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau (LSIL) frequentemente regredem. A Lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL) e o Adenocarcinoma *in situ* (AIS) são considerados precursores do câncer. Se não forem detectadas e tratadas, essas lesões precursoras podem evoluir para o câncer do colo do útero anos ou décadas mais tarde ^(138,139). A patogênese de outros tipos de cânceres relacionados ao HPV pode seguir um curso semelhante, embora se saiba menos sobre suas respectivas lesões precursoras. HSIL vaginal, vulvar e anal foram identificados como precursores do câncer nessas regiões do corpo ⁽¹⁴⁰⁻¹⁴²⁾.

O carcinoma de células escamosas é a doença mais comum relacionada ao HPV. Cerca de 99,7% dos casos desse tipo de câncer cervical são causados por infecção genital persistente do papilomavírus humano de alto risco ^(25,143). Os adenocarcinomas do colo do útero também estão relacionados ao HPV, mas a correlação é menos pronunciada e depende da idade. Nas mulheres com menos de 40 anos, o HPV esteve presente em 89% dos adenocarcinomas, enquanto nas mulheres com 60 anos ou mais, o HPV foi observado em apenas 43% ⁽¹⁴⁴⁾. O câncer cervical surge na zona de transformação, que é a região entre o epitélio escamoso da ectocérvice e o epitélio colunar da endocérvice, onde ocorrem alterações metaplásicas contínuas. A fase de atividade metaplásica mais intensa coincide com o maior risco de infecção por HPV, que ocorre na puberdade e diminui lentamente após a ocorrência da menopausa. O vírus causa uma interrupção no controle normal do ciclo celular e promove uma divisão celular descontrolada, levando a uma série de alterações genéticas citadas anteriormente ^(145,146). Os fatores de risco para a presença do HPV são: elevado número de parceiros sexuais, coitarca e primeiro parto precoces, supressão e alteração do estado imunológico, tabagismo e alterações hormonais ^(122,135).

3.2.5 Diagnóstico

O HPV não pode ser cultivado em laboratório a partir de amostras clínicas e os ensaios

imunológicos não são adequados para a detecção de infecções por este vírus. As principais ferramentas de diagnóstico têm sido a citopatologia, a histopatologia e os métodos moleculares para detectar sequências de DNA do HPV em materiais biológicos ⁽¹⁴³⁾.

O exame citopatológico do colo do útero, também chamado de teste de Papanicolaou, é o procedimento de rastreamento do câncer cervical mais comumente utilizado. Nele se avalia a presença de células pré-cancerosas ou cancerosas no colo do útero. Os exames são relatados de acordo com o Sistema Bethesda como negativos para lesão intraepitelial ou malignidade (NILM) ou com presença de anormalidades nas células epiteliais (em células escamosas e/ou glandulares). As anormalidades escamosas incluem: células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US), lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL), células escamosas atípicas sem excluir lesão de alto grau (ASC-H), lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL) e carcinoma de células escamosas; já as anormalidades glandulares incluem: células glandulares atípicas sem outras especificações, células glandulares atípicas favorecendo neoplasia, adenocarcinoma *in situ* (AIS) e adenocarcinoma endocervical ^(147,148).

Nos casos em que se constata a presença de anormalidades nas células epiteliais do colo do útero, é recomendado que seja realizado o exame histopatológico (biópsia) da região afetada por meio da colposcopia. Isso facilitará a localização detalhada da lesão cervical suspeita, determinando sua gravidade e extensão. A biópsia é utilizada, principalmente, para distinguir lesões de alto grau e baixo grau, além de diferenciar as lesões de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) do câncer cervical invasivo ^(149,150).

Os métodos moleculares iniciais de detecção do HPV utilizados eram feitos por meio de hibridização direta da sonda, como *dot blot* e *Southern blot*. Além de serem trabalhosos e demorados, eles tinham baixa sensibilidade, exigiam grandes quantidades de DNA nas amostras e por isso foram amplamente substituídos pela tecnologia de amplificação, que permitiu a detecção de números baixos de cópias do vírus em amostras clínicas ⁽¹⁵¹⁾. Os testes atualmente realizados, principalmente em pesquisas clínicas, utilizam métodos de amplificação que são divididos em sinal amplificado e alvo amplificado. As principais técnicas representativas do sinal amplificado são o ensaio de Captura híbrida (HC2; Digene Corporation, Gaithersburg, MD, USA), que detecta 13 tipos de HPV de alto risco, e o Cervista, que possui duas apresentações: HPV HR, que detecta 14 tipos de HPV de alto risco e HPV 16/18 (Hologic, Bedford, Massachusetts, USA) ^(152,153). Os testes para amplificar o alvo incluem a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional ou a PCR em tempo real e devem ser associados a outros métodos para a detecção dos produtos amplificados, podendo assim encontrar os tipos virais presentes na amostra. Essa detecção e identificação dos produtos pode ser realizada

utilizando os diversos tipos de ensaios de hibridização reversa, além de sequenciamentos genéticos comuns (método de Sanger) ou sequenciamentos de nova geração (NGS) ⁽¹⁵⁴⁻¹⁵⁶⁾. Dentre as técnicas citadas, cumpre destacar o NGS, método que permite detectar infecções por papilomavírus humano com sensibilidade e precisão sem precedentes, ao mesmo tempo em que fornece toda a sequência viral a ser analisada em busca de mutações pontuais, linhagens variantes e modificações do genoma ⁽¹⁵⁶⁾.

3.2.6 Tipos de HPV

Mais de 200 tipos diferentes de HPV foram identificados, sendo que cerca de 40 podem infectar o trato anogenital e são classificados em baixo ou alto risco para o câncer cervical. O vírus tem predileção por tecidos (pele e mucosas) e causa alterações localizadas na região infectada que resultam no aparecimento de lesões decorrentes do crescimento celular irregular ^(30,143,157). A infecção por um tipo de HPV não previne a reinfecção dele ou por outro tipo. Além disso, 5% a 30% dos indivíduos positivos estão com múltiplos tipos do vírus ⁽¹²²⁾.

As verrugas cutâneas das mãos e dos pés, como verruga vulgar ou verruga plantar, são mais comumente causadas pelos tipos 1, 2, 4, 27 e 57 do HPV ⁽¹⁵⁸⁾. A maioria das verrugas anogenitais, como o condiloma acuminado, são causadas pelos tipos 6 ou 11, classificados como de baixo risco. Esses tipos também são responsáveis pela papilomatose respiratória recorrente juvenil e adulta ^(34,159). Lesões pré-cancerosas e cancerosas do colo do útero, áreas anogenitais masculinas e femininas e área orofaríngea são mais comumente acometidas pelos tipos 16 e 18. No entanto, os tipos 31, 33, 35, 45, 52 e 58 também se enquadram como HPV de alto risco, pois estão associados em menor ou maior grau ao desenvolvimento de câncer cervical ^(160,161). Um importante estudo classificou os tipos de HPV que acometem a região anogenital de acordo ao seu risco oncogênico. Quinze tipos foram classificados como de alto risco (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82), três tipos (26, 53 e 66) foram considerados de provável alto risco, doze tipos (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 e 89) categorizados como tipos de baixo risco, e três tipos (34, 57 e 83) foram associados a um risco indeterminado ^(32,162).

Um trabalho que analisou mais de 1.000 amostras de pacientes com câncer cervical invasivo detectou o DNA do HPV em 93% dos tumores, sem variação significativa na positividade entre os diversos países avaliados. O HPV 16 estava presente em 50% das amostras, o HPV 18 em 14%, o HPV 45 em 8% e o HPV 31 em 5%. O HPV 16 foi o tipo predominante em todos os países, exceto na Indonésia, onde o HPV 18 foi mais comum. Nos

tumores de células escamosas, predominou o HPV 16 (51% dessas amostras), mas o HPV 18 predominou nos adenocarcinomas (56% desses tumores) e nos tumores adenoescamosos (39% desses tumores) ⁽¹⁶³⁾.

Outro trabalho realizado nos Estados Unidos da América avaliou a prevalência de DNA do HPV em pacientes acometidos por diversos tipos de cânceres e foi detectado genoma viral em 90,6% dos cânceres cervicais, 91,1% dos anais, 75,0% dos vaginais, 70,1% dos cânceres de orofaringe, 68,8% dos vulvares, 63,3% dos cânceres de pênis, 32,0% dos cânceres de cavidade oral e 20,9% dos cânceres de laringe, bem como em 98,8% das lesões de alto grau do colo do útero. O HPV 16 foi o tipo mais comum encontrado em todos os tipos de câncer. A atribuição dos HPV 16 e 18 foi muito expressiva para câncer anal (79,4%), câncer cervical invasivo (66,2%) e câncer de orofaringe (60,2%). Além de serem responsáveis por cerca de metade dos cânceres invasivos vaginais (55,1%), vulvares (48,6%) e de pênis (47,9%) ⁽¹⁶¹⁾.

3.2.7 Tratamento e Prevenção

Não existe tratamento para o HPV em si. No entanto, existem recursos terapêuticos para as enfermidades que o vírus pode causar. O tratamento é direcionado às lesões macroscópicas (por exemplo, verrugas genitais) ou patológicas causadas pelo HPV. A infecção genital subclínica geralmente desaparece espontaneamente, portanto, a terapia antiviral específica não é recomendada para erradicar a infecção ⁽¹²²⁾.

Indivíduos com verrugas cutâneas têm inúmeras opções de tratamento disponíveis, incluindo remoção cirúrgica, crioterapia, medicamentos irritantes ou imunomoduladores, ácido tricloroacético e remoção a laser. As verrugas anogenitais e orofaríngeas podem ser tratadas de forma semelhante às verrugas cutâneas, desde que o paciente seja imunocompetente ^(115,164). Lesões cervicais causadas por HPV podem regredir sem qualquer intervenção, porém, lesões persistentes em qualquer idade ou lesões de alto grau em mulheres mais velhas, podem ser tratadas com crioterapia, procedimento de cirurgia de alta frequência (CAF) ou excisão de cone com faca fria (CKC). Ambos os procedimentos cirúrgicos (CAF, CKC) envolvem a ressecção do orifício cervical e da zona de transformação. Se o paciente progredir para malignidade, poderá ser necessária ressecção adicional, quimioterapia e/ou radiação ^(143,165).

Os preservativos quando utilizados de forma consistente e correta podem diminuir as chances de aquisição e transmissão do HPV e de desenvolvimento das doenças relacionadas, entretanto, como o vírus pode infectar áreas não cobertas pelos preservativos, estes podem não proteger totalmente contra o patógeno ⁽¹²²⁾. Atualmente, o método preventivo mais eficaz são

as vacinas contra o HPV, introduzidas em todo o mundo no início dos anos 2000 com elevada eficácia e segurança na prevenção de infecções e doenças causada pelo vírus. Ao longo do tempo, é consenso que as vacinas contribuem cada vez mais para redução de lesões pré-cancerosas e verrugas genitais, bem como tem demonstrado um efeito robusto de proteção de rebanho em parceiros sexuais não vacinados ^(166,167). Três apresentações das vacinas contra o HPV (bivalente, tetravalente e nonavalente) estão disponíveis comercialmente em diversos países. No Brasil, a vacina bivalente teve a comercialização interrompida em 2021. Todas as três são compostas por partículas semelhantes a vírus (VLPs) de HPVs 16 e 18. A vacina tetravalente acrescenta os VLPs dos HPVs 6 e 11 e a vacina nonavalente protege adicionalmente contra os HPVs de alto risco 31,33,45,52 e 58 ^(122,167).

Alguns trabalhos têm demonstrado um forte impacto da vacina nonavalente contra o HPV, com resultados que apresentam uma redução em torno de 90% dos casos de câncer cervical e uma redução global de 50% em todos os casos de cânceres relacionados com o HPV ^(161,167,168). Um estudo sugeriu que assumindo uma cobertura vacinal total da população alvo, 25.000 doenças malignas seriam potencialmente evitáveis com a vacina bivalente e quase 30.000 casos não ocorreriam com a utilização da nonavalente ⁽¹⁶¹⁾.

4 RESULTADOS

4.1 HTLV-1 Proviral Load in Vaginal Fluid Correlates with Levels in Peripheral Blood Mononuclear Cells

Para responder aos dois primeiros objetivos específicos desta tese, que foram quantificar e correlacionar a carga proviral do HTLV-1 no fluido vaginal e nas PBMCs e comparar a CPV encontrada nesses compartimentos em mulheres assintomáticas e com HAM/TSP, foram analisadas 56 mulheres infectadas por HTLV-1, 43 assintomáticas e 13 portadoras de HAM/TSP, selecionadas no Centro HTLV da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública. Além desses objetivos, descrevemos os achados citopatológicos e a microbiota vaginal dessas pacientes.

Os resultados são apresentados no artigo intitulado “**HTLV-1 Proviral Load in Vaginal Fluid Correlates with Levels in Peripheral Blood Mononuclear Cells**”, publicado na edição especial “Focus on Cervicovaginal Health: Microbiome, Sexually Transmitted Infections, and Beneficial Microbes” da revista “Pathogens”.

A carga proviral do HTLV-1 foi menor no fluido vaginal [mediana: 451,9 cópias/ 10^6 células (IIQ: 0 – 2,490)] quando comparada às PBMCs [mediana: 23,264 cópias/ 10^6 células (IIQ: 6,776 – 60,036)] ($p < 0,0001$). Observamos, também, que a CPV no fluido vaginal se correlaciona diretamente com a CPV nas PBMCs ($r = 0,37$, $p = 0,006$). Além disso, a CPV foi detectada no fluido vaginal de 24 de 43 (55,8%) mulheres assintomáticas em comparação com 12 de 13 (92,3%) pacientes com HAM/TSP, $p = 0,02$. Já as análises citopatológicas não revelaram diferenças entre mulheres com CPV detectável ou indetectável.

Brief Report

HTLV-1 Proviral Load in Vaginal Fluid Correlates with Levels in Peripheral Blood Mononuclear Cells

Alisson de Aquino Firmino ¹ , Paulo Roberto Tavares Gomes Filho ¹, Adenilda Lima Lopes Martins ^{1,2}, Thessika Hialla Araújo ¹, Luana Leandro Gois ^{1,3} , Everton da Silva Batista ¹, Jean Paulo Lacerda Araújo ¹, Bernardo Galvão-Castro ^{1,4} and Maria Fernanda Rios Grassi ^{1,4,*}

¹ Integrative Multidisciplinary HTLV Center (CHTLV), Bahiana School of Medicine and Public Health (EBMSP), Salvador 40290-000, Bahia, Brazil

² Department of Health (DSAU), State University of Feira de Santana (UEFS), Feira de Santana 44036-900, Bahia, Brazil

³ Department of Biointeraction Sciences, Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia (UFBA), Salvador 40110-902, Bahia, Brazil

⁴ Advanced Laboratory of Public Health (LASP), Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Salvador 40296-710, Bahia, Brazil

* Correspondence: fernanda.grassi@fiocruz.br; Tel.: +55-(71)-3176-2213; Fax: +55-(71)-3176-2327



Citation: de Aquino Firmino, A.; Filho, P.R.T.G.; Martins, A.L.L.; Araújo, T.H.; Gois, L.L.; da Silva Batista, E.; Araújo, J.P.L.; Galvão-Castro, B.; Grassi, M.F.R. HTLV-1 Proviral Load in Vaginal Fluid Correlates with Levels in Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Pathogens* **2023**, *12*, 682. <https://doi.org/10.3390/pathogens12050682>

Academic Editors: Antonella Marangoni and Claudio Foschi

Received: 18 April 2023

Revised: 1 May 2023

Accepted: 3 May 2023

Published: 5 May 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Background: The prevalence of human T-lymphotropic virus type-1 (HTLV-1) infection is higher in women, and sexual intercourse has been described as an important route of male-to-female transmission. The present study aimed to quantify HTLV-1 proviral load (PVL) in vaginal fluid, and to investigate correlations with PVL in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). In addition, cytopathological alterations and vaginal microbiota were evaluated. Methods: HTLV-1-infected women were consecutively recruited at a multidisciplinary center for HTLV patients in Salvador, Brazil. All women underwent gynecological examinations to obtain cervicovaginal fluid and venipuncture for blood collection. PVL, as measured by real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR), was expressed as the number of copies of HTLV-1/10⁶ cells in blood and vaginal fluid samples. Light microscopy was used to assess cervicovaginal cytopathology and vaginal microbiota. Results: In the 56 included women (43 asymptomatic carriers and 13 diagnosed with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis—HAM/TSP), mean age was 35.9 (SD ± 7.2) years. PVL was higher in PBMCs (median: 23,264 copies/10⁶ cells; IQR: 6776–60,036) than in vaginal fluid (451.9 copies/10⁶ cells; IQR: 0–2490) ($p < 0.0001$). PVL in PBMCs was observed to correlate directly with PVL in vaginal fluid ($R = 0.37$, $p = 0.006$). PVL was detected in the vaginal fluid of 24 of 43 (55.8%) asymptomatic women compared to 12 of 13 (92.3%) HAM/TSP patients, $p = 0.02$. Cytopathologic analyses revealed no differences between women with detectable or undetectable PVL. Conclusion: HTLV-1 proviral load is detectable in vaginal fluid and correlates directly with proviral load in peripheral blood. This finding suggests that sexual transmission of HTLV-1 from females to males may occur, as well as vertical transmission, particularly in the context of vaginal delivery.

Keywords: HTLV-1; proviral load; vaginal proviral load

1. Introduction

Human T-lymphotropic virus type 1, also known as human T-leukemia virus (HTLV-1), was the first human retrovirus to be isolated and associated with disease before HIV [1]. HTLV-1 is transmitted through either i) blood, through blood transfusions in areas where screening is not performed, or through the exchange of needles and syringes containing contaminated blood; ii) from mother to child during pregnancy, at birth or mainly through breastfeeding; and iii) through unprotected sexual intercourse [2].

In the city of Salvador, Brazil, a region where HTLV-1 infection is endemic, a population-based study showed a higher prevalence of HTLV-1 infection in women that increases with

age. In 2002, approximately 10% of women over 50 years of age were found to be infected with HTLV-1 [3]. In addition, sexual intercourse has been described as the main route of transmission in this city's general population [4].

The presence of HTLV-1 has been detected in semen and cervicovaginal secretions from infected individuals [5,6]. Although a greater efficacy of male-to-female sexual transmission has been reported, female-to-male transmission also occurs and should therefore not be neglected [7–10]. HTLV-1 mainly infects CD4+ T lymphocytes, as well as CD8+ T lymphocytes to a lesser extent [11]. The virus integrates into the cell genome in the form of a provirus. Infected T cells produce few free virus particles; therefore, quantification of the integrated virus (provirus) is expressed as proviral load (PVL) [12]. In general, the proportion of lymphocytes is higher in the seminal fluid than in the vaginal fluid of healthy individuals [12], which may partly explain the greater effectiveness of male-to-female HTLV-1 transmission.

We have previously shown higher levels of Th1, Th2, and Th17 inflammatory cytokines in the vaginal fluid from HTLV-1-infected women compared to that of uninfected women [13]. In this study, we aimed to quantify PVL in the vaginal fluid of HTLV-1-infected women and then investigate correlations with PVL in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). In addition, cytopathological alterations and vaginal microbiota were evaluated.

2. Materials and Methods

2.1. Patients and Study Design

This was a cross-sectional observational study conducted at the Integrative Multidisciplinary HTLV Center (CHTLV) of the Bahiana School of Medicine and Public Health (EBMSP) in Salvador, Bahia, Brazil [14]. Women infected with HTLV-1 were consecutively recruited during medical consultations and referred for gynecological examinations. Relevant inclusion and exclusion criteria are described elsewhere [15]. Briefly, HTLV-1-infected women (positivity on ELISA and Western blot) aged 20 to 50 years who had been sexually active in the past four weeks were included. Patients were classified as asymptomatic (no signs of myelopathy) or diagnosed with HAM/TSP (HTLV-1-associated myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis) according to the criteria established by Castro Costa et al. [16].

2.2. Ethical Approval

The present study protocol was approved by the Institutional Research Board of EBMSP (CAAE 33098414.4.0000.5544). All procedures were planned and carried out in accordance with the ethical principles established by the Declaration of Helsinki [17]. All included women signed a term of informed consent.

2.3. Sample Collection

Clinical and demographic data were collected using a standardized form. Whole blood samples were collected in EDTA tubes and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were separated by a density gradient centrifugation and cryopreserved until use. A complete gynecologic examination and the collection of cervicovaginal specimens were performed by a single trained gynecologist [15]. In each woman, vaginal fluid was collected from the ectocervix, endocervix, and vaginal walls with a single cotton swab for PVL measurement. Samples obtained for evaluation of vaginal PVL were then placed in tubes containing 400 µL hydroxymethyl ethylene diamine tetra-acetic acid (Tris-EDTA) solution and stored at −20 °C. For cytopathological and vaginal microbiota analysis, Papanicolaou smear samples were collected from the ectocervix and endocervix using an Ayre spatula and cytobrush, respectively. The collected samples were fixed in absolute alcohol for further processing.

2.4. Sample Analysis

HTLV-1 PVL was measured in cervicovaginal cells and PBMCs using the same protocol. Briefly, DNA was extracted using the Spin Column DNA Extraction System (Qiagen,

Hilden, Germany). The amount of cells in the vaginal fluid was not evaluated, but the extracted DNA was quantified in a UV-Vis Spectrophotometer (Nanodrop) and all samples were diluted to 30 ng/μL. HTLV-1 proviral load was quantified using a real-time TaqMan polymerase chain reaction (PCR) method, as described previously [18]. Briefly, SK110/SK111 primers were used to amplify a 186 bp fragment of the pol gene and dual TaqMan probe (5'-FAM/5' VIC and 3'-TAMRA) was located at 4829–4858 bp of the HTLV-1 reference sequence (HTLVATK). Albumin DNA was used as an endogenous reference. The detection limit was the standard curve, which was 10^1 copies. The value of HTLV-1 proviral load was reported as the [(HTLV-1 average copy number)/(albumin average copy number)] $\times 2 \times 10^6$ and expressed as the number of HTLV-1 copies per 10^6 cells in both blood and vaginal fluid samples, as previously described [13,19]. Results were analyzed using 7500 v2.0.1 software (Applied Biosystems). Cell abnormalities detected by Papanicolaou smear tests were classified in accordance with the Bethesda System using light microscopy [20].

2.5. Statistical Evaluations

Quantitative sociodemographic variables without normal distributions, such as family income, educational level, age of partner, number of partners and parity, are presented as medians with 25th and 75th percentiles. Age, a quantitative variable with normal distribution, is presented as mean with standard deviation. The qualitative variables skin color and marital status are expressed as simple frequencies/proportions. PVL comparisons in vaginal fluid and PBMCs were evaluated with the nonparametric Wilcoxon signed rank test, whereas comparisons between asymptomatic and HAM/TSP groups were performed with the Mann–Whitney test. Data were expressed as median values and 25th and 75th percentiles. The frequency of women with detectable PVL in vaginal fluid and PBMCs in the asymptomatic and HAM/TSP groups was evaluated using Fisher's exact test. Spearman's rank correlation coefficient was used to analyze the relationship between proviral load in vaginal fluid compared to PBMCs. Differences in cervicovaginal cytopathology and vaginal microbiota profiles were assessed using the Chi-squared test. *p*-values < 0.05 were considered statistically significant. All analyses were performed using GraphPad software version 9.5 and SPSS software version 17.0 for Windows.

3. Results

Fifty-six women were studied, 43 of whom were asymptomatic and 13 diagnosed with HAM/TSP. Almost half of the patients (46.4%) self-reported black skin color. The mean patient age was 35.9 (± 7.2) years. Most participants reported being married or in a stable relationship (73.2%) with a median partner age of 42 (33.5–47.5) years. The median number of lifetime sexual partners was four (3–13.5) (Table 1).

Of the 56 patients included, PVL was detectable in the vaginal fluid of 36 (64.3%) women compared to 54 women in PBMCs (96.5%). In two women, PVL was undetectable in both the vaginal fluid and PBMCs. PVL levels were statistically lower in vaginal fluid: median 451.9 copies/ 10^6 cells (IQR: 0–2490), compared to PBMCs: median 23,264 copies/ 10^6 (IQR: 6776–60,036) ($p < 0.0001$) (Figure 1A). A positive correlation was observed between PVL in vaginal fluid and PBMCs, $R = 0.37$ ($p = 0.006$) (Figure 1B).

Regarding PVL in vaginal fluid, a statistical difference was found ($p = 0.03$) between asymptomatic women (103.1 copies/ 10^6 cells (IQR: 0–2000)) and carriers of HAM/TSP (869 copies/ 10^6 cells (IQR: 447.9–3760)), (Figure 1C). PVL levels in PBMCs from asymptomatic carriers (21,976 copies/ 10^6 cells (IQR: 3420–60,036)) were similar ($p = 0.48$) to those in patients with HAM/TSP (31,080 copies/ 10^6 cells (IQR: 14,799–66,420)), (Figure 1D). PVL was detected in the vaginal fluid of 24 of 43 (55.8%) asymptomatic women compared to 12 of 13 (92.3%) HAM/TSP patients, $p = 0.02$. No significant differences were found in the PVL of PBMCs from asymptomatic women (41/43, 95.3%) and HAM/TSP patients (13/13, 100%), (Figure 1E). Two asymptomatic patients had an undetectable PVL in both vaginal fluid and PBMCs. Moreover, cytopathologic findings and vaginal microbiota were similar between these groups (Table 2).

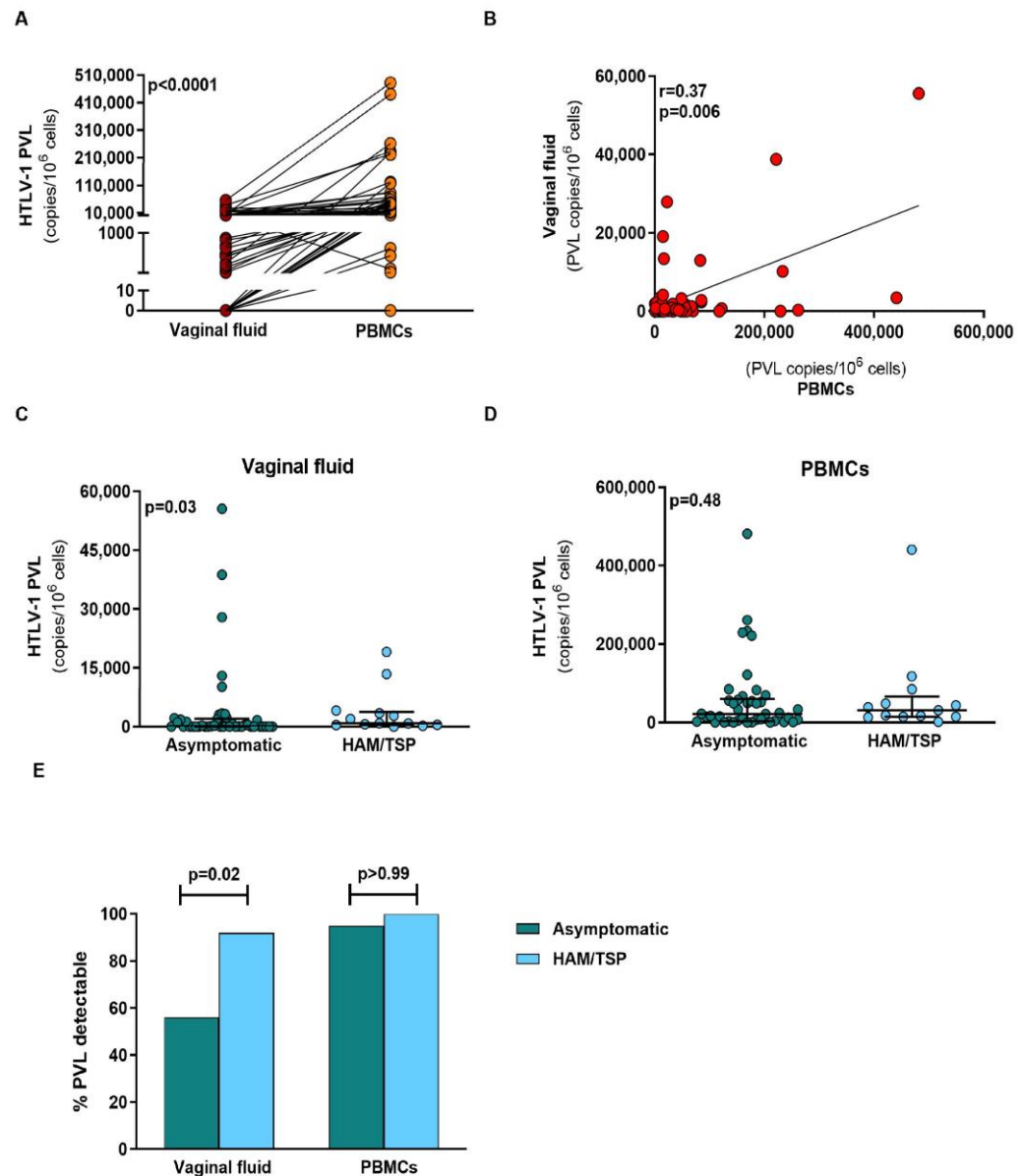


Figure 1. HTLV-1 proviral load (PVL) in vaginal fluid and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from HTLV-1-infected women. (A) Comparison of median PVL in vaginal fluid and PBMCs ($n = 54$) using the Wilcoxon signed rank test. (B) Correlation between PVL in vaginal fluid and PBMCs ($n = 54$) using Spearman's rank correlation testing. (C) HTLV-1 proviral load in vaginal fluid from asymptomatic women ($n = 42$) and women with HAM/TSP ($n = 13$) using the Mann-Whitney test. (D) HTLV-1 proviral load in PBMCs from asymptomatic women ($n = 42$) and women with HAM/TSP ($n = 13$) using the Mann-Whitney test. (E) Percentage of detectable PVL in vaginal fluid and PBMCs in asymptomatic women and women with HAM/TSP ($n = 56$) using Fisher's exact test. p -values < 0.05 considered significant. Analysis performed using GraphPad software Prism (version 9.5, San Diego, CA, USA).

Table 1. Sociodemographic profile of 56 HTLV-1-infected women.

Variable	
Age (years) ^a	35.9 ± 7.2
Family income ^b	1 (1–2)
Educational level (years) ^b	9 (5–12)
Skin color (%) ^c	
Black	26 (46.4)
Mixed-race	21 (37.5)
White	9 (16.1)
Marital status (%) ^c	
Married/Stable relationship	41 (73.2)
Single	14 (25)
Divorced/Separated	1 (1.8)
Partner age (years) ^b	42 (33.5–47.5)
Number of lifetime partners ^b	4 (3–13.5)
Parity ^b	1.5 (1–3)

Family income is expressed as number of monthly minimum wages (USD 250 in 2023) ^a Data presented as mean (standard deviation). ^b Data presented as median and interquartile range (25th–75th percentiles). ^c Data presented as frequency/proportion.

Table 2. HTLV-1 proviral load in peripheral blood mononuclear cells and cervicovaginal fluid, cytopathologic findings, and vaginal microbiota in asymptomatic women and others with HAM/TSP.

Variable	HTLV-1 Asymptomatic (n = 43)	HAM/TSP (n = 13)	p-Value
Cervicovaginal cytopathology n (%) ^a			
Negative for neoplasia	42 (97.7)	12 (92.3)	0.36
ASC-US ^b	1 (2.3)	0	0.58
Unsatisfactory	0	1 (7.7)	0.07
Vaginal microbiota n (%) ^a			
<i>Lactobacillus vaginalis</i>	7 (16.3)	2 (15.4)	0.94
<i>Gardnerella vaginalis</i> / <i>Mobiluncus</i> spp.	9 (20.9)	2 (15.4)	0.66
Coccus/Bacillus	16 (37.2)	6 (46.1)	0.56
<i>Candida</i> spp.	11 (25.6)	2 (15.4)	0.44
Unsatisfactory	0	1 (7.7)	0.07
HTLV-1 PVL in cervicovaginal fluid ^{c,d}	103.1 (0–2000)	869 (447.9–3760)	0.03
HTLV-1 PVL in PBMCs ^{c,d}	21,976 (3420–60,036)	31,080 (14,799–66,420)	0.48

^a Data presented as frequency/proportion; chi-square test. ^b Atypical squamous cells of undetermined significance (ASC-US). ^c Data presented (asymptomatic women (n = 42) and women with HAM/TSP (n = 13)) as median and interquartile range (25th–75th percentiles); Mann–Whitney test. ^d Number of HTLV-1 copies/10⁶ cells. PVL: proviral load; PBMCs: peripheral blood mononuclear cells. HAM/TSP: HTLV-1-associated myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis.

An additional assessment of the cervicovaginal environment was performed comparing women with detectable and undetectable HTLV-1 PVL in vaginal fluid. No statistical differences were found between the groups with regard to neoplasia in the cervicovaginal cytopathology. One patient among those with detectable PVL had atypical squamous cells of undetermined significance (ASC-US). Women with undetectable PVL presented a higher frequency of *Lactobacillus* spp. ($p = 0.004$) and a lower frequency of Coccus/Bacillus ($p = 0.001$). The frequency of *Gardnerella vaginalis* / *Mobiluncus* spp. and *Candida* spp. were similar between the groups (Table 3).

Table 3. Frequency of cervicovaginal cytopathology findings and microbiota in women with detectable and undetectable proviral load in vaginal fluid.

Variable	PVL Detectable (n = 36)	PVL Undetectable (n = 20)	p-Value
Cervicovaginal cytopathology n (%) ^a			
Negative for neoplasia	34 (94.4)	20 (100)	0.28
ASC-US ^b	1 (2.8)	0	0.45
Unsatisfactory	1 (2.8)	0	0.45
Vaginal microbiota n (%) ^a			
<i>Lactobacillus vaginalis</i>	2 (5.6)	7 (35)	0.004
<i>Gardnerella vaginalis</i> / <i>Mobiluncus</i> spp.	7 (19.4)	4 (20)	0.96
Coccus/Bacillus	20 (55.6)	2 (10)	0.001
<i>Candida</i> spp.	6 (16.6)	7 (35)	0.11
Unsatisfactory	1 (2.8)	0	0.45

^a Data presented as frequency/proportion; chi-square test. ^b Atypical squamous cells of undetermined significance (ASC-US). PVL: proviral load.

4. Discussion

The results of the present study demonstrate a direct correlation between HTLV-1 PVL in vaginal fluid and PVL in PBMCs. Interestingly, a 50-fold difference in PVL levels were found in vaginal fluid compared to peripheral blood. Of note, PVL in vaginal fluid was undetectable in one-third of the women evaluated, almost all (n = 19/20) of whom were asymptomatic. To our knowledge, this was the first study that aimed to quantify and correlate HTLV-1 PVL in vaginal fluid and PBMCs.

The detection of HTLV-1 DNA in cervicovaginal secretion samples was previously reported in 68% of sex workers infected with the virus in Peru, which was further associated with cervicitis [21]. In addition, a study in Gabon evaluated women with HTLV-1 DNA in vaginal fluid, demonstrating the local production of anti-HTLV-1 antibodies, suggesting an immune response in the vaginal mucosa [22]. Our work has previously shown that HTLV-1-infected women exhibit an activated immune response in the vaginal mucosa, as reflected by higher concentrations of cytokines, such as IL-2, TNF, IL-10, IL-4, and IL-17, in cervical fluid compared to uninfected women. Cytokine levels in vaginal fluid have not been found to correlate with HTLV-1 PVL in cervicovaginal fluid or peripheral blood mononuclear cells in asymptomatic patients [13]. In addition, cytokine analyses revealed no differences between women with detectable or undetectable PVL (data not shown).

The role of PVL as a predictor for the development of HTLV-1-associated diseases has been suggested, as patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) and adult T-cell lymphoma/leukemia (ATLL) present higher PVL in PBMCs than asymptomatic carriers [19,23]. Patients with isolated neurological changes, peripheral neuropathy, and neurogenic bladder may also have higher PVL than asymptomatic patients [24,25]. Regarding correlations between PVL in PBMCs and other body fluids, evaluation of paired breast milk and blood samples from HTLV-1-infected women showed a strong correlation between PVL in both compartments [26,27]. Furthermore, a previous study indicated a positive correlation between PVL in PBMCs and saliva, with higher mean PVL found in patients diagnosed with HAM/TSP compared to asymptomatic carriers, suggesting the possible influence of systemic inflammatory symptoms on oral health as well as potential transmission via saliva [28]. A similar correlation was found between PVL in peripheral blood and cerebrospinal fluid (CSF) by Lezin et al. in 2005, who further demonstrated a relevant association with the patients' neurological symptoms [29]. A study conducted in Japan found that higher HTLV-1 PVL in the blood could be indicative of more severe lung involvement, which was also closely correlated with lymphocyte counts and increased PVL in bronchoalveolar fluid [30]. Thus, the presence of HTLV-1 PVL in body compartments may be directly related to localized inflammation and cytokine production, in addition to the presence of diseases associated with HTLV-1. Herein, HTLV-1 PVL was found to be much less detectable in the vaginal fluid of asymptomatic women, which corre-

lated with lower PVL in the PBMCs from these patients. This may be due to the presence of HTLV-1-infected cells in vaginal fluid being related to the natural process of vaginal transudation, which allows lubrication through vasodilation-transudation reactions [31,32], or localized activation of the immune response in the vaginal environment. Importantly, cytopathologic findings and cytokine levels in vaginal fluid were not observed to differ between women with detectable and undetectable PVL. Moreover, cytopathologic findings were similar between asymptomatic carriers and women diagnosed with HAM/TSP. It should be noted that the PVL in the vaginal fluid could be higher than the amount detected, since quantification of PVL represents the proportion of infected cells per cell tested. Healthy vaginal fluid consists of several cell types that are not targets of HTLV-1, such as squamous cells, endocervical cells, polymorphonuclear cells, and plasmacytes [33,34]. The major targets for HTLV-1 are CD4+ T lymphocytes and, to a lesser extent, macrophages, and dendritic cells [12], which are not the predominant components of healthy vaginal fluid.

The present study, it was not possible to determine the factors for correlation of HTLV-1 PVL between vaginal fluid and PBMCs. This interference between the systemic immune response and the immune response activated in the vaginal environment could explain the higher viral concentrations of HTLV-1 in different mucous membranes. However, this still requires in-depth studies, including those on CD4+ and CD8+ T cell counts.

Regarding vaginal microbiota, significantly higher levels of *Lactobacillus* spp. were found in women with undetectable PVL in vaginal fluid, which is likely not clinically relevant considering that high levels are a common finding in the microbiota [35]. In addition, *Coccus/Bacillus* was more abundant in women with detectable PVL in vaginal fluid. While these pathogens may be associated with bacterial vaginosis, they are also present in healthy women [36,37]. Zunt et al. associated cervicitis with increased cervical shedding of HTLV-1 and sexual transmission [21]. However, as confirmatory testing was not performed on the present sample, it was impossible to confirm the species of pathogens found and their possible association with cervicitis, which represents a limitation regarding this association.

The presence of HTLV-1 in the vaginal fluid of infected women may have implications on the route of viral transmission. Sexual transmission of HTLV-1 can occur both from male-to-female as well as vice versa [7,8]. Overall, the frequency of CD4+ T lymphocytes, the main cells targeted by HTLV-1, is higher in the semen than in the vaginal fluid of healthy individuals [12]. However, although no studies have attempted to quantify HTLV-1 PVL in the semen of infected individuals, it has been speculated that higher PVL in semen may explain the presumed greater efficacy of male-to-female sexual transmission [5,7,8]. A report on serodiscordant couples suggested a greater risk of sexual HTLV-1 transmission to a seronegative partner when the infected partner presented higher HTLV-1 PVL in PBMCs compared to couples in which transmission did not occur [8]. On the other hand, the presence of HTLV-1 in vaginal fluid may also be relevant to the vertical transmission of HTLV-1, which is especially important considering that no consensus exists regarding the preferred route of delivery (vaginal versus cesarian) in HTLV-1-infected women. Although less common, transmission from mother-to-child occurs in up to 5% of women who have not breastfed their infants [38–40]. Therefore, it is of utmost importance to determine whether women with higher HTLV-1 PVL may be more likely to transmit the virus to newborns during pregnancy or delivery. To date, the use of antiretroviral drugs has not been recommended during pregnancy for HTLV-1-infected women.

5. Conclusions

Our results support the notion that PVL in peripheral blood may correlate with PVL in vaginal fluid, which is a relevant factor not only for the sexual route of female-to-male HTLV-1 transmission, but could also have repercussions on vertical transmission, particularly in the context of vaginal delivery.

Author Contributions: B.G.-C. and M.F.R.G.: conceptualization; A.d.A.F., P.R.T.G.F., A.L.L.M., T.H.A., L.L.G., E.d.S.B., J.P.L.A. and M.F.R.G.: data curation; A.d.A.F., P.R.T.G.F., A.L.L.M., T.H.A., L.L.G., E.d.S.B., J.P.L.A., B.G.-C. and M.F.R.G.: formal analysis and methodology. All authors involved in investigation; writing—original draft; review; and editing; all contributed to the article, and approved the submitted version. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the Coordination of Superior Level Staff Improvement, Brazil (CAPES)—Finance Code 001, The Bahia State Research Support Foundation (FAPESB)—BOL0525/2019, and the National Foundation for the Development of Private Higher Education (FUNADESP), grants 9600140 and 9600141. Maria Fernanda R. Grassi and Bernardo Galvão-Castro are research fellows of CNPq (308167/2021-0 and 473667/2012-6, respectively).

Institutional Review Board Statement: The present study protocol was approved by the Institutional Research Board of EBMSP (CAAE 33098414.4.0000.5544). All procedures were planned and carried out in accordance with the ethical principles established by the Declaration of Helsinki.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The original contributions presented in the study are included in the article. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

Acknowledgments: We would also like to thank Andris K. Walter for critical analysis, English language revision, and manuscript copyediting assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

- Poiesz, B.J.; Ruscetti, F.W.; Gazdar, A.F.; Bunn, P.A.; Minna, J.D.; Gallo, R.C. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, *77*, 7415–7419. [\[CrossRef\]](#)
- Gessain, A.; Cassar, O. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. *Front. Microbiol.* **2012**, *3*, 388. [\[CrossRef\]](#)
- Dourado, I.; Alcantara, L.C.; Barreto, M.L.; da Gloria Teixeira, M.; Galvão-Castro, B. HTLV-I in the general population of Salvador, Brazil: A city with African ethnic and sociodemographic characteristics. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **2003**, *34*, 527–531. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Nunes, D.; Boa-Sorte, N.; Grassi, M.F.; Taylor, G.P.; Teixeira, M.G.; Barreto, M.L.; Dourado, I.; Galvão-Castro, B. HTLV-1 is predominantly sexually transmitted in Salvador, the city with the highest HTLV-1 prevalence in Brazil. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0171303. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Nakano, S.; Ando, Y.; Ichijo, M.; Moriyama, I.; Saito, S.; Sugamura, K.; Hinuma, Y. Search for possible routes of vertical and horizontal transmission of adult T-cell leukemia virus. *GANN Jpn. J. Cancer Res.* **1984**, *75*, 1044–1045.
- Pereira, C.C.C.; La-Roque, D.G.d.L.; Albuquerque, R.D.S.; Silva, I.C.; Covre, L.D.S.C.; Nobre, A.F.S.; Reis, M.D.N.L.D.; de Assis, I.M.; de Souza, J.D.; de Moraes, S.S.; et al. Human T-lymphotropic virus (HTLV) research in cervical-vaginal discharge samples from women, in Belém, Pará, Brazil. *Res. Soc. Dev.* **2021**, *10*, e9410413867. [\[CrossRef\]](#)
- Kajiyama, W.; Kashiwagi, S.; Ikematsu, H.; Hayashi, J.; Nomura, H.; Okochi, K. Intrafamilial transmission of adult T cell leukemia virus. *J. Infect. Dis.* **1986**, *154*, 851–857. [\[CrossRef\]](#)
- Roucoux, D.F.; Wang, B.; Smith, D.; Nass, C.C.; Smith, J.; Hutching, S.T.; Newman, B.; Lee, T.H.; Chafets, D.M.; Murphy, E.L.; et al. A prospective study of sexual transmission of human T lymphotropic virus (HTLV)-I and HTLV-II. *J. Infect. Dis.* **2005**, *191*, 1490–1497. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Murphy, E.L. The clinical epidemiology of human T-lymphotropic virus type II (HTLV-II). *JAIDS J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **1996**, *13*, S215–S219. [\[CrossRef\]](#)
- Manns, A.; Hisada, M.; La Grenade, L. Human T-lymphotropic virus type I infection. *Lancet* **1999**, *353*, 1951–1958. [\[CrossRef\]](#)
- Yasunaga, J.-I.; Sakai, T.; Nosaka, K.; Etoh, K.-I.; Tamiya, S.; Koga, S.; Mita, S.; Uchino, M.; Mitsuya, H.; Matsuoka, M. Impaired production of naive T lymphocytes in human T-cell leukemia virus type I-infected individuals: Its implications in the immunodeficient state. *Blood* **2001**, *97*, 3177–3183. [\[CrossRef\]](#)
- Pique, C.; Jones, K.S. Pathways of cell-cell transmission of HTLV-1. *Front. Microbiol.* **2012**, *3*, 378. [\[CrossRef\]](#)
- Firmino, A.D.A.; Martins, A.L.L.; Gois, L.L.; Paixão, T.S.; Batista, E.D.S.; Galvão-Castro, B.; Grassi, M.F.R. Evaluation of the cervicovaginal environment in asymptomatic Human T-cell lymphotropic virus type 1 infected women. *Braz. J. Infect. Dis.* **2019**, *23*, 27–33. [\[CrossRef\]](#)

14. Galvão-Castro, B.; Grassi, M.F.R.; Galvão-Castro, A.V.; Nunes, A.; Galvão-Barroso, A.K.; Araújo, T.H.A.; Rathsam-Pinheiro, R.H.; Nunes, C.L.X.; Ribeiro, A.; Lírio, M.; et al. Integrative and Multidisciplinary Care for People Living With Human T-Cell Lymphotropic Virus in Bahia, Brazil: 20 Years of Experience. *Front. Med.* **2022**, *9*, 884127. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Lopes Martins, A.L.; Rios Grassi, M.F.; de Aquino Firmino, A.; Lacerda Araujo, J.P.; Paixao, T.S.; Galvão-Castro, B.; Boa-Sorte, N. Human T-Lymphotropic Virus-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis Is Associated With Sexual Dysfunction in Infected Women of Reproductive Age. *Sex. Med.* **2018**, *6*, 324–331. [\[CrossRef\]](#)
16. De Castro-Costa, C.M.; Araújo, A.Q.; Barreto, M.M.; Takayanagui, O.M.; Sohler, M.P.; Da Silva, E.L.; De Paula, S.M.; Ishak, R.; Ribas, J.G.; Roviroso, L.C.; et al. Proposal for diagnostic criteria of tropical spastic paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy (TSP/HAM). *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **2006**, *22*, 931–935. [\[CrossRef\]](#)
17. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA* **2013**, *310*, 2191–2194. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Dehé, A.; Césaire, R.; Désiré, N.; Lézin, A.; Bourdonné, O.; Béra, O.; Plumelle, Y.; Smadja, D.; Nicolas, J.-C. Quantitation of HTLV-I proviral load by a TaqMan real-time PCR assay. *J. Virol. Methods* **2002**, *102*, 37–51. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
19. Grassi, M.F.; Olavarria, V.N.; Kruschewsky, R.D.A.; Mascarenhas, R.E.; Dourado, I.; Correia, L.C.; De Castro-Costa, C.M.; 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. *J. Med. Virol.* **2011**, *83*, 1269–1274. [\[CrossRef\]](#)
20. Solomon, D.; Davey, D.; Kurman, R.; Moriarty, A.; O'Connor, D.; Prey, M.; Raab, S.; Sherman, M.; Wilbur, D.; Wright, T., Jr.; et al. The 2001 Bethesda System: Terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* **2002**, *287*, 2114–2119. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
21. Zunt, J.R.; Dezzutti, C.S.; Montano, S.M.; Thomas, K.K.; Alarcón, J.O.; Quijano, E.; Courtois, B.N.; Sánchez, J.L.; Campos, P.; Gotuzzo, E.; et al. Cervical shedding of human T cell lymphotropic virus type I is associated with cervicitis. *J. Infect. Dis.* **2002**, *186*, 1669–1672. [\[CrossRef\]](#)
22. Bélec, L.; Georges-Courbot, M.C.; Georges, A.; Mohamed, A.S.; Londos-Gagliardi, D.; Hallouin, M.C.; Hocini, H.; Guillemain, B. Cervi-covaginal synthesis of IgG antibodies to the immunodominant 175–199 domain of the surface glycoprotein gp46 of human T-cell leukemia virus type I. *J. Med. Virol.* **1996**, *50*, 42–49. [\[CrossRef\]](#)
23. Okayama, A.; Stuver, S.; Matsuoka, M.; Ishizaki, J.; Tanaka, G.; Kubuki, Y.; Mueller, N.; Hsieh, C.-C.; Tachibana, N.; Tsubouchi, H. Role of HTLV-1 proviral DNA load and clonality in the development of adult T-cell leukemia/lymphoma in asymptomatic carriers. *Int. J. Cancer* **2004**, *110*, 621–625. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Santos, S.B.; Oliveira, P.; Luna, T.; Souza, A.; Nascimento, M.; Siqueira, I.; Tanajura, D.; Muniz, A.L.; Glesby, M.J.; Carvalho, E.M. Immunological and viral features in patients with overactive bladder associated with human T-cell lymphotropic virus type 1 infection. *J. Med. Virol.* **2012**, *84*, 1809–1817. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Tanajura, D.; Castro, N.; Oliveira, P.; Neto, A.; Muniz, A.; Carvalho, N.B.; Orge, G.; Santos, S.; Glesby, M.J.; Carvalho, E.M. Neurological Manifestations in Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1)-Infected Individuals Without HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis: A Longitudinal Cohort Study. *Clin. Infect. Dis.* **2015**, *61*, 49–56. [\[CrossRef\]](#)
26. Li, H.C.; Biggar, R.J.; Miley, W.J.; Maloney, E.M.; Cranston, B.; Hanchard, B.; Hisada, M. Provirus load in breast milk and risk of mother-to-child transmission of human T lymphotropic virus type I. *J. Infect. Dis.* **2004**, *190*, 1275–1278. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Rosadas, C.; Woo, T.; Haddow, J.; Rowan, A.; Taylor, G.P. Anti-HTLV-1/2 IgG Antibodies in the Breastmilk of Seropositive Mothers. *Microorganisms* **2021**, *9*, 1413. [\[CrossRef\]](#)
28. Lins, L.; de Carvalho, V.J.; de Almeida Rego, F.F.; Azevedo, R.; Kashima, S.; Gallazi, V.N.; Xavier, M.T.; Galvão-Castro, B.; Alcantara, L.C., Jr. Oral health profile in patients infected with HTLV-1: Clinical findings, proviral load, and molecular analysis from HTLV-1 in saliva. *J. Med. Virol.* **2012**, *84*, 1428–1436. [\[CrossRef\]](#)
29. Lezin, A.; Olindo, S.; Olié, S.; Varrin-Doyer, M.; Marlin, R.; Cabre, P.; Smadja, D.; Césaire, R. Human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) proviral load in cerebrospinal fluid: A new criterion for the diagnosis of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis? *J. Infect. Dis.* **2005**, *191*, 1830–1834. [\[CrossRef\]](#)
30. Mori, S.; Mizoguchi, A.; Kawabata, M.; Fukunaga, H.; Usuku, K.; Maruyama, I.; Osame, M. Bronchoalveolar lymphocytosis correlates with human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) proviral DNA load in HTLV-I carriers. *Thorax* **2005**, *60*, 138–143. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
31. Masters, W.H.; Johnson, V.E. (Eds.) *Human Sexual Response*; Little, Brown and Company: New York, NY, USA, 1966.
32. Woodard, T.L.; Diamond, M.P. Physiologic measures of sexual function in women: A review. *Fertil. Steril.* **2009**, *92*, 19–34. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Forsberg, J.-G. Cervicovaginal epithelium: Its origin and development. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **1973**, *115*, 1025–1043. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Pudney, J.; Quayle, A.J.; Anderson, D.J. Immunological microenvironments in the human vagina and cervix: Mediators of cellular immunity are concentrated in the cervical transformation zone. *Biol. Reprod.* **2005**, *73*, 1253–1263. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Amabebe, E.; Anumba, D.O.C. The Vaginal Microenvironment: The Physiologic Role of Lactobacilli. *Front. Med.* **2018**, *5*, 181. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Schwebke, J.R.; Muzny, C.A.; Josey, W.E. Role of *Gardnerella vaginalis* in the pathogenesis of bacterial vaginosis: A conceptual model. *J. Infect. Dis.* **2014**, *210*, 338–343. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

37. Coudray, M.S.; Madhivanan, P. Bacterial vaginosis—A brief synopsis of the literature. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **2020**, *245*, 143–148. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Kinoshita, K.; Amagasaki, T.; Hino, S.; Doi, H.; Yamanouchi, K.; Ban, N.; Momita, S.; Ikeda, S.; Kamihiro, S.; Ichimaru, M. Milk-borne transmission of HTLV-I from carrier mothers to their children. *Jpn. J. Cancer Res.* **1987**, *78*, 674–680.
39. Caterino-de-Araujo, A.; de los Santos-Fortuna, E. No evidence of vertical transmission of HTLV-I and HTLV-II in children at high risk for HIV-1 infection from São Paulo, Brazil. *J. Trop. Pediatr.* **1999**, *45*, 42–47. [[CrossRef](#)]
40. Kashiwagi, K.; Furusyo, N.; Nakashima, H.; Kubo, N.; Kinukawa, N.; Kashiwagi, S.; Hayashi, J. A decrease in mother-to-child transmission of human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) in Okinawa, Japan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2004**, *70*, 158–163. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

4.2 HTLV-1 Infection and Cervicovaginal Susceptibility to High-Risk HPV: Findings from Women Living with HTLV-1 in Salvador, Brazil

No que se refere aos três últimos objetivos específicos desta tese, que foram determinar a frequência da infecção pelo HPV em mulheres infectadas e não infectadas pelo HTLV-1, caracterizar os tipos de HPV encontrados de acordo ao seu risco oncogênico e descrever os achados citopatológicos cérvico-vaginais dos dois grupos, foram avaliadas 155 mulheres atendidas no Centro de HTLV da EBMSP, sendo 79 mulheres infectadas pelo HTLV-1 e 76 não infectadas, estas últimas selecionadas entre acompanhantes ou familiares das pacientes.

Os resultados dessas análises estão apresentados no segundo manuscrito que compõe este trabalho e tem como título **“HTLV-1 Infection and Cervicovaginal Susceptibility to High-Risk HPV: Findings from Women Living with HTLV-1 in Salvador, Brazil”**. O artigo será submetido para publicação na edição especial “Viral Infections in Gynecological Diseases” da revista “Viruses”.

A PCR para HPV revelou 23 amostras positivas, 15 em mulheres infectadas pelo HTLV-1 (19%) e 8 em não infectadas (10,5%) ($p = 0,13$). Foram identificados vinte e três tipos de HPV nos grupos estudados, apenas três tipos (31, 54 e 58) foram detectados em ambos. Observou-se uma distribuição percentual equilibrada desses tipos de HPV, com exceção do tipo 58 de alto risco, que estava presente em 38,1% das mulheres infectadas pelo HTLV-1. 61,9% das mulheres infectadas pelo HTLV-1 apresentaram um ou mais tipos de HPV de provável ou efetivo alto risco oncogênico em suas análises. Nas mulheres não infectadas, essa proporção foi de 44,44%. Com relação aos achados citopatológicos, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas.

HTLV-1 INFECTION AND CERVICOVAGINAL SUSCEPTIBILITY TO HIGH-RISK HPV: FINDINGS FROM WOMEN LIVING WITH HTLV-1 IN SALVADOR, BRAZIL

Alisson de Aquino Firmino¹, Paulo Roberto Tavares Gomes Filho¹, Juliana Domett Siqueira², Luana Leandro Gois^{1,3}, Giselle Calasans de Souza Costa³, Adenilda Lima Lopes Martins^{1,4}, Mariana Lima Drumond¹, Marcelo Alves Soares², Bernardo Galvão-Castro^{1,5}, Carlos Gustavo Régis da Silva⁵, Maria Fernanda Rios Grassi^{1,5*}

¹Bahiana School of Medicine and Public Health (EBMSP), Salvador, Bahia, Brazil

²National Cancer Institute (INCA), Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

³Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia (UFBA), Salvador, Bahia, Brazil

⁴State University of Feira de Santana (UEFS), Feira de Santana, Bahia, Brazil

⁵Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Salvador, Bahia, Brazil

***Corresponding author:**

Maria Fernanda Rios Grassi

e-mail: fernanda.grassi@fiocruz.br

Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal - Salvador/BA, Brazil, CEP: 40296-710

Phone: +55 (71) 3176-2213 / Fax: +55 (71) 3176-2327

ABSTRACT

Background: Cervical cancer is associated with persistent infection with oncogenic Human papillomavirus (HPV) types. A higher prevalence of HPV has been found in women infected with HTLV-1, however few studies have described co-infection. This study aimed to investigate whether there is greater cervicovaginal susceptibility of women living with HTLV-1 to HPV infection and to characterize the types of HPV found according to their oncogenic risk.

Methods: Through consecutive care at a multidisciplinary center for patients with HTLV in Salvador, Bahia, Brazil, women infected with HTLV-1 and uninfected women (companions or relative of the patients) were seen in clinical consultations and underwent gynecological examinations to obtain samples of vaginal fluid that were collected with sterile swabs from the ectocervix, endocervix and vaginal walls. HPV diagnosis was performed by polymerase chain reaction (PCR) using primers to amplify a DNA fragment from the L1 region of the viral genome. All HPV PCR-positive samples were subjected to next-generation sequencing (NGS) using the Illumina platform and to Sanger sequencing. Cell abnormalities detected by Papanicolaou smears were classified by light microscopy using the Bethesda system.

Results: A total of 155 women were examined, of whom 79 were infected with HTLV-1 and 76 were uninfected. HPV PCR revealed 23 positive samples, 15 HTLV-1 infected and 8 uninfected women ($p = 0.13$). Twenty-three types of HPV were identified in the groups studied, only three types (31, 54 and 58) were detected in both. A balanced percentage distribution of these HPV types was observed, with the exception of high-risk type 58, which was present in 38.1% of HTLV-1-infected women. 61.9% of women infected with HTLV-1 had a high-risk type or a probable high-risk type in their analyses. In uninfected women, this proportion was 44.44%. No significant differences were found with respect to cytopathologic findings of HTLV-1-infected and uninfected women.

Conclusion: The distribution of HPV types was similar between the HTLV-1-infected and uninfected groups, with the exception of high-risk type 58, which was more frequent in HTLV-1-infected women. Further studies are required to determine whether HTLV-1 infection influences the course of HPV infection and the development of cervical cancer.

Keywords: HTLV-1; HPV; co-infection, cervical cancer.

INTRODUCTION

An estimated 5-10 million people worldwide are infected with human T-leukemia virus type 1 (HTLV-1). This virus is currently widespread in Brazil, with approximately 800,000 HTLV-1 carriers. In Salvador, the prevalence in the general population is 1.8%, with 1.2% of men and 2.0% of women affected. Infection is more prevalent in women and affects 10% of people over 50 years [1,2]. Transmission of HTLV-1 occurs via the horizontal route (sexual contact, blood transfusion, sharing contaminated syringes and sharps) and the vertical route (breastfeeding, transplacental transmission or during childbirth) [1,3,4]. A recent study has shown that sexual transmission between adults is the main route of HTLV-1 infection in the general population of Salvador [5].

Human papillomavirus (HPV) is the most common sexually transmitted infection (STI) in the world and is directly linked to cervical cancer [6-8], one of the most prevalent cancers in several countries, including Brazil [9,10]. It is estimated that at least 50% of sexually active people come into contact with HPV at some point in their lives and that 80% of women have this contact by the age of 50 [11,12]. More than 200 different HPV types have been identified, which are classified as low or high risk for cervical cancer [13,14]. Fifteen types were classified as high oncogenic risk (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 and 82), three types (26, 53 and 66) were considered probable high risk, twelve types (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 and 89) were classified as low risk, and three types (34, 57 and 83) were associated with an undetermined risk [15]. HPV types 16 and 18 are responsible for about 70% of all invasive cervical cancer cases. HPV types 6 and 11, which are found in most genital warts and laryngeal papillomas, do not appear to pose a high risk for the development of malignant disease, although they are present in a small proportion of malignant tumors [16-18].

There is no consensus on the epidemiological aspects of HTLV-1/HPV co-infection in the few studies that have investigated the effects of this viral association in the cervicovaginal environment [19-21]. A pilot study with 90 women showed a higher prevalence of HPV in the group of patients infected with HTLV-1 [19]. Another study reported that HTLV-1 infection was associated with high-risk HPV infection, with HPV16 being the most common type [20]. In contrast, a study that evaluated the association between 24 specific types of HPV and HTLV-1 infection found an association in only one type, HPV53, a probable high-risk type [21]. Our previous work showed that the HTLV-1 proviral load is detectable in vaginal fluid and that virus infection induces local immunological activation, characterized by an increase in the concentrations of Th1, Th2 and IL17 cytokines. We also observed that HTLV-1-infected women carrying HAM/TSP had decreased vaginal lubrication compared with asymptomatic women and uninfected women. These findings allow us to suggest that a more inflamed vaginal environment and less protected by natural lubrication against external pathogens may increase the local vulnerability of HTLV-1-infected women to other sexually transmitted infections, such as HPV [22-24].

Investigating whether there is greater cervicovaginal susceptibility of women infected with HTLV-1 to HPV infection and characterizing the types of HPV found according to their oncogenic risk can help in understanding the possible pathological and inflammatory changes associated with HTLV-1 in this environment. These findings may have implications for public health policies, such as the route of delivery and whether HPV vaccination should be prioritized in women infected with HTLV-1. The aim of this study was to investigate whether there is greater cervicovaginal susceptibility of women infected by HTLV-1 to HPV infection and to characterize the types of HPV found according to their oncogenic risk.

METHODS

Patients and study design

This was a cross-sectional study conducted at the Integrative Multidisciplinary HTLV Center (CHTLV) of the Bahiana School of Medicine and Public Health (EBMSP) in Salvador, Bahia, Brazil, from October 2014 to November 2015 [25]. Patients were included sequentially, at the time of consultation, based on the following inclusion criteria: Diagnosis of HTLV-1 infection (ELISA enzyme-linked immunosorbent assay and Western blot positive), age over 18 years and active sexual life. The uninfected group were selected from companions or relatives of patients who attended consultations, with the same criteria such as age and sexual activity. Women with positive HIV serology, those patients who were vaccinated against HPV, pregnant, postpartum up to 42 days, breastfeeding, transplant recipients, patients undergoing chemotherapy, radiotherapy, or corticosteroid therapy or those suffering from diseases that affect the immune system, and patients undergoing total hysterectomy or cervical amputation were excluded.

The sample size was calculated based on a 30% estimated prevalence of HPV infection for HTLV-1 uninfected women and 60% in HTLV-1 infected, with an estimated prevalence ratio (PR) of 2.0 [11,19]. Adopting an alpha error of 5% and power of 80%, the necessary sample size was determined to be, at least, 49 women in each group.

Ethical approval

The present study protocol was approved by the EBMSP Institutional Research Board (CAAE 33098414.4.0000.5544). All procedures were planned and conducted in accordance with the ethical principles of the Declaration of Helsinki [26]. All participants signed an informed consent form.

Sample collection

Clinical and demographic data were collected using a standardized form. Whole blood samples were collected in EDTA tubes and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were separated by density gradient centrifugation and cryopreserved until use. A complete gynecologic examination and collection of cervicovaginal samples were performed by a single trained gynecologist. Cotton swabs were used to collect fluid from the ectocervix, endocervix and vaginal walls for molecular HPV diagnosis. The samples collected for analysis were then placed in tubes containing 400 µl hydroxymethyl ethylene diamine tetra-acetic acid (Tris-EDTA) solution and stored at -20°C. For cytopathological and vaginal microbiota analysis, Papanicolaou smears were collected from the ectocervix and endocervix using an Ayres spatula and a cytobrush, respectively. The collected samples were fixed in absolute alcohol for further processing.

Cytopathological analysis, DNA extraction and amplification of the HPV genome

Cell abnormalities detected by Papanicolaou smears were classified according to the Bethesda system using light microscopy [27]. Total DNA was extracted with the QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Valencia, CA) using the Spin Column DNA Extraction System and stored at -20 °C until use. The presence of HPV DNA was determined by amplification with a set of oligonucleotides. PCR was performed using the set of consensus and degenerate primers MY09 (5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3') / MY11 (5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3'), which anneal in a conserved region of the L1 gene and amplify a product of approximately 450 bp. The standard PCR reaction mix was adjusted to a final volume of 50 µL using the following reagent concentrations: 1.25 µL of each primer, 25 µL of NZYTaq II 2× Green Master Mix (NZYTech, Lisbon, PT), and nuclease-free water to 50 µL. Under laminar flow, 1 to 6 µL (100 ng) of DNA was added from each sample. This assay included the primers

PC04/GH20 that amplify a 268-bp cellular β -globin DNA fragment, which served as an internal control for adequacy of amplification. A previously HPV-diagnosed sample, provided by a partner laboratory, served as a positive control. The negative control was consisted of ultrapure water without DNA. The fragments were amplified in a thermocycler under the following conditions: initial denaturation at 94 °C for 4 minutes, 40 cycles of denaturation at 94 °C for 30 seconds, annealing at 55 °C for 30 seconds and extension at 72 °C for 30 seconds, with final extension at 72 °C for 8 minutes. The PCR products were subjected to electrophoresis in a 1% agarose gel under constant voltage. The bands were visualized by staining with SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, USA) and documented photographically.

Circular DNA enrichment, sequencing and virome analysis

Circular DNA was enriched by rolling circle amplification (RCA) using the Illustra TempliPhi Amplification Kit (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ) according to the manufacturer's instructions. The positive control used was provided with the kit. The RCA products were visualized in 0.8% agarose gel electrophoresis as a band ~12 kb in size. DNA products were purified, and 2 ng was used to prepare each sample library using the Nextera XT DNA Sample Preparation Kit (Illumina Inc., San Diego, CA). All samples were individually indexed by adding pairs of indexing primers, and library concentrations were determined using a Qubit 4 Fluorometer with dsDNA HS Assay Kit for Qubit (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). Libraries were diluted to a final concentration of 12 pM and loaded onto the flowcell before clonal cluster generation using cBot (Illumina Inc.). Samples were sequenced on an Illumina MiSeq platform (2 x 100 nt reads).

Reads with a Phred quality score below 28 were trimmed using Sickle and the remaining reads were mapped to the human reference genome hg19 using BWA to remove human reads. Non-human reads were compared to viral sequences using BLASTX [28-30] and RefSeq's viral

protein database. Hits with an e-value below 0.01 were submitted to BLASTX against GenBank's non-redundant database. Reads were classified as virus/non-virus and the virus family was defined based on the most similar sequences found in the database. The relative abundance of the viruses was calculated by dividing the number of reads assigned to each virus family by the total number of trimmed reads submitted to BLASTX. Reads were also assembled with HPV reference genomes from the Papillomavirus Episteme (PaVE) database (<http://pave.niaid.nih.gov>) using Geneious R11 (Biomatters, Auckland, New Zealand) and consensus sequences representing the complete HPV genomes were extracted.

In addition to next-generation sequencing (NGS), traditional sequencing was performed using the Sanger method. The sequences obtained were also analyzed using the PaVE database.

Statistical evaluations

Quantitative sociodemographic and clinical variables without normal distribution, such as age, educational level, weekly sexual frequency, number of partners, pregnancies, parity and abortions were analyzed using the nonparametric Mann-Whitney U test and presented as median values and 25th and 75th percentiles. The qualitative variables skin color, marital status, smoking, social alcohol use, illicit drug use, sexually transmitted infections, treatment with trichloroacetic acid, dyspareunia, bleeding after sex, and contraceptive methods were expressed as simple frequencies/proportions and analyzed using the chi-square test or Fisher's exact test. HPV PCR was analyzed using the chi-square test. HPV oncogenic risk and differences in cervicovaginal cytopathological profiles were assessed using Fisher's exact test. Statistical significance was set at p-values < 0.05. All analyzes were performed using GraphPad software version 9.5 and SPSS software version 17.0 for Windows.

RESULTS

A total of 155 women were examined, of whom 79 were infected with HTLV-1 and 76 were uninfected. No significant differences were found between the groups with regard to sociodemographic profiles and use of legal and illegal substances. In the sexual behavior of both groups, HTLV-1-infected women had a lower weekly sexual frequency ($p < 0.0001$), a greater number of lifetime partners ($p = 0.0029$) and a lower number of sexual partners in the last 6 months ($p = 0.0007$). They reported more pregnancies and births than uninfected women ($p < 0.0001$) and there was no difference in the number of abortions ($p = 0.86$). In terms of clinical characteristics, there were no significant differences in sexually transmitted infections history, use of trichloroacetic acid to treat HPV infections, dyspareunia or bleeding after intercourse. HTLV-1-infected women reported lower contraceptive use than HTLV-1-uninfected women ($p = 0.001$) (Table 1). Of the HTLV-1-infected women who used some contraceptive methods, only 20% used condoms. This rate was slightly higher, around 30% in uninfected women.

Table 1. Sociodemographic profile, clinical characteristics, and sexual behavior of HTLV-1-infected and uninfected women evaluated in Salvador, Bahia - Brazil

Variable	HTLV-1-Infected (n = 79)	HTLV-1 uninfected (n = 76)	p-value
Age (years) ¹	39 (26-53)	40 (33-51)	0.78
Educational level (years) ¹	9 (5-11)	7 (5-10.5)	0.79
Skin color n (%) ²			0.74
Black	28 (35.4)	27 (35.5)	
Brown	44 (55.7)	40 (52.7)	
White	7 (8.9)	8 (10.5)	

Indigenous	0 (0)	1 (1.3)	
Marital status n (%)²			0.98
Married / Stable union	29 (36.7)	29 (38.2)	
Single	37 (46.8)	35 (46.1)	
Widow	4 (5.1)	3 (3.9)	
Divorced / Separated	9 (11.4)	9 (11.8)	
Smoker n (%)³			0.21
Yes	5 (6.3)	1 (1.3)	
No	74 (93.7)	75 (98.7)	
Social drinker n (%)²			0.13
Yes	20 (25.3)	11 (14.5)	
No	59 (74.7)	65 (85.5)	
Illicit drug user n (%)³			1.00
Yes	1 (1.3)	1 (1.3)	
No	78 (98.7)	75 (98.7)	
Weekly sexual frequency¹	0 (0-1)	0 (1-3)	<0.0001
Number of partners¹			
Lifetime	3 (1-5)	2 (1-3)	0.0029
Last 6 months	0 (0-1)	1 (1-1)	0.0007
Pregnancies¹	3 (1-5)	1 (1-2)	<0.0001
Parity¹	2 (1-4)	1 (1-2)	<0.0001
Abortions¹	0 (0-1)	0 (0-1)	0.86
STIs history n (%)^{3*}			0.76
Yes	5 (6.3)	6 (7.9)	
No	74 (93.7)	70 (92.1)	

TCA n (%)^{3#}			0.09
Yes	2 (2.5)	7 (9.2)	
No	77 (97.5)	69 (90.8)	
Dyspareunia n (%)²			0.90
Yes	15 (19)	16 (21.1)	
No	64 (81)	60 (78.9)	
Bleeding After Sex n (%)³			1.00
Yes	4 (5.1)	4 (5.3)	
No	75 (94.9)	72 (94.7)	
Contraceptive Methods n (%)²			0.001
Yes	10 (12.7)	28 (36.8)	
No	69 (87.3)	48 (63.2)	

¹ Data presented as median and interquartile range (p25 - p75) - p-value: Mann-Whitney U test. ² Data presented as frequency / proportion - p-value: Chi-square test. ³ Data presented as frequency / proportion - p-value: Fisher's exact test. * STIs: Sexually Transmitted Infections. # TCA: Trichloroacetic acid.

Regarding cytopathological findings, no significant differences were observed in the frequency of women whether they were infected or not infected with HTLV-1. Six cases were positive for atypia or lesions, 3 in the HTLV-1-infected group (1 ASC-US, LSIL and HSIL) and 3 (one ASC-US and 2 LSIL) in HTLV-1-uninfected women. PCR for HPV of vaginal samples yielded 23 positive samples, 15 (19%) from HTLV-1 infected and 8 (10.5%) from uninfected women. There was no statistically significant difference between the groups ($p = 0.13$) (Table 2).

Table 2. Frequency of cervicovaginal cytopathological findings and of HPV infection in HTLV-1-infected and uninfected women.

Variable	HTLV-1-Infected (n = 79)	HTLV-1 uninfected (n = 76)	p-value
Cervicovaginal cytopathology n (%)¹			
NILM ^a	74 (93.5)	73 (96.1)	0.72
ASC-US ^b	1 (1.3)	1 (1.3)	1.00
LSIL ^c	1 (1.3)	2 (2.6)	0.61
HSIL ^d	1 (1.3)	0	1.00
Unsatisfactory	2 (2.6)	0	0.49
HPV PCR n (%)²			0.13
Positive	15 (19)	8 (10.5)	
Negative	64 (81)	68 (89.5)	

¹ Data presented as frequency / proportion - p-value: Fisher's exact test. ² Data presented as frequency /

proportion - p-value: Chi-square test. ^a Negative for Intraepithelial Lesion or Malignancy. ^b Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance. ^c Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion. ^d High-Grade Squamous Intraepithelial Lesion. PCR: Polymerase Chain Reaction.

Of the 23 samples positive for HPV PCR, three had some type of atypia in cervicovaginal cytopathology, one ASC-US in an HTLV-1-infected woman and two LSIL in uninfected women. All PCR-positive samples were subjected to next-generation sequencing (NGS) and Sanger sequencing, 13 were positive for some HPV type in the HTLV-1 infected group and 7 in the group of uninfected women. NGS found 4 women with multiple HPV types, two in each group (Table 3).

Table 3. Cervicovaginal cytopathology and HPV types found in 23 PCR-positive HTLV-1-infected and uninfected women.

Sample ID	Cervicovaginal cytopathology	HPV NGS - Types	HPV Sanger - Types
HTLV-1-Infected (n = 15)			
3	NILM	Not detected	53
12	NILM	Not detected	58
13	NILM	Not detected	58
15	NILM	42,54,70,72	Not detected
17	NILM	Not detected	58
19	NILM	Not detected	Not detected
20	ASC-US	58	58
21	NILM	Not detected	58
29	NILM	72,74	72
37	NILM	58	58
41	NILM	26,31,68,69	Not detected
47	NILM	58	Not detected
51	NILM	Not detected	Not detected
79	NILM	58	58
141	NILM	6,16	6
HTLV-1 uninfected (n = 8)			
42	LSIL	Not detected	61
83	LSIL	31,35,51,59,61,83,213	83
84	NILM	35,44,58,59,83,84	Not detected
92	NILM	Not detected	71
102	NILM	Not detected	Not detected
120	NILM	33	33
126	NILM	54	Not detected
144	NILM	Not detected	61

NILM: Negative for Intraepithelial Lesion or Malignancy. ASC-US: Atypical Squamous Cells of Undetermined

Significance. LSIL: Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion. PCR: Polymerase Chain Reaction. NGS:

Next-Generation Sequencing.

Twenty-three types of HPV were identified in the groups studied. Thirteen types were present in HTLV-1-infected women and thirteen types in uninfected women, only three types (31, 54 and 58) were detected in both groups. A balanced percentage distribution of these HPV types was observed, with the exception of high-risk type 58, which was present in 38.1% of HTLV-1-infected women (Figure 1A, 1B). 61.9% of women infected with HTLV-1 had a high-risk type or a probable high-risk type in their analyses. In uninfected women, this proportion was 44.44% (Figure 1C, 1D). However, there was no significant difference between the compared groups ($p = 0.12$).

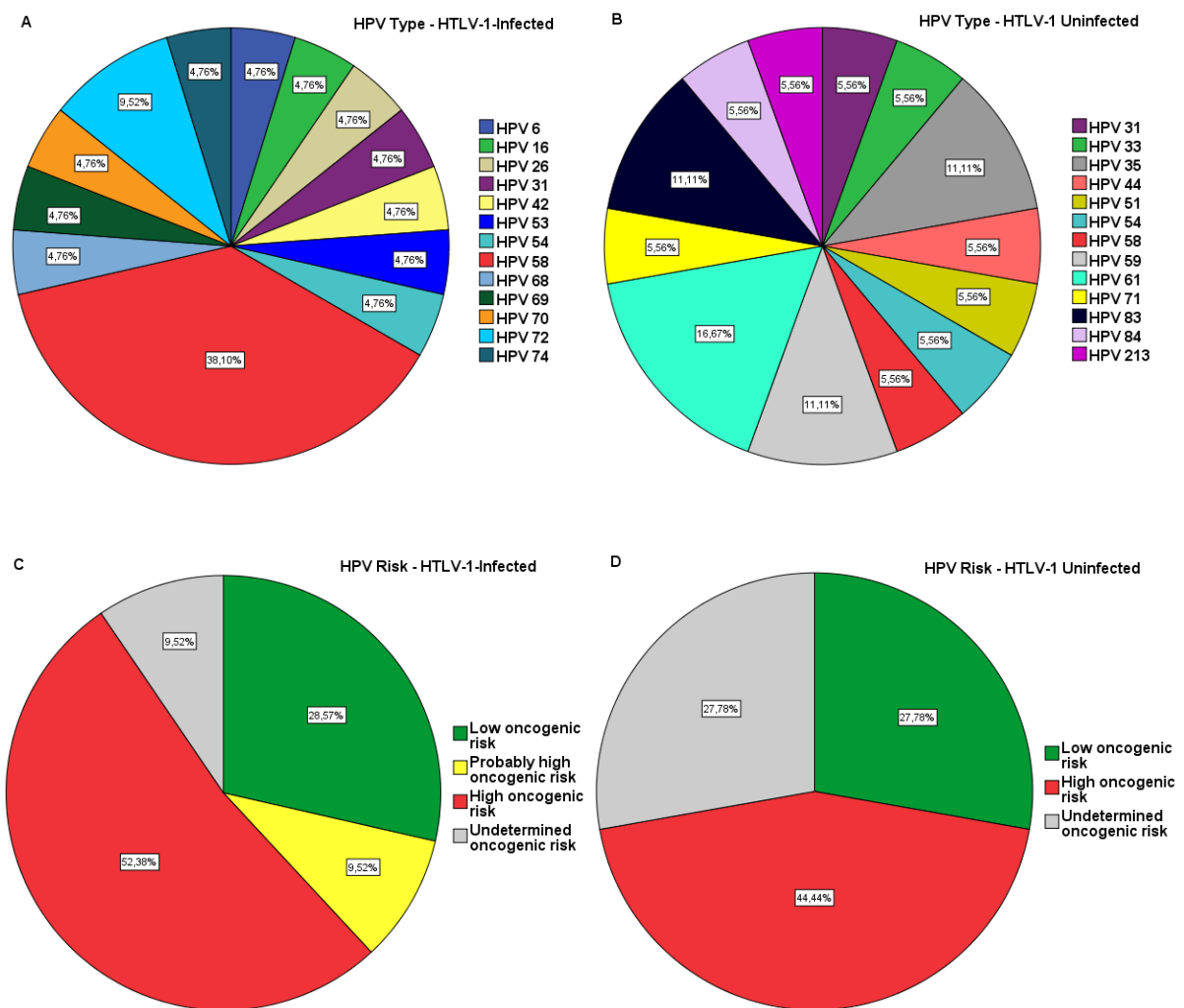


Figure 1. Percentage of HPV types (A, B) and oncogenic risk (C, D) found by NGS and Sanger Sequencing in HTLV-1-infected ($n = 13$) and uninfected ($n = 7$) women using frequency/proportion - P-value: Fisher's exact test ($p = 0.12$).

DISCUSSION

The results of the present study show that the frequency of HPV in the cervicovaginal fluid of HTLV-1-infected women is about twice that of HTLV-1-negative women, although the difference in proportion was not statistically significant. In addition, we found that more than half of HTLV-1-infected women had one or more HPV types with probable or actual high oncogenic risk. Interestingly, HPV58, a high-risk virus type, was found in 38.1% of the HTLV-1-infected women, whereas its frequency in the HTLV-1-uninfected group was only 5.56%. The HPV58 type is associated with persistent, high-grade lesions and a high prevalence of cervical cancer. A study conducted in China found that one third of patients with cervical cancer were positive for HPV58 [31,32]. An interesting finding found in both HTLV-1 infected and uninfected women was the presence of co-infection with multiple HPV types, which was observed in four patients. Co-infection with multiple HPV types is mainly reported in people living with HIV [33-35]. However, HIV seropositivity was an exclusion criterion in our study, therefore, we excluded this possibility.

To our knowledge, few studies have performed a more detailed analysis of co-infection, and there is no consensus on the epidemiological aspects of the HTLV-1/HPV relationship [19-21]. One of these studies, conducted in the Peruvian Amazon, reported that HTLV-1 infection is associated with high-risk HPV infection. The most common high-risk HPV type was HPV16 (10.8%), followed by HPV31 (5.9%) and HPV18 (4.9%) [20]. Another study carried out in Kenya evaluated the association between 24 specific types of HPV and HTLV-1 infection and found an association in only one type, HPV53, which is a probable high-risk type [21].

Although not statistically significant, we found a higher frequency of HPV in HTLV-1-infected women (19% versus 10.5%). These data confirm the results of a study conducted in Brazil, which also found twice the percentage of HTLV-1/HPV-coinfected women (44% versus

22.5%) compared to women without HTLV-1 exposure who tested positive for HPV [19]. Similar results were found in another study, which reported that women with HTLV-1 were twice as likely to have HPV infection of any type than HTLV-1-negative women [20]. It is worth noting that in our study, women infected with HTLV-1 had a greater number of partners over their lifetime and used fewer contraceptive methods. Of those who used any, only 20% used condoms. Although vaccines are undoubtedly the most effective method of protection against HPV, condom use appears to play an important role in reducing HPV infections [36,37].

Regarding the cervicovaginal cytopathological analysis, no difference was found between the groups. More than 90% of women in both groups had a cytopathological diagnosis of a negative for intraepithelial lesion or malignancy (NILM). In other studies, no significant differences in cervicovaginal cytopathology were found between HTLV-1-infected and uninfected individuals [19-22]. Only three patients did the cytological findings match the positive results of PCR and HPV genotyping by NGS or Sanger. Even in the patient with HSIL, a precursor lesion of squamous cell carcinoma [38], the results were not confirmed by PCR. In addition, 17 cases with NILM cytopathology were positive on PCR and confirmed in NGS or Sanger. In fact, several studies have shown that cytological findings have low sensitivity for the diagnosis of HPV infection [39-41].

As reported in the literature, HPV infection of the cervix is closely associated with cervical cancer. Approximately 99.7% of squamous cell carcinomas are caused by persistent genital high-risk human papillomavirus infection, and nearly 90% of cervical adenocarcinomas are also associated with the virus [8,42,43]. As with HPV infection, there is no consensus in some studies conducted to investigate the association between HTLV-1 infection and cervical cancer. Extensive work in Japan suggests that HTLV-1 infection may affect oncogenic prognosis of some patients with cervical or vaginal cancer [44]. Consistent with this finding, a study in Jamaica showed increased rates of HTLV-1 infection in individuals with high-grade cervical

intraepithelial neoplasia or cancer compared with individuals with low-grade cervical intraepithelial neoplasia or more benign pathologic conditions [45]. Several years later, however, the same group of researchers obtained data that contrasted with their pilot project. They found that HTLV-1 infection did not significantly contribute to the risk of cervical neoplasia [46]. Two other studies, conducted in Mexico and Kenya, also concluded that there was no association between HTLV-1 infection and cervical cancer [21,47].

As a limitation of this work, we point out that the number of women who participated in the study was small and this may have affected the scope of the investigation both for HPV infection and cytopathological changes. Furthermore, clinical monitoring of these women would be important to observe whether the types of HPV found persist and their degree of risk for cancer. In addition, HTLV-1-infected women were not categorized according to the presence or absence of HAM/TSP, a factor that may elucidate gaps regarding HTLV-1/HPV co-infection in women affected by this comorbidity. The pathogenesis of this viral association could be better established by quantifying the proviral load in the peripheral blood and vaginal fluid of women infected with HTLV-1 with HPV, but it was not possible to perform these quantifications.

In conclusion, we found a higher proportion of HPV infection in HTLV-1-infected women compared to uninfected women, although the difference was not statistically significant. The percentage distribution of HPV types was similar between the two groups, with the exception of high-risk type 58, which was more prevalent in HTLV-1-infected women. No significant differences were found in cytopathologic findings between the two groups. The results suggest a possible association between HTLV-1 and certain high-risk HPV types. Further studies are needed to determine whether HTLV-1 infection influences the course of HPV infection and the development of cervical cancer. These findings may have implications for public health policy, such as whether the HPV vaccine should be prioritized in women living with HTLV-1.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AAF and MFRG: conceptualization. AAF, PRTGF, JDS, LLG, GCSC, ALLM, MLD, MAS, BG-C, CGRS and MFRG: data curation. AAF, PRTGF, JDS, LLG, GCSC, ALLM, MLD, MAS, BG-C, CGRS and MFRG: formal analysis and methodology. All authors involved in investigation, writing—original draft, review, and editing, contributed to the article, and approved the submitted version.

FUNDING

This work was supported by the Coordination of Superior Level Staff Improvement-Brazil (CAPES) - Finance Code 001, The Bahia State Research Support Foundation (FAPESB) - BOL0525/2019 and National Foundation for the Development of Private Higher Education (FUNADESP), grants 9600140 and 9600141. Maria Fernanda R. Grassi and Bernardo Galvão-Castro are research fellows of CNPq (308167/2021-0 and 473667/2012-6, respectively).

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

REFERENCES

1. Gessain A, Mahieux R. Tropical spastic paraparesis and HTLV-1 associated myelopathy: clinical, epidemiological, virological and therapeutic aspects. *Rev Neurol (Paris)*. 2012 Mar;168(3):257-69. doi: 10.1016/j.neurol.2011.12.006. Epub 2012 Mar 7. PMID: 22405461.
2. Dourado I, Alcantara LC, Barreto ML, da Gloria Teixeira M, Galvão-Castro B. HTLV-I in the general population of Salvador, Brazil: a city with African ethnic and sociodemographic characteristics. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2003 Dec 15;34(5):527-31. doi: 10.1097/00126334-200312150-00013. PMID: 14657765.
3. Paiva A, Casseb J. Sexual transmission of human T-cell lymphotropic virus type 1. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2014 May-Jun;47(3):265-74. doi: 10.1590/0037-8682-0232-2013. PMID: 25075475.
4. Bittencourt AL. Vertical transmission of HTLV-I/II: a review. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1998 Jul-Aug;40(4):245-51. doi: 10.1590/s0036-46651998000400008. PMID: 9876439.
5. Nunes D, Boa-Sorte N, Grassi MF, Taylor GP, Teixeira MG, Barreto ML, Dourado I, Galvão-Castro B. HTLV-1 is predominantly sexually transmitted in Salvador, the city with the highest HTLV-1 prevalence in Brazil. *PLoS One*. 2017 Feb 3;12(2):e0171303. doi: 10.1371/journal.pone.0171303. PMID: 28158226; PMCID: PMC5291389.
6. Castellsagué X, Bosch FX, Muñoz N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res*. 2002 Nov;89(2):191-9. doi: 10.1016/s0168-1702(02)00188-0. PMID: 12445659.
7. Scott-Wittenborn N, Fakhry C. Epidemiology of HPV Related Malignancies. *Semin Radiat Oncol*. 2021 Oct;31(4):286-296. doi: 10.1016/j.semradonc.2021.04.001. PMID: 34455984; PMCID: PMC9057013.
8. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*. 1999 Sep;189(1):12-9. doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(199909)189:1<12::AID-PATH431>3.0.CO;2-F. PMID: 10451482.

9. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021 May;71(3):209-249. doi: 10.3322/caac.21660. Epub 2021 Feb 4. PMID: 33538338.
10. Santos M de O, Lima FC da S de, Martins LFL, Oliveira JFP, Almeida LM de, Cancela M de C. Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. *Rev. Bras. Cancerol*. [Internet]. 6º de fevereiro de 2023 [citado 15º de outubro de 2023];69(1):e-213700. Disponível em: <https://rbc.inca.gov.br/index.php/revista/article/view/3700>
11. Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol*. 2005 Mar;32 Suppl 1:S16-24. doi: 10.1016/j.jcv.2004.12.008. PMID: 15753008.
12. Chesson HW, Dunne EF, Hariri S, Markowitz LE. The estimated lifetime probability of acquiring human papillomavirus in the United States. *Sex Transm Dis*. 2014 Nov;41(11):660-4. doi: 10.1097/OLQ.0000000000000193. PMID: 25299412; PMCID: PMC6745688.
13. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*. 2010 May 25;401(1):70-9. doi: 10.1016/j.virol.2010.02.002. Epub 2010 Mar 5. PMID: 20206957; PMCID: PMC3400342.
14. Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, Stanley MA. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*. 2012 Nov 20;30 Suppl 5:F55-70. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.06.083. PMID: 23199966.
15. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003 Feb 6;348(6):518-27. doi: 10.1056/NEJMoa021641. PMID: 12571259.
16. Wheeler CM, Hunt WC, Joste NE, Key CR, Quint WG, Castle PE. Human papillomavirus genotype distributions: implications for vaccination and cancer screening in

the United States. *J Natl Cancer Inst.* 2009 Apr 1;101(7):475-87. doi: 10.1093/jnci/djn510. Epub 2009 Mar 24. PMID: 19318628; PMCID: PMC2664090.

17. Gissmann L, Wolnik L, Ikenberg H, Koldovsky U, Schnürch HG, zur Hausen H. Human papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983 Jan;80(2):560-3. doi: 10.1073/pnas.80.2.560. PMID: 6300854; PMCID: PMC393419.

18. Heinzel PA, Chan SY, Ho L, O'Connor M, Balaram P, Campo MS, Fujinaga K, Kiviat N, Kuypers J, Pfister H, et al. Variation of human papillomavirus type 6 (HPV-6) and HPV-11 genomes sampled throughout the world. *J Clin Microbiol.* 1995 Jul;33(7):1746-54. doi: 10.1128/jcm.33.7.1746-1754.1995. PMID: 7665641; PMCID: PMC228262.

19. Lôpo SS, Oliveira PM, Santana IU, Pena GB, Torrales MB, Mascarenhas RE, Galvão-Castro B, Grassi MF. Evidence of a higher prevalence of HPV infection in HTLV-1-infected women: a cross-sectional study. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2012 Jun;45(3):305-8. doi: 10.1590/s0037-86822012000300005. PMID: 22760126.

20. Blas MM, Alva IE, Garcia PJ, Carcamo C, Montano SM, Muñante R, Zunt JR. Association between human papillomavirus and human T-lymphotropic virus in indigenous women from the Peruvian Amazon. *PLoS One.* 2012;7(8):e44240. doi: 10.1371/journal.pone.0044240. Epub 2012 Aug 29. PMID: 22952937; PMCID: PMC3430640.

21. He X, Maranga IO, Oliver AW, Gichangi P, Hampson L, Hampson IN. Analysis of the Prevalence of HTLV-1 Proviral DNA in Cervical Smears and Carcinomas from HIV Positive and Negative Kenyan Women. *Viruses.* 2016 Sep 5;8(9):245. doi: 10.3390/v8090245. PMID: 27608036; PMCID: PMC5035959.

22. Firmino AA, Martins ALL, Gois LL, Paixão TS, Batista EDS, Galvão-Castro B, Grassi MFR. Evaluation of the cervicovaginal environment in asymptomatic Human T-cell lymphotropic virus type 1 infected women. *Braz J Infect Dis.* 2019 Jan-Feb;23(1):27-33. doi: 10.1016/j.bjid.2019.02.001. Epub 2019 Mar 6. PMID: 30849331; PMCID: PMC9428004.

23. Martins ALL, de Aquino Firmino A, Boa-Sorte N, Araújo JPL, Paixão TS, Viriato ARF, Galvão-Castro B, Grassi MFR. Vaginal dryness in women infected by human T-

lymphotropic virus type 1: an exploratory study. *Sex Med.* 2023 Apr 17;11(2):qfad002. doi: 10.1093/sexmed/qfad002. PMID: 37082722; PMCID: PMC10110760.

24. de Aquino Firmino A, Filho PRTG, Martins ALL, Araújo TH, Gois LL, da Silva Batista E, Araújo JPL, Galvão-Castro B, Grassi MFR. HTLV-1 Proviral Load in Vaginal Fluid Correlates with Levels in Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Pathogens.* 2023 May 5;12(5):682. doi: 10.3390/pathogens12050682. PMID: 37242352; PMCID: PMC10223732.

25. Galvão-Castro B, Grassi MFR, Galvão-Castro AV, Nunes A, Galvão-Barroso AK, Araújo THA, Rathsam-Pinheiro RH, Nunes CLX, Ribeiro A, Lírio M, Gonçalves NL, Rangel SL, Dias CMCC, Ozores DP, Dubois-Mendes SM, Lima I, Silva ALP, de Jesus WLA, Santos FLN, de Oliveira JGR, de Moraes YVP, de Jesus AO, Daltro F, Boa-Sorte N, Castro-Lima H, Soliani MLC. Integrative and Multidisciplinary Care for People Living With Human T-Cell Lymphotropic Virus in Bahia, Brazil: 20 Years of Experience. *Front Med (Lausanne).* 2022 Jun 7;9:884127. doi: 10.3389/fmed.2022.884127. PMID: 35746949; PMCID: PMC9210980.

26. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA.* 2013 Nov 27;310(20):2191-4. doi: 10.1001/jama.2013.281053. PMID: 24141714.

27. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, Raab S, Sherman M, Wilbur D, Wright T Jr, Young N; Forum Group Members; Bethesda 2001 Workshop. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA.* 2002 Apr 24;287(16):2114-9. doi: 10.1001/jama.287.16.2114. PMID: 11966386.

28. Joshi N, Fass J. Sickle: a sliding-window, adaptive, quality-based trimming tool for FastQ files (Version 1.33) [Software] (2011). Available at: <https://github.com/najoshi/sickle>.

29. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2009 Jul 15;25(14):1754-60. doi: 10.1093/bioinformatics/btp324. Epub 2009 May 18. PMID: 19451168; PMCID: PMC2705234.

30. Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, Madden TL. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*. 2009 Dec 15;10:421. doi: 10.1186/1471-2105-10-421. PMID: 20003500; PMCID: PMC2803857.
31. Chan PK, Lam CW, Cheung TH, Li WW, Lo KW, Chan MY, Cheung JL, Cheng AF. Association of human papillomavirus type 58 variant with the risk of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2002 Aug 21;94(16):1249-53. doi: 10.1093/jnci/94.16.1249. PMID: 12189229.
32. Godínez JM, Heideman DA, Gheit T, Alemany L, Snijders PJ, Tommasino M, Meijer CJ, de Sanjosé S, Bosch FX, Bravo IG. Differential presence of Papillomavirus variants in cervical cancer: an analysis for HPV33, HPV45 and HPV58. *Infect Genet Evol*. 2013 Jan;13:96-104. doi: 10.1016/j.meegid.2012.09.011. Epub 2012 Sep 26. PMID: 23022714.
33. Levi JE, Kleter B, Quint WG, Fink MC, Canto CL, Matsubara R, Linhares I, Segurado A, Vanderborght B, Neto JE, Van Doorn LJ. High prevalence of human papillomavirus (HPV) infections and high frequency of multiple HPV genotypes in human immunodeficiency virus-infected women in Brazil. *J Clin Microbiol*. 2002 Sep;40(9):3341-5. doi: 10.1128/JCM.40.9.3341-3345.2002. PMID: 12202576; PMCID: PMC130803.
34. Levi JE, Fernandes S, Tateno AF, Motta E, Lima LP, Eluf-Neto J, Pannuti CS. Presence of multiple human papillomavirus types in cervical samples from HIV-infected women. *Gynecol Oncol*. 2004 Jan;92(1):225-31. doi: 10.1016/j.ygyno.2003.10.004. PMID: 14751163.
35. Ameer A, Meiring TL, Bunikis I, Häggqvist S, Lindau C, Lindberg JH, Gustavsson I, Mbulawa ZZ, Williamson AL, Gyllenstein U. Comprehensive profiling of the vaginal microbiome in HIV positive women using massive parallel semiconductor sequencing. *Sci Rep*. 2014 Mar 18;4:4398. doi: 10.1038/srep04398. PMID: 24637939; PMCID: PMC3957130.
36. Drolet M, Bénard É, Boily MC, Ali H, Baandrup L, Bauer H, Beddows S, Brisson J, Brotherton JM, Cummings T, Donovan B, Fairley CK, Flagg EW, Johnson AM, Kahn JA, Kavanagh K, Kjaer SK, Kliewer EV, Lemieux-Mellouki P, Markowitz L, Mboup A, Mesher D, Niccolai L, Oliphant J, Pollock KG, Soldan K, Sonnenberg P, Tabrizi SN, Tanton C, Brisson M. Population-level impact and herd effects following human papillomavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2015

May;15(5):565-80. doi: 10.1016/S1473-3099(14)71073-4. Epub 2015 Mar 3. PMID: 25744474; PMCID: PMC5144106.

37. de Sanjosé S, Serrano B, Tous S, Alejo M, Lloveras B, Quirós B, Clavero O, Vidal A, Ferrándiz-Pulido C, Pavón MÁ, Holzinger D, Halec G, Tommasino M, Quint W, Pawlita M, Muñoz N, Bosch FX, Alemany L; RIS HPV TT, VVAP and Head and Neck study groups. Burden of Human Papillomavirus (HPV)-Related Cancers Attributable to HPVs 6/11/16/18/31/33/45/52 and 58. *JNCI Cancer Spectr.* 2019 Jan 7;2(4):pky045. doi: 10.1093/jncics/pky045. PMID: 31360870; PMCID: PMC6649711.

38. Lax S. Histopathology of cervical precursor lesions and cancer. *Acta Dermatovenereol Alp Pannonica Adriat.* 2011 Sep;20(3):125-33. PMID: 22131112.

39. Naucler P, Ryd W, Törnberg S, Strand A, Wadell G, Elfgren K, Rådborg T, Strander B, Johansson B, Forslund O, Hansson BG, Rylander E, Dillner J. Human papillomavirus and Papanicolaou tests to screen for cervical cancer. *N Engl J Med.* 2007 Oct 18;357(16):1589-97. doi: 10.1056/NEJMoa073204. Erratum in: *N Engl J Med.* 2008 Oct 9;359(15):1637. Johansson, Bo [added]. PMID: 17942872.

40. Ronco G, Dillner J, Elfström KM, Tunesi S, Snijders PJ, Arbyn M, Kitchener H, Segnan N, Gilham C, Giorgi-Rossi P, Berkhof J, Peto J, Meijer CJ; International HPV screening working group. Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomised controlled trials. *Lancet.* 2014 Feb 8;383(9916):524-32. doi: 10.1016/S0140-6736(13)62218-7. Epub 2013 Nov 3. Erratum in: *Lancet.* 2015 Oct 10;386(10002):1446. PMID: 24192252.

41. Ramírez AT, Valls J, Baena A, Rojas FD, Ramírez K, Álvarez R, Cristaldo C, Henríquez O, Moreno A, Reynaga DC, Palma HG, Robinson I, Hernández DC, Bardales R, Cardinal L, Salgado Y, Martínez S, González E, Guillén D, Fleider L, Tatti S, Villagra V, Venegas G, Cruz-Valdez A, Valencia M, Rodríguez G, Terán C, Picconi MA, Ferrera A, Kasamatsu E, Mendoza L, Calderon A, Luciani S, Broutet N, Darragh T, Almonte M, Herrero R; ESTAMPA Study Group. Performance of cervical cytology and HPV testing for primary cervical cancer screening in Latin America: an analysis within the ESTAMPA study. *Lancet Reg Health Am.* 2023 Sep 20;26:100593. doi: 10.1016/j.lana.2023.100593. PMID: 37766799; PMCID: PMC10520426.

42. Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev.* 2003 Jan;16(1):1-17. doi: 10.1128/CMR.16.1.1-17.2003. PMID: 12525422; PMCID: PMC145302.
43. Andersson S, Rylander E, Larsson B, Strand A, Silfversvård C, Wilander E. The role of human papillomavirus in cervical adenocarcinoma carcinogenesis. *Eur J Cancer.* 2001 Jan;37(2):246-50. doi: 10.1016/s0959-8049(00)00376-2. PMID: 11166153.
44. Miyazaki K, Yamaguchi K, Tohya T, Ohba T, Takatsuki K, Okamura H. Human T-cell leukemia virus type I infection as an oncogenic and prognostic risk factor in cervical and vaginal carcinoma. *Obstet Gynecol.* 1991 Jan;77(1):107-10. PMID: 1984208.
45. Strickler HD, Rattray C, Escoffery C, Manns A, Schiffman MH, Brown C, Cranston B, Hanchard B, Palefsky JM, Blattner WA. Human T-cell lymphotropic virus type I and severe neoplasia of the cervix in Jamaica. *Int J Cancer.* 1995 Mar 29;61(1):23-6. doi: 10.1002/ijc.2910610105. PMID: 7705929.
46. Castle PE, Escoffery C, Schachter J, Rattray C, Schiffman M, Moncada J, Sugai K, Brown C, Cranston B, Hanchard B, Palefsky JM, Burk RD, Hutchinson ML, Strickler HD. Chlamydia trachomatis, herpes simplex virus 2, and human T-cell lymphotropic virus type 1 are not associated with grade of cervical neoplasia in Jamaican colposcopy patients. *Sex Transm Dis.* 2003 Jul;30(7):575-80. doi: 10.1097/00007435-200307000-00009. PMID: 12838087.
47. Góngora-Biachi RA, González-Martínez P, Castro-Sansores C, Bastarrachea-Ortiz J. Infección por virus linfotrópico de células T humanas tipo I/II en pacientes con cáncer cervicouterino de la península de Yucatán, México [Infection with HTLV virus type I-II in patients with cervico-uterine cancer in the Yucatan peninsula, Mexico]. *Ginecol Obstet Mex.* 1997 Apr;65:141-4. Spanish. PMID: 9280739.

5 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo trazem informações clínico-laboratoriais referentes à presença do HTLV-1 no ambiente cérvico-vaginal e suas implicações, além de caracterizar a infecção por HPV e os tipos encontrados neste compartimento.

Inicialmente, demonstramos que o HTLV-1 pode ser detectado no fluido vaginal e que existe uma correlação direta entre a CPV do HTLV-1 no fluido vaginal e nas PBMCs. É interessante notar que foi encontrada uma diferença de 50 vezes nos níveis de CPV no fluido vaginal em comparação com o sangue periférico. Além disso, a CPV no fluido vaginal era indetectável em um terço das mulheres avaliadas, quase todas (n=19/20) assintomáticas. Este foi o primeiro estudo que teve como objetivo quantificar e correlacionar a CPV do HTLV-1 no fluido vaginal e nas PBMCs. A detecção do DNA do HTLV-1 em amostras de secreção cérvico-vaginal também foi relatada no Peru e no Gabão, neste último, os autores observaram uma produção local de anticorpos anti-HTLV-1, sugerindo uma resposta imune na mucosa vaginal ^(169,170). Demonstramos em um trabalho anterior que as mulheres infectadas pelo HTLV-1 também apresentaram uma resposta imune ativada na mucosa vaginal refletida por um aumento nos níveis de citocinas, porém, não se correlacionaram com a CPV do HTLV-1 no fluido vaginal ou nas PBMCs em pacientes assintomáticas ⁽³⁹⁾. Na presente tese, observamos que a CPV do HTLV-1 era muito menos detectável no fluido vaginal de mulheres assintomáticas, o que se correlacionou com a CPV mais baixa nas PBMCs dessas pacientes. Isso pode ocorrer devido à presença de células infectadas pelo HTLV-1 no fluido vaginal que participam do processo natural de transudação vaginal, mecanismo que permite a lubrificação por meio de reações de vasodilatação-transudação ^(171,172). Uma outra possibilidade é a ativação localizada da resposta imune no ambiente vaginal, com recrutamento celular ^(39,170).

A presença do HTLV-1 no fluido vaginal de mulheres infectadas pode ter implicações na transmissão sexual do vírus, que apesar de ocorrer com mais frequência de homem para mulher, também pode ocorrer de forma contrária ^(14,15). A frequência de linfócitos T CD4+, as principais células visadas pelo HTLV-1, é maior no sêmen do que no fluido vaginal de indivíduos saudáveis ⁽⁷⁾. Entretanto, embora nenhum estudo tenha tentado quantificar a CPV do HTLV-1 no sêmen de indivíduos infectados, especula-se que a CPV mais alta no sêmen possa explicar a suposta maior eficácia da transmissão sexual de homem para mulher ^(12,14,15). Um relatório sobre casais sorodiscordantes sugeriu um risco maior de transmissão sexual do HTLV-1 para um parceiro soronegativo quando o parceiro infectado apresentava maior CPV em PBMCs em comparação com casais nos quais a transmissão não ocorreu ⁽¹⁵⁾. A presença do

HTLV-1 no fluido vaginal também pode ser relevante para a transmissão vertical, o que é especialmente importante considerando que não há consenso sobre a via de parto preferida (vaginal ou cesariana) em mulheres infectadas pelo HTLV-1. Embora menos comum, a transmissão de mãe para filho ocorre em até 5% das mulheres que não amamentaram seus filhos (173-175). Portanto, mulheres com CPV detectável e com concentrações elevadas no fluido vaginal podem ter maior probabilidade de transmitir o vírus aos recém-nascidos durante a gravidez ou o parto.

Como já evidenciamos, a presença do HTLV-1 no fluido cérvico-vaginal desencadeia uma resposta imunológica local, além de uma lubrificação diminuída em algumas mulheres infectadas. Estes resultados sugerem que um ambiente vaginal mais inflamado pode estar menos protegido e aumentar a suscetibilidade das mulheres infectadas pelo HTLV-1 a outras ISTs, como o HPV (39,40). Ademais, tanto o HTLV-1 como o HPV têm como principal forma de transmissão horizontal a via sexual (6,133). De fato, no segundo manuscrito desta tese, demonstramos que a proporção de HPV no fluido cérvico-vaginal de mulheres infectadas pelo HTLV-1 é cerca de duas vezes maior (19% versus 10,5%) do que a de mulheres HTLV-1 negativas. Apesar disso, como não houve diferença estatística, não podemos inferir que há uma maior suscetibilidade cérvico-vaginal das mulheres que vivem com HTLV-1 ao HPV. Outros estudos encontraram resultados semelhantes ao concluírem que mulheres com HTLV-1 tinham duas vezes mais probabilidade de ter infecção por HPV de qualquer tipo do que as mulheres não infectadas por HTLV-1 (36,37).

Também identificamos que 61,9% das mulheres infectadas pelo HTLV-1 apresentaram um ou mais tipos de HPV de provável ou efetivo alto risco oncogênico em suas análises. Nas mulheres não infectadas, essa proporção foi de 44,44%. O HPV58, um tipo viral de alto risco, foi encontrado em 38,1% das mulheres infectadas pelo HTLV-1, enquanto sua frequência no grupo não infectado pelo HTLV-1 foi de apenas 5,56%. Este tipo de HPV está associado a lesões persistentes e de alto grau e a uma alta prevalência de câncer cervical. Em Hong Kong, um estudo constatou que um terço das pacientes com câncer cervical eram positivas para o HPV58 (176,177). Na literatura há poucos trabalhos que realizaram uma análise mais detalhada dos tipos de HPV encontrados na coinfeção HTLV-1/HPV (36-38). Um desses estudos relatou que a infecção por HTLV-1 estava associada à infecção por HPV de alto risco. Os tipos de HPV de alto risco mais comuns foram o HPV16 (10,8%), seguido pelo HPV31 (5,9%) e o HPV18 (4,9%) (37). Em outro estudo não foi encontrada associação entre a infecção por HTLV-1 e HPV de alto risco, apenas o HPV53 (provável alto risco) foi associado ao HTLV-1 (38). Um achado interessante em nosso trabalho, encontrado tanto em mulheres positivas para HTLV-1, como

nas negativas, foi a presença de infecção cérvico-vaginal com vários tipos de HPV, observada em quatro pacientes, duas em cada grupo. A multifecção com vários tipos de HPV é relatada comumente em pessoas que vivem com HIV, entretanto, a soropositividade para o HIV foi um critério de exclusão em nosso estudo, portanto, essa possibilidade foi descartada ⁽¹⁷⁸⁻¹⁸⁰⁾.

Como limitações deste trabalho, apontamos que o número de mulheres que participaram do estudo foi pequeno e isso pode ter afetado o escopo da investigação tanto para a avaliação de CPV, quanto para a determinação da frequência da infecção pelo HPV. Além disso, a patogênese da coinfecção HTLV-1/HPV poderia ser melhor estabelecida pela quantificação da CPV no fluido vaginal deste grupo específico de mulheres avaliadas, mas não foi possível realizar essas análises. Entretanto, temos o objetivo de concretizar essas quantificações em breve.

Em resumo, o ambiente cérvico-vaginal de mulheres infectadas por HTLV-1, principalmente as portadoras de HAM/TSP, apresenta um possível pior prognóstico quando comparadas às mulheres assintomáticas ou não infectadas. Mais estudos com mulheres que vivem com HTLV-1 devem ser realizados para investigar os mecanismos que envolvem a carga proviral vaginal e a persistência de infecções por HPV de alto risco, bem como a incidência de câncer cervical. Estes dados podem ter implicações para políticas públicas de saúde, tais como a via de parto preferencial e se a vacinação contra o HPV deve ser priorizada em mulheres infectadas pelo HTLV-1.

6 CONCLUSÃO

A carga proviral está presente no fluido vaginal de mulheres infectadas pelo HTLV-1 de modo proporcional à carga proviral do sangue periférico. Em nosso estudo, não observamos maior suscetibilidade cérvico-vaginal à infecção pelo HPV, no entanto, o HPV58, tipo de alto risco, foi mais frequente nas mulheres com HTLV-1. Mais estudos são necessários para esclarecer se a presença do HTLV-1 influencia a progressão da infecção pelo HPV e o desenvolvimento do câncer cervical e se a vacinação é benéfica para mulheres que vivem com HTLV-1.

REFERÊNCIAS

1. Gessain A, Cassar O. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. *Front Microbiol.* 2012 Nov 15;3:388. doi: 10.3389/fmicb.2012.00388. PMID: 23162541; PMCID: PMC3498738.
2. Pereira FM, de Almeida MDCC, Santos FLN, Carreiro RP, Regis-Silva CG, Galvão-Castro B, Grassi MFR. Evidence of New Endemic Clusters of Human T-Cell Leukemia Virus (HTLV) Infection in Bahia, Brazil. *Front Microbiol.* 2019 May 14;10:1002. doi: 10.3389/fmicb.2019.01002. PMID: 31156570; PMCID: PMC6528468.
3. Dourado I, Alcantara LC, Barreto ML, da Gloria Teixeira M, Galvão-Castro B. HTLV-I in the general population of Salvador, Brazil: a city with African ethnic and sociodemographic characteristics. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2003 Dec 15;34(5):527-31. doi: 10.1097/00126334-200312150-00013. PMID: 14657765.
4. Paiva A, Casseb J. Sexual transmission of human T-cell lymphotropic virus type 1. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2014 May-Jun;47(3):265-74. doi: 10.1590/0037-8682-0232-2013. PMID: 25075475.
5. Bittencourt AL. Vertical transmission of HTLV-I/II: a review. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1998 Jul-Aug;40(4):245-51. doi: 10.1590/s0036-46651998000400008. PMID: 9876439.
6. Nunes D, Boa-Sorte N, Grassi MF, Taylor GP, Teixeira MG, Barreto ML, Dourado I, Galvão-Castro B. HTLV-1 is predominantly sexually transmitted in Salvador, the city with the highest HTLV-1 prevalence in Brazil. *PLoS One.* 2017 Feb 3;12(2):e0171303. doi: 10.1371/journal.pone.0171303. PMID: 28158226; PMCID: PMC5291389.
7. Pique C, Jones KS. Pathways of cell-cell transmission of HTLV-1. *Front Microbiol.* 2012 Oct 24;3:378. doi: 10.3389/fmicb.2012.00378. PMID: 23109932; PMCID: PMC3479854.
8. Nagai M, Usuku K, Matsumoto W, Kodama D, Takenouchi N, Moritoyo T, 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 Dec;4(6):586-93. doi: 10.3109/13550289809114225. PMID: 10065900.
9. Matsuzaki T, Nakagawa M, Nagai M, Usuku K, Higuchi I, Arimura K, Kubota H, Izumo S, Akiba S, Osame M. HTLV-I proviral load correlates with progression of motor disability in HAM/TSP: analysis of 239 HAM/TSP patients including 64 patients followed up for 10 years. *J Neurovirol.* 2001 Jun;7(3):228-34. doi: 10.1080/13550280152403272. PMID: 11517397.
10. Hashimoto K, Higuchi I, Osame M, Izumo S. Quantitative in situ PCR assay of HTLV-1 infected cells in peripheral blood lymphocytes of patients with ATL, HAM/TSP and asymptomatic carriers. *J Neurol Sci.* 1998 Jul 15;159(1):67-72. doi: 10.1016/s0022-510x(98)00138-5. PMID: 9700706.

11. Grassi MF, Olavarria VN, Kruschewsky Rde A, Mascarenhas RE, Dourado I, Correia LC, de 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. *J Med Virol.* 2011 Jul;83(7):1269-74. doi: 10.1002/jmv.22087. PMID: 21567429.
12. Nakano S, Ando Y, Ichijo M, Moriyama I, Saito S, Sugamura K, Hinuma Y. Search for possible routes of vertical and horizontal transmission of adult T-cell leukemia virus. *Gan.* 1984 Dec;75(12):1044-5. PMID: 6098502.
13. Pereira CCC, La-Roque DG de L, Albuquerque R dos S, Silva IC, Covre L de SC, Nobre AFS, Reis M de NL dos, Assis IM de, Souza JD de, Moraes SS de, Santos PFSL, Silva LBL da, Almeida D de S, Sousa MS de. Human T-lymphotropic virus (HTLV) research in cervical-vaginal discharge samples from women, in Belém, Pará, Brazil. *RSD.* 2021Apr.1
14. Kajiyama W, Kashiwagi S, Ikematsu H, Hayashi J, Nomura H, Okochi K. Intrafamilial transmission of adult T cell leukemia virus. *J Infect Dis.* 1986 Nov;154(5):851-7. doi: 10.1093/infdis/154.5.851. PMID: 2877031.
15. Roucoux DF, Wang B, Smith D, Nass CC, Smith J, Hutching ST, Newman B, Lee TH, Chafets DM, Murphy EL; HTLV Outcomes Study Investigators. A prospective study of sexual transmission of human T lymphotropic virus (HTLV)-I and HTLV-II. *J Infect Dis.* 2005 May 1;191(9):1490-7. doi: 10.1086/429410. Epub 2005 Mar 31. PMID: 15809908.
16. Murphy EL. The clinical epidemiology of human T-lymphotropic virus type II (HTLV-II). *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1996;13 Suppl 1:S215-9. doi: 10.1097/00042560-199600001-00032. PMID: 8797726.
17. Manns A, Hisada M, La Grenade L. Human T-lymphotropic virus type I infection. *Lancet.* 1999 Jun 5;353(9168):1951-8. doi: 10.1016/s0140-6736(98)09460-4. PMID: 10371587.
18. Yasunaga Ji, Sakai T, Nosaka K, Etoh Ki, Tamiya S, Koga S, Mita S, Uchino M, Mitsuya H, Matsuoka M. Impaired production of naive T lymphocytes in human T-cell leukemia virus type I-infected individuals: its implications in the immunodeficient state. *Blood.* 2001 May 15;97(10):3177-83. doi: 10.1182/blood.v97.10.3177. PMID: 11342446.
19. al-Saleh W, Giannini SL, Jacobs N, Moutschen M, Doyen J, Boniver J, Delvenne P. Correlation of T-helper secretory differentiation and types of antigen-presenting cells in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix. *J Pathol.* 1998 Mar;184(3):283-90. doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(199803)184:3<283::AID-PATH25>3.0.CO;2-K. PMID: 9614381.
20. Abdel-Hady ES, Martin-Hirsch P, Duggan-Keen M, Stern PL, Moore JV, Corbitt G, Kitchener HC, Hampson IN. Immunological and viral factors associated with the response of vulval intraepithelial neoplasia to photodynamic therapy. *Cancer Res.* 2001 Jan 1;61(1):192-6. PMID: 11196160.
21. Carrero YN, Callejas DE, Mosquera JA. In situ immunopathological events in human cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer: Review. *Transl Oncol.* 2021 May;14(5):101058.

- doi: 10.1016/j.tranon.2021.101058. Epub 2021 Mar 4. PMID: 33677234; PMCID: PMC7937982.
22. Spalton DJ, Nicholson F. HTLV-I infection in human disease. *Br J Ophthalmol.* 1991 Mar;75(3):174-5. doi: 10.1136/bjo.75.3.174. PMID: 2012786; PMCID: PMC1042300.
 23. Castellsagué X, Bosch FX, Muñoz N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res.* 2002 Nov;89(2):191-9. doi: 10.1016/s0168-1702(02)00188-0. PMID: 12445659.
 24. Scott-Wittenborn N, Fakhry C. Epidemiology of HPV Related Malignancies. *Semin Radiat Oncol.* 2021 Oct;31(4):286-296. doi: 10.1016/j.semradonc.2021.04.001. PMID: 34455984; PMCID: PMC9057013.
 25. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999 Sep;189(1):12-9. doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(199909)189:1<12::AID-PATH431>3.0.CO;2-F. PMID: 10451482.
 26. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021 May;71(3):209-249. doi: 10.3322/caac.21660. Epub 2021 Feb 4. PMID: 33538338.
 27. Santos M de O, Lima FC da S de, Martins LFL, Oliveira JFP, Almeida LM de, Cancela M de C. Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. *Rev. Bras. Cancerol.* [Internet]. 6º de fevereiro de 2023 [citado 15º de outubro de 2023];69(1):e-213700. Disponível em: <https://rbc.inca.gov.br/index.php/revista/article/view/3700>.
 28. Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol.* 2005 Mar;32 Suppl 1:S16-24. doi: 10.1016/j.jcv.2004.12.008. PMID: 15753008.
 29. Chesson HW, Dunne EF, Hariri S, Markowitz LE. The estimated lifetime probability of acquiring human papillomavirus in the United States. *Sex Transm Dis.* 2014 Nov;41(11):660-4. doi: 10.1097/OLQ.0000000000000193. PMID: 25299412; PMCID: PMC6745688.
 30. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology.* 2010 May 25;401(1):70-9. doi: 10.1016/j.virol.2010.02.002. Epub 2010 Mar 5. PMID: 20206957; PMCID: PMC3400342.
 31. Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, Stanley MA. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine.* 2012 Nov 20;30 Suppl 5:F55-70. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.06.083. PMID: 23199966.
 32. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003 Feb 6;348(6):518-27. doi: 10.1056/NEJMoa021641. PMID: 12571259.

33. Wheeler CM, Hunt WC, Joste NE, Key CR, Quint WG, Castle PE. Human papillomavirus genotype distributions: implications for vaccination and cancer screening in the United States. *J Natl Cancer Inst.* 2009 Apr 1;101(7):475-87. doi: 10.1093/jnci/djn510. Epub 2009 Mar 24. PMID: 19318628; PMCID: PMC2664090.
34. Gissmann L, Wolnik L, Ikenberg H, Koldovsky U, Schnürch HG, zur Hausen H. Human papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983 Jan;80(2):560-3. doi: 10.1073/pnas.80.2.560. PMID: 6300854; PMCID: PMC393419.
35. Heinzl PA, Chan SY, Ho L, O'Connor M, Balaram P, Campo MS, Fujinaga K, Kiviat N, Kuypers J, Pfister H, et al. Variation of human papillomavirus type 6 (HPV-6) and HPV-11 genomes sampled throughout the world. *J Clin Microbiol.* 1995 Jul;33(7):1746-54. doi: 10.1128/jcm.33.7.1746-1754.1995. PMID: 7665641; PMCID: PMC228262.
36. Lôpo SS, Oliveira PM, Santana IU, Pena GB, Torrales MB, Mascarenhas RE, Galvão-Castro B, Grassi MF. Evidence of a higher prevalence of HPV infection in HTLV-1-infected women: a cross-sectional study. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2012 Jun;45(3):305-8. doi: 10.1590/s0037-86822012000300005. PMID: 22760126.
37. Blas MM, Alva IE, Garcia PJ, Carcamo C, Montano SM, Muñante R, Zunt JR. Association between human papillomavirus and human T-lymphotropic virus in indigenous women from the Peruvian Amazon. *PLoS One.* 2012;7(8):e44240. doi: 10.1371/journal.pone.0044240. Epub 2012 Aug 29. PMID: 22952937; PMCID: PMC3430640.
38. He X, Maranga IO, Oliver AW, Gichangi P, Hampson L, Hampson IN. Analysis of the Prevalence of HTLV-1 Proviral DNA in Cervical Smears and Carcinomas from HIV Positive and Negative Kenyan Women. *Viruses.* 2016 Sep 5;8(9):245. doi: 10.3390/v8090245. PMID: 27608036; PMCID: PMC5035959.
39. Firmino AA, Martins ALL, Gois LL, Paixão TS, Batista EDS, Galvão-Castro B, Grassi MFR. Evaluation of the cervicovaginal environment in asymptomatic Human T-cell lymphotropic virus type 1 infected women. *Braz J Infect Dis.* 2019 Jan-Feb;23(1):27-33. doi: 10.1016/j.bjid.2019.02.001. Epub 2019 Mar 6. PMID: 30849331; PMCID: PMC9428004.
40. Martins ALL, de Aquino Firmino A, Boa-Sorte N, Araújo JPL, Paixão TS, Viriato ARF, Galvão-Castro B, Grassi MFR. Vaginal dryness in women infected by human T-lymphotropic virus type 1: an exploratory study. *Sex Med.* 2023 Apr 17;11(2):qfad002. doi: 10.1093/sexmed/qfad002. PMID: 37082722; PMCID: PMC10110760.
41. 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 U S A.* 1980 Dec;77(12):7415-9. doi: 10.1073/pnas.77.12.7415. PMID: 6261256; PMCID: PMC350514.
42. 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.* 1982 Nov 5;218(4572):571-3. doi: 10.1126/science.6981847. PMID: 6981847.

43. Wolfe ND, Heneine W, Carr JK, Garcia AD, Shanmugam V, Tamoufe U, Torimiro JN, Prosser AT, Lebreton M, Mpoudi-Ngole E, McCutchan FE, Birx DL, Folks TM, Burke DS, Switzer WM. Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 May 31;102(22):7994-9. doi: 10.1073/pnas.0501734102. Epub 2005 May 23. PMID: 15911757; PMCID: PMC1142377.
44. Duong YT, Jia H, Lust JA, Garcia AD, Tiffany AJ, Heneine W, Switzer WM. Short communication: Absence of evidence of HTLV-3 and HTLV-4 in patients with large granular lymphocyte (LGL) leukemia. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2008 Dec;24(12):1503-5. doi: 10.1089/aid.2008.0128. PMID: 19102684.
45. Perzova R, Benz P, Abbott L, Welch C, Thomas A, El Ghouli R, Sanghi S, Nara P, Glaser J, Siegal FP, Dosik H, Poiesz BJ. Short communication: no evidence of HTLV-3 and HTLV-4 infection in New York State subjects at risk for retroviral infection. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2010 Nov;26(11):1229-31. doi: 10.1089/aid.2010.0079. Epub 2010 Oct 7. PMID: 20929392.
46. Matsuoka M, Jeang KT. Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. *Nat Rev Cancer*. 2007 Apr;7(4):270-80. doi: 10.1038/nrc2111. PMID: 17384582.
47. Vandamme AM, Salemi M, Desmyter J. The simian origins of the pathogenic human T-cell lymphotropic virus type I. *Trends Microbiol*. 1998 Dec;6(12):477-83. doi: 10.1016/s0966-842x(98)01406-1. PMID: 10036726.
48. Courgnaud V, Van Dooren S, Liegeois F, Pourrut X, Abela B, Loul S, Mpoudi-Ngole E, Vandamme A, Delaporte E, Peeters M. Simian T-cell leukemia virus (STLV) infection in wild primate populations in Cameroon: evidence for dual STLV type 1 and type 3 infection in agile mangabeys (*Cercocebus agilis*). *J Virol*. 2004 May;78(9):4700-9. doi: 10.1128/jvi.78.9.4700-4709.2004. PMID: 15078952; PMCID: PMC387697.
49. Green, P. L., and I. S. Y. Chen. 2001. Human T-cell leukemia virus types 1 and 2, p. 1941-1969. In D. M. Knipe, P. M. Howley, D. Griffin, R. Lamb, M. Martin, and S. Straus (ed.), *Fields virology*, 4th ed. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.
50. Hoshino H. Cellular Factors Involved in HTLV-1 Entry and Pathogenicity. *Front Microbiol*. 2012 Jun 21;3:222. doi: 10.3389/fmicb.2012.00222. PMID: 22737146; PMCID: PMC3380293.
51. Gessain A, Mahieux R. Tropical spastic paraparesis and HTLV-1 associated myelopathy: clinical, epidemiological, virological and therapeutic aspects. *Rev Neurol (Paris)*. 2012 Mar;168(3):257-69. doi: 10.1016/j.neurol.2011.12.006. Epub 2012 Mar 7. PMID: 22405461.
52. Barreto FK, Araújo THA, Rego FFA, Alcantara LC (2017) A Fully Annotated Genome Sequence of Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1). *J Bioinf Com Sys Bio* 1(1): 105.

53. Sampaio GCL, Ribeiro JR, de Almeida CN, Boa-Sorte N, Galvão-Castro B, Grassi MFR, Nunes Sá K, Dias CMCC. Human T Cell Lymphotropic Virus Type 1 Global Prevalence Associated with the Human Development Index: Systematic Review with Meta-Analysis. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2023 Apr;39(4):145-165. doi: 10.1089/AID.2021.0230. Epub 2023 Feb 15. PMID: 36571250.
54. Kitagawa T, Fujishita M, Taguchi H, Miyoshi I, Tadokoro H. Antibodies to HTLV-I in Japanese immigrants in Brazil. *JAMA*. 1986 Nov 7;256(17):2342. PMID: 2877100.
55. Carneiro-Proietti AB, Ribas JG, Catalan-Soares BC, Martins ML, Brito-Melo GE, Martins-Filho OA, Pinheiro SR, Araújo Ade Q, Galvão-Castro B, de Oliveira MS, Guedes AC, Proietti FA. Infecção e doença pelos vírus linfotrópicos humanos de células T (HTLV-I/II) no Brasil [Infection and disease caused by the human T cell lymphotropic viruses type I and II in Brazil]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2002 Sep-Oct;35(5):499-508. Portuguese. doi: 10.1590/s0037-86822002000500013. PMID: 12621671.
56. Silva, T C de S, Lopo, L H C S, Brito, L T P, dos Santos, L F, Sacramento, I O, Gomes, L L F, Leite de Faria, J M, & da Silva Batista, E (2022). PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DOS CASOS NOTIFICADOS DE HTLV NA BAHIA NO PERÍODO DE 2010 A 2019. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 26, 101961. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2021.101961>.
57. Galvão-Castro B, Loures L, Rodriques LG, Sereno A, Ferreira Júnior OC, Franco LG, Muller M, Sampaio DA, Santana A, Passos LM, Proietti F. Distribution of human T-lymphotropic virus type I among blood donors: a nationwide Brazilian study. *Transfusion*. 1997 Feb;37(2):242-3. doi: 10.1046/j.1537-2995.1997.37297203532.x. PMID: 9051104.
58. Catalan-Soares B, Carneiro-Proietti AB, Proietti FA; Interdisciplinary HTLV Research Group. 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 Saude Publica*. 2005 May-Jun;21(3):926-31. doi: 10.1590/s0102-311x2005000300027. Epub 2005 May 2. PMID: 15868051.
59. Rego FF, Alcantara LC, Moura Neto JP, Miranda AC, Pereira Ode S, Gonçalves Mde S, Galvão-Castro B. HTLV type 1 molecular study in Brazilian villages with African characteristics giving support to the post-Columbian introduction hypothesis. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2008 May;24(5):673-7. doi: 10.1089/aid.2007.0290. PMID: 18462080.
60. dos Santos JI, Lopes MA, Deliége-Vasconcelos E, Couto-Fernandez JC, Patel BN, Barreto ML, Ferreira Júnior OC, Galvão-Castro B. Seroprevalence of HIV, HTLV-I/II and other perinatally-transmitted pathogens in Salvador, Bahia. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1995 Jul-Aug;37(4):343-8. doi: 10.1590/s0036-46651995000400010. PMID: 8599064.
61. Bittencourt AL, Dourado I, Filho PB, Santos M, Valadão E, Alcantara LC, Galvão-Castro B. Human T-cell lymphotropic virus type 1 infection among pregnant women in northeastern Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2001 Apr 15;26(5):490-4. doi: 10.1097/00126334-200104150-00016. PMID: 11391171.

62. Mello MA, da Conceição AF, Sousa SM, Alcântara LC, Marin LJ, Regina da Silva Raiol M, Boa-Sorte N, Santos LP, de Almeida Mda C, Galvão TC, Bastos RG, Lázaro N, Galvão-Castro B, Gadelha SR. HTLV-1 in pregnant women from the Southern Bahia, Brazil: a neglected condition despite the high prevalence. *Virol J.* 2014 Feb 13;11:28. doi: 10.1186/1743-422X-11-28. PMID: 24524416; PMCID: PMC3974122.
63. Murphy EL, Figueroa JP, Gibbs WN, Brathwaite A, Holding-Cobham M, Waters D, Cranston B, Hanchard B, Blattner WA. Sexual transmission of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I). *Ann Intern Med.* 1989 Oct 1;111(7):555-60. doi: 10.7326/0003-4819-111-7-555. PMID: 2789009.
64. Stuver SO, Tachibana N, Okayama A, Shioiri S, Tsunetoshi Y, Tsuda K, Mueller NE. Heterosexual transmission of human T cell leukemia/lymphoma virus type I among married couples in southwestern Japan: an initial report from the Miyazaki Cohort Study. *J Infect Dis.* 1993 Jan;167(1):57-65. doi: 10.1093/infdis/167.1.57. PMID: 8418183.
65. La Rosa AM, Zunt JR, Peinado J, Lama JR, Ton TG, Suarez L, Pun M, Cabezas C, Sanchez J; Peruvian HIV Sentinel Surveillance Working Group. Retroviral infection in Peruvian men who have sex with men. *Clin Infect Dis.* 2009 Jul 1;49(1):112-7. doi: 10.1086/599609. PMID: 19480577; PMCID: PMC2770590.
66. Martins RM, do Nascimento LB, Carneiro MA, Teles SA, Lopes CL, Motta-Castro AR, Otsuki K, Vicente AC. HTLV-1 intrafamilial transmission through three generations in an isolated Afro-Brazilian community. *J Clin Virol.* 2010 Jun;48(2):155-7. doi: 10.1016/j.jcv.2010.03.004. Epub 2010 Apr 14. PMID: 20395170.
67. Bandeira LM, Uehara SNO, Puga MAM, Rezende GR, Vicente ACP, Domingos JA, do Lago BV, Niel C, Motta-Castro ARC. HTLV-1 intrafamilial transmission among Japanese immigrants in Brazil. *J Med Virol.* 2018 Feb;90(2):351-357. doi: 10.1002/jmv.24938. Epub 2017 Sep 22. PMID: 28876483.
68. Nunes da Silva A, Araújo THA, Boa-Sorte N, Farias G, Galvão-Barroso AK, de Carvalho A, Vicente AC, Galvão-Castro B, Rios Grassi MF. Epidemiological and molecular evidence of intrafamilial transmission through sexual and vertical routes in Bahia, the state with the highest prevalence of HTLV-1 in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2023 Sep 28;17(9):e0011005. doi: 10.1371/journal.pntd.0011005. PMID: 37769013; PMCID: PMC10593241.
69. Dixon AC, Dixon PS, Nakamura JM. Infection with the human T-lymphotropic virus type I. A review for clinicians. *West J Med.* 1989 Dec;151(6):632-7. PMID: 2694620; PMCID: PMC1026742.
70. Manns A, Hisada M, La Grenade L. Human T-lymphotropic virus type I infection. *Lancet.* 1999 Jun 5;353(9168):1951-8. doi: 10.1016/s0140-6736(98)09460-4. PMID: 10371587.
71. Caskey MF, Morgan DJ, Porto AF, Giozza SP, Muniz AL, Orge GO, Travassos MJ, Barrón Y, Carvalho EM, Glesby MJ. Clinical manifestations associated with HTLV type I infection: a cross-sectional study. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2007 Mar;23(3):365-71. doi: 10.1089/aid.2006.0140. PMID: 17411369; PMCID: PMC2593454.

72. Gessain A, Barin F, Vernant JC, Gout O, Maurs L, Calender A, de Thé G. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet*. 1985 Aug 24;2(8452):407-10. doi: 10.1016/s0140-6736(85)92734-5. PMID: 2863442.
73. 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 May 3;1(8488):1031-2. doi: 10.1016/s0140-6736(86)91298-5. PMID: 2871307.
74. Yoshida M, Miyoshi I, Hinuma Y. Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982 Mar;79(6):2031-5. doi: 10.1073/pnas.79.6.2031. PMID: 6979048; PMCID: PMC346116.
75. Matsuoka M. Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) infection and the onset of adult T-cell leukemia (ATL). *Retrovirology*. 2005 Apr 26;2:27. doi: 10.1186/1742-4690-2-27. PMID: 15854229; PMCID: PMC1131926.
76. Watanabe T. Adult T-cell leukemia: molecular basis for clonal expansion and transformation of HTLV-1-infected T cells. *Blood*. 2017 Mar 2;129(9):1071-1081. doi: 10.1182/blood-2016-09-692574. Epub 2017 Jan 23. PMID: 28115366; PMCID: PMC5374731.
77. Mochizuki M, Watanabe T, Yamaguchi K, Tajima K, Yoshimura K, Nakashima S, Shirao M, Araki S, Miyata N, Mori S, et al. Uveitis associated with human T lymphotropic virus type I: seroepidemiologic, clinical, and virologic studies. *J Infect Dis*. 1992 Oct;166(4):943-4. doi: 10.1093/infdis/166.4.943. PMID: 1527436.
78. La Grenade L. HTLV-I-associated infective dermatitis: past, present, and future. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 1996;13 Suppl 1:S46-9. doi: 10.1097/00042560-199600001-00009. PMID: 8797703.
79. Nishioka K, Sumida T, Hasunuma T. Human T lymphotropic virus type I in arthropathy and autoimmune disorders. *Arthritis Rheum*. 1996 Aug;39(8):1410-8. doi: 10.1002/art.1780390821. PMID: 8702452.
80. Yakova M, Lézin A, Dantin F, Lagathu G, Olindo S, Jean-Baptiste G, Arfi S, Césaire R. Increased proviral load in HTLV-1-infected patients with rheumatoid arthritis or connective tissue disease. *Retrovirology*. 2005 Feb 1;2:4. doi: 10.1186/1742-4690-2-4. PMID: 15686595; PMCID: PMC549050.
81. Setoguchi Y, Takahashi S, Nukiwa T, Kira S. Detection of human T-cell lymphotropic virus type I-related antibodies in patients with lymphocytic interstitial pneumonia. *Am Rev Respir Dis*. 1991 Dec;144(6):1361-5. doi: 10.1164/ajrccm/144.6.1361. PMID: 1741550.
82. Morgan OS, Rodgers-Johnson P, Mora C, Char G. HTLV-1 and polymyositis in Jamaica. *Lancet*. 1989 Nov 18;2(8673):1184-7. doi: 10.1016/s0140-6736(89)91793-5. PMID: 2572904.
83. Castro-Lima Vargens C, Grassi MF, Boa-Sorte N, Rathsam-Pinheiro RH, Olavarria VN, de Almeida Kruschewsky R, Galvão-Castro B. Keratoconjunctivitis sicca of human T cell

- lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) infected individuals is associated with high levels of HTLV-1 proviral load. *J Clin Virol*. 2011 Nov;52(3):177-80. doi: 10.1016/j.jcv.2011.07.016. Epub 2011 Aug 24. PMID: 21868282.
84. Carvalho EM, Da Fonseca Porto A. Epidemiological and clinical interaction between HTLV-1 and *Strongyloides stercoralis*. *Parasite Immunol*. 2004 Nov-Dec;26(11-12):487-97. doi: 10.1111/j.0141-9838.2004.00726.x. PMID: 15771684.
 85. Marinho J, Galvão-Castro B, Rodrigues LC, Barreto ML. Increased risk of tuberculosis with human T-lymphotropic virus-1 infection: a case-control study. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2005 Dec 15;40(5):625-8. doi: 10.1097/01.qai.0000174252.73516.7a. PMID: 16284541.
 86. Castro N, Oliveira P, Freitas D, Rodrigues W, Muniz A, Carvalho E. Erectile dysfunction and HTLV-I infection: a silent problem. *Int J Impot Res*. 2005 Jul-Aug;17(4):364-9. doi: 10.1038/sj.ijir.3901335. PMID: 15875060.
 87. Oliveira P, Castro NM, Muniz AL, Tanajura D, Brandão JC, Porto AF, Carvalho EM. Prevalence of erectile dysfunction in HTLV-1-infected patients and its association with overactive bladder. *Urology*. 2010 May;75(5):1100-3. doi: 10.1016/j.urology.2009.11.041. Epub 2010 Feb 26. PMID: 20189229; PMCID: PMC2866747.
 88. Lopes Martins AL, Rios Grassi MF, de Aquino Firmino A, Lacerda Araujo JP, Paixao TS, Galvão-Castro B, Boa-Sorte N. Human T-Lymphotropic Virus-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis Is Associated With Sexual Dysfunction in Infected Women of Reproductive Age. *Sex Med*. 2018 Dec;6(4):324-331. doi: 10.1016/j.esxm.2018.07.002. Epub 2018 Sep 1. PMID: 30181035; PMCID: PMC6302128.
 89. Proietti, A. B. F. C. *Cadernos Hemominas*. 4ª ed. Belo Horizonte: Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais. 2006.
 90. Murphy EL, Figueroa JP, Gibbs WN, Brathwaite A, Holding-Cobham M, Waters D, Cranston B, Hanchard B, Blattner WA. Sexual transmission of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I). *Ann Intern Med*. 1989 Oct 1;111(7):555-60. doi: 10.7326/0003-4819-111-7-555. PMID: 2789009.
 91. Gotuzzo E, Sánchez J, Escamilla J, Carrillo C, Phillips IA, Moreyra L, Stamm W, Ashley R, Roggen EL, Kreiss J, et al. Human T cell lymphotropic virus type I infection among female sex workers in Peru. *J Infect Dis*. 1994 Apr;169(4):754-9. doi: 10.1093/infdis/169.4.754. PMID: 8133088.
 92. Boulos R, Ruff AJ, Nahmias A, Holt E, Harrison L, Magder L, Wiktor SZ, Quinn TC, Margolis H, Halsey NA. Herpes simplex virus type 2 infection, syphilis, and hepatitis B virus infection in Haitian women with human immunodeficiency virus type 1 and human T lymphotropic virus type I infections. The Johns Hopkins University (JHU)/Centre pour le Developpement et la Santé (CDS) HIV Study Group. *J Infect Dis*. 1992 Aug;166(2):418-20. doi: 10.1093/infdis/166.2.418. PMID: 1321862.
 93. Turpin J, Yurick D, Khoury G, Pham H, Locarnini S, Melamed A, Witkover A, Wilson K, Purcell D, Bangham CRM, Einsiedel L. Impact of Hepatitis B Virus Coinfection on Human

- T-Lymphotropic Virus Type 1 Clonality in an Indigenous Population of Central Australia. *J Infect Dis.* 2019 Jan 29;219(4):562-567. doi: 10.1093/infdis/jiy546. PMID: 30307560; PMCID: PMC6350946.
94. Pereira FM, Almeida MDCC, Santos FLN, Carreiro RP, Galvão-Castro B, Grassi MFR. Distribution of Human T-Lymphotropic Virus (HTLV) and Hepatitis C Co-infection in Bahia, Brazil. *PLoS One.* 2020 Jul 21;15(7):e0223087. doi: 10.1371/journal.pone.0223087. PMID: 32692782; PMCID: PMC7373273.
 95. Rosadas C, Taylor GP. HTLV-1 and Co-infections. *Front Med (Lausanne).* 2022 Feb 3;9:812016. doi: 10.3389/fmed.2022.812016. PMID: 35187000; PMCID: PMC8850362.
 96. Muneishi H, Taguchi H, Sawada T, Ikezoe T, Matsui S, Tanaka S, Taniguchi T, Onoue O, Miyoshi I. Prevalence of HTLV-I in leprosy patients in two sanatoriums in Japan. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1998 Apr 1;17(4):380-3. doi: 10.1097/00042560-199804010-00014. PMID: 9525441.
 97. Grassi MF, Dos Santos NP, Lírio M, Kritski AL, Chagas Almeida Mda C, Santana LP, Lázaro N, Dias J, Netto EM, Galvão-Castro B. Tuberculosis incidence in a cohort of individuals infected with human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) in Salvador, Brazil. *BMC Infect Dis.* 2016 Sep 19;16:491. doi: 10.1186/s12879-016-1428-z. PMID: 27643609; PMCID: PMC5028977.
 98. Brites C, Weyll M, Pedroso C, Badaró R. Severe and Norwegian scabies are strongly associated with retroviral (HIV-1/HTLV-1) infection in Bahia, Brazil. *AIDS.* 2002 Jun 14;16(9):1292-3. doi: 10.1097/00002030-200206140-00015. PMID: 12045498.
 99. Santos SB, Porto AF, Muniz AL, Jesus AR, Carvalho EM. Clinical and immunological consequences of human T cell leukemia virus type-I and *Schistosoma mansoni* co-infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004;99(5 Suppl 1):121-6. doi: 10.1590/s0074-02762004000900022. Epub 2004 Oct 13. PMID: 15486648.
 100. Carvalho EM, Da Fonseca Porto A. Epidemiological and clinical interaction between HTLV-1 and *Strongyloides stercoralis*. *Parasite Immunol.* 2004 Nov-Dec;26(11-12):487-97. doi: 10.1111/j.0141-9838.2004.00726.x. PMID: 15771684.
 101. Schierhout G, McGregor S, Gessain A, Einsiedel L, Martinello M, Kaldor J. Association between HTLV-1 infection and adverse health outcomes: a systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. *Lancet Infect Dis.* 2020 Jan;20(1):133-143. doi: 10.1016/S1473-3099(19)30402-5. Epub 2019 Oct 21. PMID: 31648940.
 102. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. Guia de Manejo Clínico da Infecção pelo HTLV/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. Brasília: Ministério da Saúde, 2021. 104p.: il. ISBN 978-65-5993-116-3.
 103. Santos SB, Oliveira P, Luna T, Souza A, Nascimento M, Siqueira I, Tanajura D, Muniz AL, Glesby MJ, Carvalho EM. Immunological and viral features in patients with

- overactive bladder associated with human T-cell lymphotropic virus type 1 infection. *J Med Virol.* 2012 Nov;84(11):1809-17. doi: 10.1002/jmv.23341. PMID: 22997085; PMCID: PMC3457650.
104. Tanajura D, Castro N, Oliveira P, Neto A, Muniz A, Carvalho NB, Orge G, Santos S, Glesby MJ, Carvalho EM. Neurological Manifestations in Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1)-Infected Individuals Without HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis: A Longitudinal Cohort Study. *Clin Infect Dis.* 2015 Jul 1;61(1):49-56. doi: 10.1093/cid/civ229. Epub 2015 Mar 27. PMID: 25820277; PMCID: PMC4542911.
 105. Lins L, de Carvalho VJ, de Almeida Rego FF, Azevedo R, Kashima S, Gallazi VN, Xavier MT, Galvão-Castro B, Alcantara LC Jr. Oral health profile in patients infected with HTLV-1: clinical findings, proviral load, and molecular analysis from HTLV-1 in saliva. *J Med Virol.* 2012 Sep;84(9):1428-36. doi: 10.1002/jmv.23327. PMID: 22825822.
 106. Li HC, Biggar RJ, Miley WJ, Maloney EM, Cranston B, Hanchard B, Hisada M. Provirus load in breast milk and risk of mother-to-child transmission of human T lymphotropic virus type I. *J Infect Dis.* 2004 Oct 1;190(7):1275-8. doi: 10.1086/423941. Epub 2004 Aug 30. PMID: 15346338.
 107. Rosadas C, Woo T, Haddow J, Rowan A, Taylor GP. Anti-HTLV-1/2 IgG Antibodies in the Breastmilk of Seropositive Mothers. *Microorganisms.* 2021 Jun 30;9(7):1413. doi: 10.3390/microorganisms9071413. PMID: 34209130; PMCID: PMC8304728.
 108. Mori S, Mizoguchi A, Kawabata M, Fukunaga H, Usuku K, Maruyama I, Osame M. Bronchoalveolar lymphocytosis correlates with human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) proviral DNA load in HTLV-I carriers. *Thorax.* 2005 Feb;60(2):138-43. doi: 10.1136/thx.2004.021667. PMID: 15681503; PMCID: PMC1747290.
 109. Lezin A, Olindo S, Oliere S, Varrin-Doyer M, Marlin R, Cabre P, Smadja D, Cesaire R. Human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) proviral load in cerebrospinal fluid: a new criterion for the diagnosis of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis? *J Infect Dis.* 2005 Jun 1;191(11):1830-4. doi: 10.1086/429962. Epub 2005 Apr 28. PMID: 15871115.
 110. Araldi RP, Assaf SMR, Carvalho RF, Carvalho MACR, Souza JM, Magnelli RF, Módolo DG, Roberto FP, Stocco RC, Beçak W. Papillomaviruses: a systematic review. *Genet Mol Biol.* 2017 Jan-Mar;40(1):1-21. doi: 10.1590/1678-4685-GMB-2016-0128. Epub 2017 Feb 16. PMID: 28212457; PMCID: PMC5409773.
 111. Bosch FX, Broker TR, Forman D, Moscicki AB, Gillison ML, Doorbar J, Stern PL, Stanley M, Arbyn M, Poljak M, Cuzick J, Castle PE, Schiller JT, Markowitz LE, Fisher WA, Canfell K, Denny LA, Franco EL, Steben M, Kane MA, Schiffman M, Meijer CJ, Sankaranarayanan R, Castellsagué X, Kim JJ, Brotons M, Alemany L, Albero G, Diaz M, de Sanjosé S; Authors of the ICO Monograph 'Comprehensive Control of HPV Infections and Related Diseases' Vaccine Volume 30, Supplement 5, 2012. Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases. *Vaccine.* 2013 Nov 22;31 Suppl 8(08):I1-31. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.07.026. PMID: 24229716; PMCID: PMC4062073.

112. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol.* 2005 Mar;32 Suppl 1:S7-15. doi: 10.1016/j.jcv.2004.12.006. PMID: 15753007.
113. Haręza DA, Wilczyński JR, Paradowska E. Human Papillomaviruses as Infectious Agents in Gynecological Cancers. *Oncogenic Properties of Viral Proteins. Int J Mol Sci.* 2022 Feb 5;23(3):1818. doi: 10.3390/ijms23031818. PMID: 35163748; PMCID: PMC8836588.
114. Zheng ZM, Baker CC. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci.* 2006 Sep 1;11:2286-302. doi: 10.2741/1971. PMID: 16720315; PMCID: PMC1472295.
115. Chow LT, Broker TR, Steinberg BM. The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia. *APMIS.* 2010 Jun;118(6-7):422-49. doi: 10.1111/j.1600-0463.2010.02625.x. PMID: 20553526.
116. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer.* 2002 May;2(5):342-50. doi: 10.1038/nrc798. PMID: 12044010.
117. Bruni L, Diaz M, Castellsagué X, Ferrer E, Bosch FX, de Sanjosé S. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J Infect Dis.* 2010 Dec 15;202(12):1789-99. doi: 10.1086/657321. Epub 2010 Nov 10. PMID: 21067372.
118. Colpani V, Soares Falcetta F, Bacelo Bidinotto A, Kops NL, Falavigna M, Serpa Hammes L, Schwartz Benzaken A, Kalume Maranhão AG, Domingues CMAS, Wendland EM. Prevalence of human papillomavirus (HPV) in Brazil: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2020 Feb 21;15(2):e0229154. doi: 10.1371/journal.pone.0229154. PMID: 32084177; PMCID: PMC7034815.
119. Ayres AR, Silva GA. Cervical HPV infection in Brazil: systematic review. *Rev Saude Publica.* 2010 Oct;44(5):963-74. English, Portuguese. doi: 10.1590/s0034-89102010000500023. PMID: 20877926.
120. Wendland EM, Villa LL, Unger ER, Domingues CM, Benzaken AS; POP-Brazil Study Group. Prevalence of HPV infection among sexually active adolescents and young adults in Brazil: The POP-Brazil Study. *Sci Rep.* 2020 Mar 18;10(1):4920. doi: 10.1038/s41598-020-61582-2. PMID: 32188884; PMCID: PMC7080737.
121. Gadelha SR, Soares-Barreto DMV, Costa GB, Leal VCN, Gomes LGS, Santos UR, Ferreira GCS, Carvalho LD, Soraes-Almeida SMV, Mello MAG, Mariano APM, Sousa SMB, Vago AR, Marin LJ. Clinical, laboratory and epidemiological aspects of HPV infection in a low-income population from South Bahia, Brazil. *Epidemiol Infect.* 2017 Dec;145(16):3398-3404. doi: 10.1017/S0950268817002448. Epub 2017 Nov 23. PMID: 29166976; PMCID: PMC9148761.
122. Centers for Disease Control and Prevention. *Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases.* Hall E., Wodi A.P., Hamborsky J., et al., eds. 14th ed. Washington, D.C. Public Health Foundation, 2021.

123. Wierzbicka M, San Giorgi MRM, Dikkers FG. Transmission and clearance of human papillomavirus infection in the oral cavity and its role in oropharyngeal carcinoma - A review. *Rev Med Virol.* 2023 Jan;33(1):e2337. doi: 10.1002/rmv.2337. Epub 2022 Feb 22. PMID: 35194874; PMCID: PMC10078185.
124. Gonzalez-Losa Mdel R, Barrera ES, Herrera-Pech V, Conde-Ferrández L, Puerto-Solís M, Ayora-Talavera G. Epidemiology of oral HPV in the oral mucosa in women without signs of oral disease from Yucatan, Mexico. *Braz J Microbiol.* 2015 Mar 31;46(1):301-6. doi: 10.1590/S1517-838246120130976. PMID: 26221121; PMCID: PMC4512083.
125. Rintala M, Grénman S, Puranen M, Syrjänen S. Natural history of oral papillomavirus infections in spouses: a prospective Finnish HPV Family Study. *J Clin Virol.* 2006 Jan;35(1):89-94. doi: 10.1016/j.jcv.2005.05.012. Epub 2005 Aug 19. PMID: 16112613.
126. Termine N, Giovannelli L, Matranga D, Caleca MP, Bellavia C, Perino A, Campisi G. Oral human papillomavirus infection in women with cervical HPV infection: new data from an Italian cohort and a metanalysis of the literature. *Oral Oncol.* 2011 Apr;47(4):244-50. doi: 10.1016/j.oraloncology.2011.02.011. PMID: 21429788.
127. Pamnani SJ, Sudenga SL, Viscidi R, Rollison DE, Torres BN, Ingles DJ, Abrahamsen M, Villa LL, Lazcano-Ponce E, Salmeron J, Quiterio M, Huang Y, Borenstein A, Giuliano AR. Impact of Serum Antibodies to HPV Serotypes 6, 11, 16, and 18 to Risks of Subsequent Genital HPV Infections in Men: The HIM Study. *Cancer Res.* 2016 Oct 15;76(20):6066-6075. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0224. Epub 2016 Aug 17. PMID: 27535333; PMCID: PMC5065769.
128. Armbruster-Moraes E, Ioshimoto LM, Leão E, Zugaib M. Presence of human papillomavirus DNA in amniotic fluids of pregnant women with cervical lesions. *Gynecol Oncol.* 1994 Aug;54(2):152-8. doi: 10.1006/gyno.1994.1185. PMID: 8063239.
129. Tseng CJ, Liang CC, Soong YK, Pao CC. Perinatal transmission of human papillomavirus in infants: relationship between infection rate and mode of delivery. *Obstet Gynecol.* 1998 Jan;91(1):92-6. doi: 10.1016/s0029-7844(97)00593-0. PMID: 9464728.
130. Koskimaa HM, Waterboer T, Pawlita M, Grénman S, Syrjänen K, Syrjänen S. Human papillomavirus genotypes present in the oral mucosa of newborns and their concordance with maternal cervical human papillomavirus genotypes. *J Pediatr.* 2012 May;160(5):837-43. doi: 10.1016/j.jpeds.2011.10.027. Epub 2011 Dec 2. PMID: 22137368.
131. Lee SM, Park JS, Norwitz ER, Koo JN, Oh IH, Park JW, Kim SM, Kim YH, Park CW, Song YS. Risk of vertical transmission of human papillomavirus throughout pregnancy: a prospective study. *PLoS One.* 2013 Jun 13;8(6):e66368. doi: 10.1371/journal.pone.0066368. PMID: 23785495; PMCID: PMC3681772.
132. Rintala MA, Grénman SE, Puranen MH, Isolauri E, Ekblad U, Kero PO, Syrjänen SM. Transmission of high-risk human papillomavirus (HPV) between parents and infant: a prospective study of HPV in families in Finland. *J Clin Microbiol.* 2005 Jan;43(1):376-81. doi: 10.1128/JCM.43.1.376-381.2005. PMID: 15634997; PMCID: PMC540188.

133. Burchell AN, Winer RL, de Sanjosé S, Franco EL. Chapter 6: Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. *Vaccine*. 2006 Aug 31;24 Suppl 3:S3/52-61. doi: 10.1016/j.vaccine.2006.05.031. Epub 2006 Jun 2. PMID: 16950018.
134. Veldhuijzen NJ, Snijders PJ, Reiss P, Meijer CJ, van de Wijgert JH. Factors affecting transmission of mucosal human papillomavirus. *Lancet Infect Dis*. 2010 Dec;10(12):862-74. doi: 10.1016/S1473-3099(10)70190-0. Epub 2010 Nov 11. Erratum in: *Lancet Infect Dis*. 2015 Oct;15(10):1130. PMID: 21075056.
135. Schneider A. Pathogenesis of genital HPV infection. *Genitourin Med*. 1993 Jun;69(3):165-73. doi: 10.1136/sti.69.3.165. PMID: 8392965; PMCID: PMC1195056.
136. Doorbar J. The human Papillomavirus twilight zone - Latency, immune control and subclinical infection. *Tumour Virus Res*. 2023 Jun 23;16:200268. doi: 10.1016/j.tvr.2023.200268. Epub ahead of print. PMID: 37354969.
137. Chen HC, Schiffman M, Lin CY, Pan MH, You SL, Chuang LC, Hsieh CY, Liaw KL, Hsing AW, Chen CJ; CBCSP-HPV Study Group. Persistence of type-specific human papillomavirus infection and increased long-term risk of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2011 Sep 21;103(18):1387-96. doi: 10.1093/jnci/djr283. Epub 2011 Sep 6. PMID: 21900119; PMCID: PMC3176778.
138. Lax S. Histopathology of cervical precursor lesions and cancer. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat*. 2011 Sep;20(3):125-33. PMID: 22131112.
139. Stolnicu S, Talia KL, McCluggage WG. The Evolving Spectrum of Precursor Lesions of Cervical Adenocarcinomas. *Adv Anat Pathol*. 2020 Sep;27(5):278-293. doi: 10.1097/PAP.0000000000000266. PMID: 32482967.
140. Berry JM, Jay N, Cranston RD, Darragh TM, Holly EA, Welton ML, Palefsky JM. Progression of anal high-grade squamous intraepithelial lesions to invasive anal cancer among HIV-infected men who have sex with men. *Int J Cancer*. 2014 Mar 1;134(5):1147-55. doi: 10.1002/ijc.28431. Epub 2013 Sep 14. PMID: 23934991.
141. Reich O, Regauer S, Marth C, Schmidt D, Horn LC, Dannecker C, Menton M, Beckmann MW. Precancerous Lesions of the Cervix, Vulva and Vagina According to the 2014 WHO Classification of Tumors of the Female Genital Tract. *Geburtshilfe Frauenheilkd*. 2015 Oct;75(10):1018-1020. doi: 10.1055/s-0035-1558052. PMID: 26556904; PMCID: PMC4629991.
142. Dasgupta S, Ewing-Graham PC, Swagemakers SMA, van der Spek PJ, van Doorn HC, Noordhoek Hegt V, Koljenović S, van Kemenade FJ. Precursor lesions of vulvar squamous cell carcinoma - histology and biomarkers: A systematic review. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2020 Mar;147:102866. doi: 10.1016/j.critrevonc.2020.102866. Epub 2020 Jan 15. PMID: 32058913.
143. Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev*. 2003 Jan;16(1):1-17. doi: 10.1128/CMR.16.1.1-17.2003. PMID: 12525422; PMCID: PMC145302.

144. Andersson S, Rylander E, Larsson B, Strand A, Silfversvård C, Wilander E. The role of human papillomavirus in cervical adenocarcinoma carcinogenesis. *Eur J Cancer*. 2001 Jan;37(2):246-50. doi: 10.1016/s0959-8049(00)00376-2. PMID: 11166153.
145. Prendiville W, Sankaranarayanan R. *Colposcopy and Treatment of Cervical Precancer*. Lyon (FR): International Agency for Research on Cancer; 2017. PMID: 33689255.
146. Okunade KS. Human papillomavirus and cervical cancer. *J Obstet Gynaecol*. 2020 Jul;40(5):602-608. doi: 10.1080/01443615.2019.1634030. Epub 2019 Sep 10. Erratum in: *J Obstet Gynaecol*. 2020 May;40(4):590. PMID: 31500479; PMCID: PMC7062568.
147. Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, Raab S, Sherman M, Wilbur D, Wright T Jr, Young N; Forum Group Members; Bethesda 2001 Workshop. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA*. 2002 Apr 24;287(16):2114-9. doi: 10.1001/jama.287.16.2114. PMID: 11966386.
148. Ramírez AT, Valls J, Baena A, Rojas FD, Ramírez K, Álvarez R, Cristaldo C, Henríquez O, Moreno A, Reynaga DC, Palma HG, Robinson I, Hernández DC, Bardales R, Cardinal L, Salgado Y, Martínez S, González E, Guillén D, Fleider L, Tatti S, Villagra V, Venegas G, Cruz-Valdez A, Valencia M, Rodríguez G, Terán C, Picconi MA, Ferrera A, Kasamatsu E, Mendoza L, Calderon A, Luciani S, Broutet N, Darragh T, Almonte M, Herrero R; ESTAMPA Study Group. Performance of cervical cytology and HPV testing for primary cervical cancer screening in Latin America: an analysis within the ESTAMPA study. *Lancet Reg Health Am*. 2023 Sep 20;26:100593. doi: 10.1016/j.lana.2023.100593. PMID: 37766799; PMCID: PMC10520426.
149. Vinh-Hung V, Bourgain C, Vlastos G, Cserni G, De Ridder M, Storme G, Vlastos AT. Prognostic value of histopathology and trends in cervical cancer: a SEER population study. *BMC Cancer*. 2007 Aug 23;7:164. doi: 10.1186/1471-2407-7-164. PMID: 17718897; PMCID: PMC1994954.
150. Ouh YT, Park JJ, Kang M, Kim M, Song JY, Shin SJ, Shim SH, Yoo HJ, Lee M, Lee SJ, Shin W, Chong GO, Choi MC, Choi CH, Min KJ. Discrepancy between Cytology and Histology in Cervical Cancer Screening: a Multicenter Retrospective Study (KGOG 1040). *J Korean Med Sci*. 2021 Jun 21;36(24):e164. doi: 10.3346/jkms.2021.36.e164. PMID: 34155836; PMCID: PMC8216990.
151. Dixit R, Bhavsar C, Marfatia YS. Laboratory diagnosis of human papillomavirus virus infection in female genital tract. *Indian J Sex Transm Dis AIDS*. 2011 Jan;32(1):50-2. doi: 10.4103/0253-7184.81257. PMID: 21799579; PMCID: PMC3139291.
152. Juckett G, Hartman-Adams H. Human papillomavirus: clinical manifestations and prevention. *Am Fam Physician*. 2010 Nov 15;82(10):1209-13. PMID: 21121531.
153. Koliopoulos G, Nyaga VN, Santesso N, Bryant A, Martin-Hirsch PP, Mustafa RA, Schünemann H, Paraskevaidis E, Arbyn M. Cytology versus HPV testing for cervical cancer screening in the general population. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017 Aug 10;8(8):CD008587. doi: 10.1002/14651858.CD008587.pub2. PMID: 28796882; PMCID: PMC6483676.

154. Lee SH, Vigliotti VS, Vigliotti JS, Pappu S. Validation of human papillomavirus genotyping by signature DNA sequence analysis. *BMC Clin Pathol*. 2009 May 22;9:3. doi: 10.1186/1472-6890-9-3. PMID: 19463165; PMCID: PMC2691405.
155. Poljak M, Cuzick J, Kocjan BJ, Iftner T, Dillner J, Arbyn M. Nucleic acid tests for the detection of alpha human papillomaviruses. *Vaccine*. 2012 Nov 20;30 Suppl 5:F100-6. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.04.105. PMID: 23199952.
156. Mühr LSA, Guerendiain D, Cuschieri K, Sundström K. Human Papillomavirus Detection by Whole-Genome Next-Generation Sequencing: Importance of Validation and Quality Assurance Procedures. *Viruses*. 2021 Jul 8;13(7):1323. doi: 10.3390/v13071323. PMID: 34372528; PMCID: PMC8310033.
157. Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakami I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev Med Virol*. 2015 Mar;25 Suppl 1(Suppl Suppl 1):2-23. doi: 10.1002/rmv.1822. PMID: 25752814; PMCID: PMC5024016.
158. Bruggink SC, de Koning MN, Gussekloo J, Egberts PF, Ter Schegget J, Feltkamp MC, Bavinck JN, Quint WG, Assendelft WJ, Eekhof JA. Cutaneous wart-associated HPV types: prevalence and relation with patient characteristics. *J Clin Virol*. 2012 Nov;55(3):250-5. doi: 10.1016/j.jcv.2012.07.014. Epub 2012 Aug 11. PMID: 22884670.
159. Larson DA, Derkay CS. Epidemiology of recurrent respiratory papillomatosis. *APMIS*. 2010 Jun;118(6-7):450-4. doi: 10.1111/j.1600-0463.2010.02619.x. PMID: 20553527.
160. Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Muñoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer*. 2003 Jan 13;88(1):63-73. doi: 10.1038/sj.bjc.6600688. PMID: 12556961; PMCID: PMC2376782.
161. Saraiya M, Unger ER, Thompson TD, Lynch CF, Hernandez BY, Lyu CW, Steinau M, Watson M, Wilkinson EJ, Hopenhayn C, Copeland G, Cozen W, Peters ES, Huang Y, Saber MS, Altekruse S, Goodman MT; HPV Typing of Cancers Workgroup. US assessment of HPV types in cancers: implications for current and 9-valent HPV vaccines. *J Natl Cancer Inst*. 2015 Apr 29;107(6):djv086. doi: 10.1093/jnci/djv086. PMID: 25925419; PMCID: PMC4838063.
162. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004 Jun 20;324(1):17-27. doi: 10.1016/j.virol.2004.03.033. PMID: 15183049.
163. Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst*. 1995 Jun 7;87(11):796-802. doi: 10.1093/jnci/87.11.796. PMID: 7791229.

164. Kodner CM, Nasraty S. Management of genital warts. *Am Fam Physician*. 2004 Dec 15;70(12):2335-42. PMID: 15617297.
165. Park JY, Lee KH, Dong SM, Kang S, Park SY, Seo SS. The association of pre-conization high-risk HPV load and the persistence of HPV infection and persistence/recurrence of cervical intraepithelial neoplasia after conization. *Gynecol Oncol*. 2008 Mar;108(3):549-54. doi: 10.1016/j.ygyno.2007.11.009. Epub 2008 Jan 4. PMID: 18177929.
166. Drolet M, Bénard É, Boily MC, Ali H, Baandrup L, Bauer H, Beddows S, Brisson J, Brotherton JM, Cummings T, Donovan B, Fairley CK, Flagg EW, Johnson AM, Kahn JA, Kavanagh K, Kjaer SK, Kliwer EV, Lemieux-Mellouki P, Markowitz L, Mboup A, Mesher D, Niccolai L, Oliphant J, Pollock KG, Soldan K, Sonnenberg P, Tabrizi SN, Tanton C, Brisson M. Population-level impact and herd effects following human papillomavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2015 May;15(5):565-80. doi: 10.1016/S1473-3099(14)71073-4. Epub 2015 Mar 3. PMID: 25744474; PMCID: PMC5144106.
167. de Sanjosé S, Serrano B, Tous S, Alejo M, Lloveras B, Quirós B, Clavero O, Vidal A, Ferrándiz-Pulido C, Pavón MÁ, Holzinger D, Halc G, Tommasino M, Quint W, Pawlita M, Muñoz N, Bosch FX, Alemany L; RIS HPV TT, VVAP and Head and Neck study groups. Burden of Human Papillomavirus (HPV)-Related Cancers Attributable to HPVs 6/11/16/18/31/33/45/52 and 58. *JNCI Cancer Spectr*. 2019 Jan 7;2(4):pky045. doi: 10.1093/jncics/pky045. PMID: 31360870; PMCID: PMC6649711.
168. Serrano B, Alemany L, Tous S, Bruni L, Clifford GM, Weiss T, Bosch FX, de Sanjosé S. Potential impact of a nine-valent vaccine in human papillomavirus related cervical disease. *Infect Agent Cancer*. 2012 Dec 29;7(1):38. doi: 10.1186/1750-9378-7-38. PMID: 23273245; PMCID: PMC3554470.
169. Zunt JR, Dezzutti CS, Montano SM, Thomas KK, Alarcón JO, Quijano E, Courtois BN, Sánchez JL, Campos P, Gotuzzo E, Guenther PC, Lal RB, Holmes KK. Cervical shedding of human T cell lymphotropic virus type I is associated with cervicitis. *J Infect Dis*. 2002 Dec 1;186(11):1669-72. doi: 10.1086/345364. Epub 2002 Nov 6. PMID: 12447745; PMCID: PMC2675941.
170. Bélec L, Georges-Courbot MC, Georges A, Mohamed AS, Londos-Gagliardi D, Hallouin MC, Hocini H, Guillemain B. Cervicovaginal synthesis of IgG antibodies to the immunodominant 175-199 domain of the surface glycoprotein gp46 of human T-cell leukemia virus type I. *J Med Virol*. 1996 Sep;50(1):42-9. doi: 10.1002/(SICI)1096-9071(199609)50:1<42::AID-JMV9>3.0.CO;2-T. PMID: 8890040.
171. Masters WH, Johnson VE. eds. *Human Sexual Response*. New York: Little, Brown and Company, 1966.
172. Woodard TL, Diamond MP. Physiologic measures of sexual function in women: a review. *Fertil Steril*. 2009 Jul;92(1):19-34. doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.04.041. Epub 2008 Nov 30. PMID: 19046582; PMCID: PMC2771367.

173. Kinoshita K, Amagasaki T, Hino S, Doi H, Yamanouchi K, Ban N, Momita S, Ikeda S, Kamihira S, Ichimaru M, et al. Milk-borne transmission of HTLV-I from carrier mothers to their children. *Jpn J Cancer Res.* 1987 Jul;78(7):674-80. PMID: 2887539.
174. Caterino-de-Araujo A, de los Santos-Fortuna E. No evidence of vertical transmission of HTLV-I and HTLV-II in children at high risk for HIV-1 infection from São Paulo, Brazil. *J Trop Pediatr.* 1999 Feb;45(1):42-7. doi: 10.1093/tropej/45.1.42. PMID: 10191592.
175. Kashiwagi K, Furusyo N, Nakashima H, Kubo N, Kinukawa N, Kashiwagi S, Hayashi J. A decrease in mother-to-child transmission of human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) in Okinawa, Japan. *Am J Trop Med Hyg.* 2004 Feb;70(2):158-63. PMID: 14993627.
176. Chan PK, Lam CW, Cheung TH, Li WW, Lo KW, Chan MY, Cheung JL, Cheng AF. Association of human papillomavirus type 58 variant with the risk of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2002 Aug 21;94(16):1249-53. doi: 10.1093/jnci/94.16.1249. PMID: 12189229.
177. Godínez JM, Heideman DA, Gheit T, Alemany L, Snijders PJ, Tommasino M, Meijer CJ, de Sanjosé S, Bosch FX, Bravo IG. Differential presence of Papillomavirus variants in cervical cancer: an analysis for HPV33, HPV45 and HPV58. *Infect Genet Evol.* 2013 Jan;13:96-104. doi: 10.1016/j.meegid.2012.09.011. Epub 2012 Sep 26. PMID: 23022714.
178. Levi JE, Kleter B, Quint WG, Fink MC, Canto CL, Matsubara R, Linhares I, Segurado A, Vanderborght B, Neto JE, Van Doorn LJ. High prevalence of human papillomavirus (HPV) infections and high frequency of multiple HPV genotypes in human immunodeficiency virus-infected women in Brazil. *J Clin Microbiol.* 2002 Sep;40(9):3341-5. doi: 10.1128/JCM.40.9.3341-3345.2002. PMID: 12202576; PMCID: PMC130803.
179. Levi JE, Fernandes S, Tatenno AF, Motta E, Lima LP, Eluf-Neto J, Pannuti CS. Presence of multiple human papillomavirus types in cervical samples from HIV infected women. *Gynecol Oncol.* 2004 Jan;92(1):225-31. doi: 10.1016/j.ygyno.2003.10.004. PMID: 14751163.
180. Ameer A, Meiring TL, Bunikis I, Häggqvist S, Lindau C, Lindberg JH, Gustavsson I, Mbulawa ZZ, Williamson AL, Gyllenstein U. Comprehensive profiling of the vaginal microbiome in HIV positive women using massive parallel semiconductor sequencing. *Sci Rep.* 2014 Mar 18;4:4398. doi: 10.1038/srep04398. PMID: 24637939; PMCID: PMC3957130.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Esta tese foi desenvolvida através da modalidade de fluxo contínuo, durante esse período alguns projetos foram realizados em paralelo e encontram-se publicados em revistas indexadas:

BRAZ J INFECT DIS 2019;23(1):27-33



The Brazilian Journal of
INFECTIOUS DISEASES

www.elsevier.com/locate/bjid



Original article

Evaluation of the cervicovaginal environment in asymptomatic Human T-cell lymphotropic virus type 1 infected women



Alisson de Aquino Firmino^a, Adenilda Lima Lopes Martins^a, Luana Leandro Gois^{a,b},
Taiane Silva Paixão^a, Everton da Silva Batista^a, Bernardo Galvão-Castro^{a,b},
Maria Fernanda Rios Grassi^{a,b,*}

^a Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, BA, Brazil
^b Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, BA, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 14 September 2018
Accepted 7 February 2019
Available online 6 March 2019

Keywords:
HTLV-1
Inflammatory cytokines
Proviral load
Cervicovaginal cytopathology

ABSTRACT

Introduction: Human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) is sexually transmitted and causes persistent infection. This virus induces activation of the immune system and production of inflammatory cytokines. This study aimed to assess the cytokine profile and cytopathological findings in the cervicovaginal fluid of asymptomatic HTLV-1-infected women.

Methods: HTLV-1-infected and uninfected women were selected at the Centro de Atendimento ao Portador de HTLV in Salvador-Brazil. None of the included HTLV-1-infected women reported any HTLV-1-associated diseases. All volunteers underwent gynecological examination to collect cervicovaginal fluid. Cytokine quantification was performed using the Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 kit. Light microscopy was used to evaluate cervicovaginal cytopathology. In addition, proviral load in cervicovaginal fluid and peripheral blood was measured by real-time quantitative polymerase chain reaction.

Results: 112 women (63 HTLV-1-infected and 49 uninfected) were evaluated. No differences were found with respect to cytopathological cervicovaginal findings between the groups. IL-2, TNF, IL-4, IL-10, and IL-17 levels were significantly higher in cervicovaginal fluid of the HTLV-1-infected women than in uninfected women ($p < 0.05$). Conversely, IFN- γ was found to be lower in the HTLV-1-infected women ($p < 0.001$) compared to uninfected individuals. Cervicovaginal proviral load was detectable in 53% of the HTLV-1-infected women and was found to be consistently lower than the proviral load in peripheral blood.

Conclusions: HTLV-1 infection induces immune activation in cervicovaginal environment, characterized by elevated concentrations of Th1, Th2, and IL17 in the cervicovaginal fluid.

© 2019 Sociedade Brasileira de Infectologia. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Corresponding author.

E-mail address: fernanda.grassi@fiocruz.br (M.F. Grassi).

<https://doi.org/10.1016/j.bjid.2019.02.001>

1413-8670/© 2019 Sociedade Brasileira de Infectologia. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).



Vaginal dryness in women infected by human T-lymphotropic virus type 1: an exploratory study

Adenilda Lima Lopes Martins, MD, PhD^{1,2}, Alisson de Aquino Firmino, MSc²,
 Ney Boa-Sorte, MD, PhD², Jean Paulo Lacerda Araújo, MD², Taiane Silva Paixão, MD²,
 Adriele Ribeiro França Viriato, MD, MSc², Bernardo Galvão-Castro, MD, PhD^{2,3},
 Maria Fernanda Rios Grassi, MD, PhD^{2,3,*}

¹Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia, Brazil

²Centro Integrativo e Interdisciplinar de HTLV, Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, Bahia, Brazil

³Laboratório Avançado de Saúde Pública, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia, Brazil

*Corresponding author: Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal - Salvador/BA, Brazil, CEP 40296-710.
 Email: fernanda.grassi@fiocruz.br

Abstract

Background: Human T-lymphotropic virus type-1 (HTLV-1) causes a variety of sicca symptoms, including xeroderma, xerostomia, and xerophthalmia.

Aim: We sought to evaluate vaginal dryness via the degree of perceived vaginal lubrication, vaginal hormonal cytology, and direct measurements of vaginal wetting.

Methods: The research was designed as a cross-sectional study. Vaginal dryness was assessed by scores in the lubrication domain of the Female Sexual Function Index (FSFI) questionnaire and the Vaginal Maturation Index (VMI) determined by vaginal hormonal cytology, as well as the measurement of vaginal lubrication using Schirmer strips placed at the anterior vaginal wall. Medians (25th–75th percentiles) were calculated for each group and compared using a nonparametric Kruskal-Wallis test and the Dunn-Bonferroni post hoc method.

Outcomes: Outcomes were detection of the presence of vaginal dryness in women who were infected or noninfected with HTLV-1.

Results: HTLV-1-infected women ($n = 72$, 57 asymptomatic and 15 with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis [HAM/TSP]) and uninfected women ($n = 49$) were studied. Women with HAM/TSP had significantly lower FSFI lubrication scores than asymptomatic and uninfected women ($P = .032$). In addition, women with HAM/TSP had significantly lower VMI compared with the asymptomatic and uninfected groups ($P = .027$ and $P = .039$, respectively).

Clinical Implications: The results of this study show a reduction in vaginal lubrication in HTLV-1-infected women diagnosed with HAM/TSP compared with asymptomatic and uninfected women.

Strengths and Limitations: The lack of a gold standard test for the diagnosis of vaginal dryness and the fact that no assessment of vaginal pH was performed were limitations of this study. The strength of the study was the comprehensive assessment of vaginal dryness from several perspectives: subjective (perception of vaginal lubrication according to the vaginal lubrication domain of the FSFI), hormonal (vaginal hormonal cytology to assess local hormone status), and the degree of vaginal moisture (direct measurement of vaginal dryness with an instrument, the Schirmer strip, already used to measure the presence of dry eye).

Conclusion: HTLV-1-infected women with HAM/TSP have decreased vaginal lubrication compared with asymptomatic and uninfected women after adjusting for age.

Keywords: HTLV-1; vaginal dryness; Female sexual function index; Vaginal maturation index.

Introduction

Human T-lymphotropic virus type-1 (HTLV-1) is transmitted through blood or contaminated tissue, from mother to child mainly through breastfeeding and via sexual intercourse.¹ This retrovirus is the etiologic agent of adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL), HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP)^{2,3} and uveitis.⁴ An association between infection by HTLV-1 and Sjogren's syndrome has been suggested because HTLV-1-infected individuals present sicca symptoms such as xeroderma^{5,6} and dry mouth, in addition to xerophthalmia, with increased frequency compared with uninfected individuals.^{7–9} Signs of dryness involving the nose, trachea, and skin, in addition to vaginal dryness, are frequently found in patients with Sjogren's syndrome.¹⁰

Vaginal dryness is characterized by insufficient lubrication of the vaginal mucosa, which may cause burning, itching, dyspareunia and sexual dysfunction.^{11,12} Recently, HAM/TSP was found to be associated with sexual dysfunction in women of reproductive age infected with HTLV-1. Accordingly, women with a diagnosis of HAM/TSP presented significant decreases in median scores of the lubrication domain on the Female Sexual Function Index (FSFI) questionnaire compared with asymptomatic and uninfected women.¹³

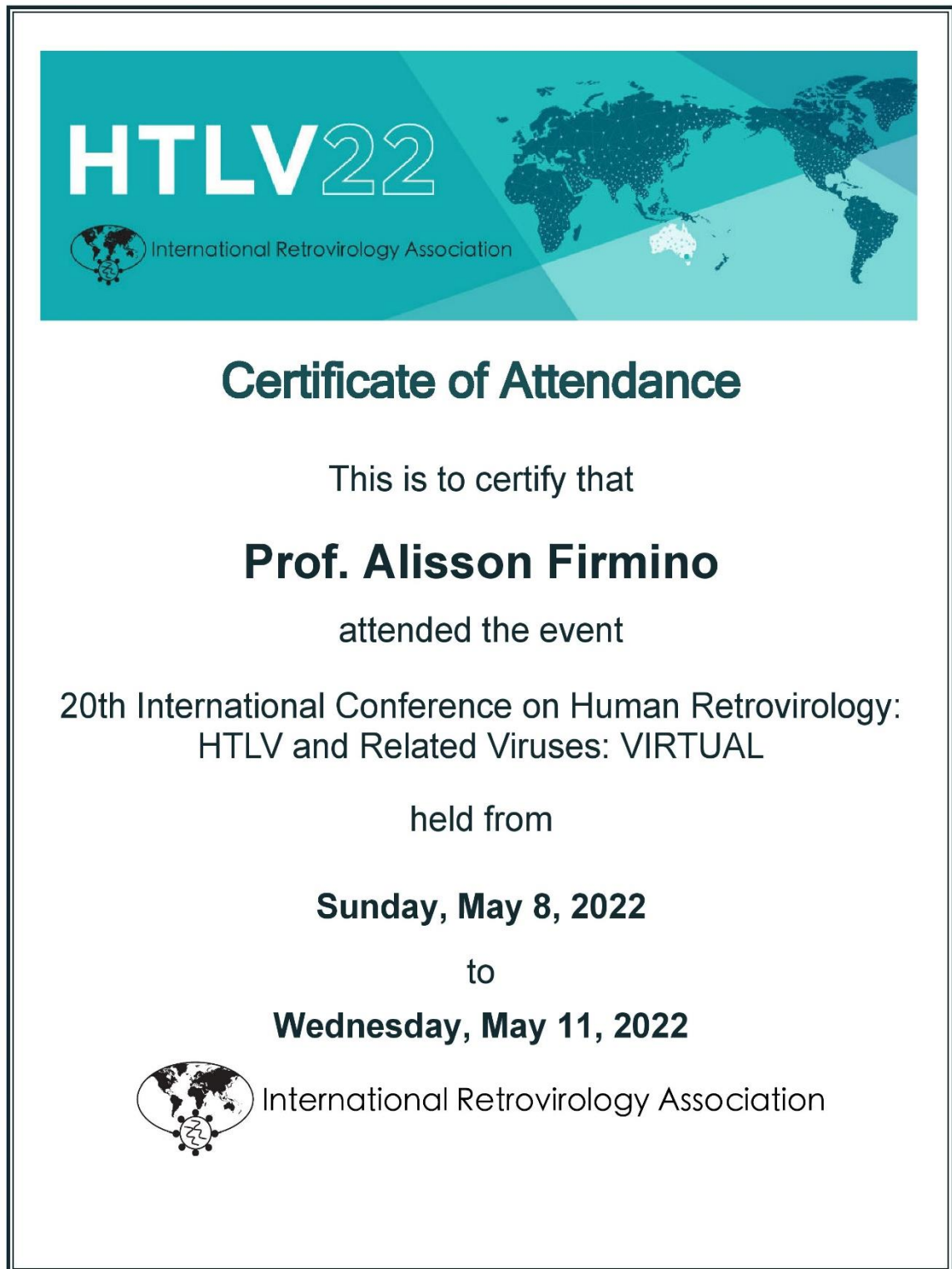
The diagnosis of vaginal dryness is based primarily on the patient's clinical complaints. This assessment is usually supported by other investigations, such as measurement of vaginal pH, determination of the vaginal maturation index (VMI), and/or measurement of follicle-stimulating hormone,

Received: September 18, 2022. Revised: December 22, 2022. Accepted: January 10, 2023

© The Author(s) 2023. Published by Oxford University Press on behalf of The International Society of Sexual Medicine.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com

APÊNDICE B - Participações em eventos científicos relacionados à tese:

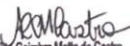


CERTIFICADO

Pelo presente, certificamos que **Maria Fernanda Rios Grassi**, apresentou o trabalho **"Evaluation of major human papillomavirus (HPV) subtypes in vaginal fluid of HTLV-1-infected women from Salvador, Brazil."** e lhe foi conferido menção honrosa, por sua participação no **Prêmio ANGELA MANNS**, durante o **XV Simpósio Internacional sobre HTLV no Brasil**, realizado entre os dias 08 e 10 de novembro de 2022, em Campo Grande/MS.

AUTORES DO TRABALHO: Alisson de Aquino Firmino; Paulo Roberto Tavares Gomes Filho; Adenilda Lima Lopes Martins; Mariana Lima Drumond; Giselle Calasans de Souza Costa; Carlos Gustavo Regis da Silva; Bernardo Galvão-Castro; Maria Fernanda Rios Grassi

Campo Grande, 09 de novembro de 2022.


Ana Rita Coimbra Motta de Castro
SIAPE: 1145223
FIOCRUZ - VPGOI

Prof. Dra. Ana Rita Coimbra Motta de Castro
Presidente do Simpósio



CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho

Prevalência e subtipos de HPV cérvico-vaginal em mulheres infectadas pelo HTLV-1

de autoria de Alisson A Firmino, Paulo RTG Filho, Adenilda LL Martins, Mariana L Drumond, Giselle CS Costa, Carlos GR Silva, Bernardo Galvão-Castro, Maria FR Grassi, foi apresentado na sessão oral do Eixo Doenças Causadas por Vírus, durante o 1º Seminário Integrado do Laboratório Avançado de Saúde Pública 2023 (LASP/Fiocruz-BA), realizado no dia 03 de fevereiro de 2023, em Salvador, Bahia.

Salvador-BA, 03 de fevereiro de 2023.



Dra. Maria Fernanda Rios Grassi
Coordenadora do LASP



Dr. Fred Luciano Neves Santos
Coordenador do Seminário

| SEMINÁRIO INTEGRADO DO



T-1619:**EVALUATION OF MAJOR HUMAN PAPILLOMAVIRUS (HPV) SUBTYPES IN VAGINAL FLUID OF HTLV-1-INFECTED WOMEN FROM SALVADOR, BRAZIL**

*Alisson de Aquino Firmino¹, Paulo Roberto Tavares Gomes Filho¹, Adenilda Lima Lopes Martins^{1,2}, Mariana Lima Drumond¹, Giselle Calasans de Souza Costa³, Carlos Gustavo Regis da Silva⁴, Bernardo Galvão-Castro^{1,4}, **Maria Fernanda Rios Grassi^{1,4}***

fernanda.grassi@fiocruz.br

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

² Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia, Brazil

³ Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil

⁴ Laboratório Avançado de Saúde Pública, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Brasil.

Introduction: Cervical cancer is associated with persistent infection by oncogenic HPV subtypes. A higher prevalence of HPV has been found in women infected with HTLV-1, but few studies describe coinfection.

Objective: To investigate cervical and vaginal HPV infection in women infected with HTLV-1 and to determine the most prevalent subtypes.

Methods: Vaginal fluid samples were collected with sterile swabs from the ectocervix, endocervix, and vaginal walls of HTLV-1-infected women at the HTLV Center in Salvador, Brazil. HPV diagnosis was performed by polymerase chain reaction (PCR) using primers to amplify a DNA fragment from the L1 region of the viral genome. In the subtyping analysis, the nucleotide sequences obtained in the amplifications were verified by genomic homology with already known HPV sequences in the PaVE (Papillomavirus Episteme) platform database of the NIH (National Institutes of Health). **Results:** Thirty-five HTLV-1-infected women, with a median age of 42 years (26 of 56 years), were studied. HPV infection was detected in 19 women (54.3%). Subtypes 53 and 70 (probably high oncogenic risk) were detected in 47% of women, whereas subtypes 31 and 58, which are high risk, were detected in 16% of women. Subtypes 6, 61, and 72, considered low risk, were detected in 37% of women. One infected patient was found to have a low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL) (5.27%).

Conclusion: More than half of the women infected with HTLV-1 had some HPV subtype, with the majority at probable or actual high risk for cervical cancer.

Keywords: HTLV-1; HPV; coinfection, cervical cancer.

Funding Agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (Fapesb), Fundação Nacional de Desenvolvimento do Ensino Superior Particular (Funadesp).

APÊNDICE C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE):**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE**

Prezada Senhora,

Eu, Adenilda Lima Lopes Martins, Coordenadora do Projeto de Pesquisa “Associação entre infecção pelo HTLV-1 e disfunção sexual em mulheres”, convido você a participar de nosso projeto e pretendo lhe explicar com clareza esta pesquisa. Caso você concorde em participar, este documento servirá como comprovante que sua aceitação foi de livre vontade. Esta pesquisa investigará a ocorrência da infecção pelo HTLV-1 e disfunção sexual em mulheres de 20 a 50 anos de idade. Verificará as possíveis relações entre idade, cor da pele autorreferida, religião, estado civil, procedência, profissão/ocupação, nível educacional, faixa de renda em salários mínimos, diagnóstico médico e tempo de doença. Investigará também questões relacionadas a sexualidade. A participação consistirá em responder um formulário elaborado para esse trabalho. Esse formulário possui algumas perguntas que poderão causar constrangimento, você pode não respondê-las, se assim o desejar. Gostaria de deixar bem claro, que as informações serão tratadas com segredo e o formulário será aplicado por mim, médica ginecologista, com especialização em sexualidade, em local reservado para esse fim na Unidade. Você poderá desistir de participar da pesquisa em qualquer momento, sem necessidade de explicar a sua desistência, bem como poderá pedir informações sobre a pesquisa se assim julgar necessário. Além disso, será realizado um exame ginecológico: Após deitar na mesa ginecológica, será colocado um espéculo (conhecido também como bico de pato) na vagina para depois colher material para o exame preventivo. Vamos colocar também um pequeno tampão vaginal (absorvente interno) que será deixado na vagina por 3 minutos. Este tampão será utilizado para estudar as citocinas (secretados pelo sistema imunológico) e as células. Nestes exames vamos avaliar se existe secar da vagina, ou inflamação que provoquem dor ou outra dificuldade na relação sexual. As mulheres que apresentarem secar vaginal farão exame de sangue para avaliar os níveis de hormônios. Estes exames não são dolorosos, mas podem causar um pequeno desconforto passageiro. Os resultados desse trabalho poderão contribuir para a prevenção, detecção e tratamento mais adequado para a disfunção sexual e as comorbidades (outras alterações) encontradas e serão divulgados em congressos e revistas científicas, sendo que a sua identidade jamais será revelada, pois as informações coletadas nos formulários ficarão guardadas por cinco (05) anos, sob minha responsabilidade e depois serão queimados.

Estaremos à disposição a qualquer momento para informar os resultados dessa pesquisa, no endereço abaixo citado. Foram elaboradas duas (02) cópias desse documento, sendo que uma (01) dessas cópias ficará com a senhora, onde consta o nome completo do pesquisador responsável, seu endereço e telefone, para que possa ser consultado sobre qualquer dúvida ou problema referente à pesquisa. Caso queira participar deste estudo, deverá assinar ou colocar a sua impressão digital após a leitura e concordância com os termos desse documento.

Salvador, _____ de _____

Adenilda Lima Lopes Martins (Coordenadora do Projeto)

Telefone: 71-3276-8265

Nome _____

Assinatura _____

APÊNDICE D - Questionário Geral

RESPONSÁVEL PELO PREENCHIMENTO: _____		
DATA: ____/____/____	HORA: ____: ____	REGISTRO GERAL: _____
CARTÃO SUS: _____	REGISTRO CHTLV: _____	
NOME: _____		
NATURALIDADE: _____	NASCIMENTO: ____/____/____	IDADE: ____ anos
FILIAÇÃO: _____ e _____		
ENDEREÇO: _____		
BAIRRO: _____	CIDADE: _____	ESTADO: _____
CEP: _____	TEL. RESID.: _____	TEL. RECADOS: _____
TEL. CELULAR: _____	TEL. COMERCIAL: _____	

OUTROS DADOS

Data de Sorologia ____/____/____

Peso _____ Altura _____

Pressão Arterial _____ IMC _____

PARIDADE

Nº de Gestações: _____

Nº de Partos: _____

Tipo de Parto: _____

Nº de Abortos: _____

SOROLOGIA PARA HTLV:

☐ HTLV-1

☐ HTLV-1/2

☐ HTLV-2

☐ Controle Negativo

RELIGIÃO:

☐ Católica

☐ Testemunha de Jeová

☐ Espirita

☐ Matriz Africana

☐ Protestante (Evangélica/Batista)

☐ Sem Religião

COR (AUTORREFERIDA):

☐ Branco (a)

☐ Amarelo(a)

☐ Pardo (a)

☐ Indígena

☐ Negro (a)

☐ Sem Informação

ESTADO CIVIL:

☐ Solteiro (a)

☐ Separado(a) ou Divorciado (a)

☐ Casado (a)

☐ União Estável

☐ Viúvo (a)

☐ Sem Informação

ESCOLARIDADE:

☐ Analfabeto (a)

☐ Sabe ler e escrever

☐ 1º Grau

☐ Incompleto

☐ Completo

☐ 2º Grau

☐ Incompleto

☐ Completo

☐ Ensino Superior

☐ Incompleto

☐ Completo

☐ Sem Informação Anos de estudo: _____

PROFISSIONAL:

Profissão: _____ ☐ Sem Informação

Ocupação atual: _____ ☐ Sem Informação

RENDA FAMILIAR:

☐ Nenhuma

☐ Menor que um salário mínimo

Valor: _____

☐ Igual a um salário mínimo

☐ Entre um e três salário mínimo

☐ Entre três e seis salário mínimo

☐ Acima de seis salários mínimos

☐ Sem Informação

DADOS EPIDEMIOLÓGICOS:

Hemotransfusão:

☐ Sim

Ano: _____

☐ Não

☐ Sem
Informação

Uso de Bebida Alcoólica:

☐ Sim

Frequência: _____

☐ Não

☐ Sem
Informação

Uso de Tabaco:

☐ Sim

Frequência: _____

☐ Não

☐ Sem
Informação

Uso de Drogas e Entorpecentes:

☐ Sim

Frequência: _____

☐ Não

☐ Sem
Informação

Comorbidades:

☐ Sim

☐ Não

☐ Sem
Informação

Se sim:

☐ Diabetes Melitus

☐ Depressão

☐ Antecedente de Tuberculose

☐ Outras: _____

DST:

☐ HIV

☐ HCV

☐ HBV

☐ HAV

☐ Outras

☐ Sífilis

DST: _____

☐ Nenhuma

Uso de Preservativo:

☐ Sempre

☐ Ocasionalmente

☐ Raramente

☐ Nunca

Número de parceiros sexuais na vida:

☐ < 5

☐ 5 - 10

☐ 10 - 20

☐ > 20

DADOS CLÍNICOS/EXAMES:

Sintomatologia:

2002: _____

2009: _____

2003: _____

2010: _____

2004: _____

2011: _____

2005: _____

2012: _____

2006: _____

2013: _____

2007: _____

2014: _____

2008: _____

2015: _____

Tempo de Doença: _____

☐ Sem Informação**Escalas - HAM/TSP**

Osame: _____

Kurtzke: _____

EPE: _____

Líquor: ☐ Não☐ Sim

Origem do Líquor: _____

Carga Proviral: ☐ Não☐ Sim

Valor: _____

Vitamina B12: ☐ Não☐ Sim

Valor: _____

Ressonância:

Crânio:

☐ Não☐ Sim

Cervical:

☐ Não☐ Sim

Torácica:

☐ Não☐ Sim

Lombar:

☐ Não☐ Sim**Urologia:****Alterações Urinárias:**☐ Não☐ Sim

Qual:

☐ Sem
Informação**Incontinência:** ☐ Não☐ Sim☐ Sem Informação

Se sim, qual tipo:

☐ Urge☐ Mista☐ Por Esforço**Urodinâmica:** ☐ Não☐ Sim

Quais as alterações:

☐ Sem
Informação**Dermatologia:****Alterações****Dermatológicas:**☐ Não☐ Sim

Qual:

☐ Sem
Informação**Oftalmologia:****Alterações Oftalmológicas:** ☐ Não☐ Sim

Qual:

☐ Sem
Informação

APÊNDICE E - Ficha de Consulta (Ginecologia e Obstetrícia)**FICHA DE CONSULTA**
GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA

NOME: _____ DATA: ____/____/____
REGISTRO HLTV: _____

ANAMNESE

QP:
HMA:
Histórico Menstrual:

Menarca: _____ Data da Última Menstruação: ____/____/____

VOCÊ TEVE PROBLEMAS GINECOLÓGICOS?

☐ Sim ☐ Não Qual? _____

HISTÓRIA SEXUAL**SOROLOGIA PARA HTLV:**

☐ Positivo
☐ Indeterminado
☐ Controle Negativo

ESTADO CIVIL:

☐ Solteira ☐ Casada ☐ Viúva ☐ Divorciada ☐ Outros

O (A) PARCEIRO (A) FOI TESTADO (A)?

☐ Sim ☐ Não Resultado _____

QUAL O Nº DE HOMENS COM OS QUAIS TEVE RELACIONAMENTO SEXUAL?

Número _____ Última Relação: ____/____

QUAL O Nº DE MULHERES COM AS QUAIS TEVE RELACIONAMENTO SEXUAL?

Número _____

O PRIMEIRO CONTATO SEXUAL COM ALGUM DESSES (AS) PARCEIROS (AS) FOI APÓS A SUA ÚLTIMA ENTREVISTA?

☐ Sim ☐ Não

COM QUE FREQUÊNCIA VOCÊ USA OU SEU PARCEIRO (A) USA PRESERVATIVO NAS RELAÇÕES SEXUAIS?

☐ Nunca ☐ Raramente ☐ Às Vezes ☐ Quase Sempre ☐ Sempre

ALGUM(A) DOS(AS) SEUS (SUAS) PARCEIROS (AS) PODE TER SIDO EXPOSTO AO VÍRUS HTLV?

☐ Uso de drogas
injetáveis ☐ Múltiplos parceiros sexuais
☐ Não Sabe ☐ Amamentação por mãe infectada
☐ Recebeu transfusão de sangue Outro _____

SEU PAI E/OU SUA MÃE POSSUEM SOROLOGIA POSITIVA PARA HTLV?

☐ Pai ☐ Mãe ☐ Ambos ☐ Nenhum

MÉTODOS CONTRACEPTIVOS

☐ Oral ☐ Injetável ☐ Implante ☐ DIU ☐ Adesivo ☐ Anel

USO DE OUTROS HORMÔNIOS

☐ Oral
☐ Implante
☐ Transdérmico

OUTRAS MEDICAÇÕES UTILIZADAS

Qual(is)? _____

OBSTETRÍCIA E LACTAÇÃO

Nº de Gestações:

Nº de Partos:

Nº de Abortos:

VIA DE PARTO

☐ PSNV ☐ Cirúrgico

LACTANTE

☐ Sim ☐ Não Tempo _____

EXAMES COMPLEMENTARES

FSH:

VDRL:

COLEST. TOTAL:

HEMÁCIAS:

LH:

TOXOPLA. IgM:

HDL:

HEMOGLOBINA:

ESTRADIOL:

TOXOPLA. IgG:

LDL:

LEUCÓCITOS:

TSH:

RUBÉOLA IgM:

VLDL:

PLAQ:

T3: T4:

RUBÉOLA IgG:

SUMÁRIO: _____

B12:

UREIA:

T4 LIVRE:

CREATININA:

PARASITOLÓGICO: _____

ANTI-HBs:

TGO:

ANTI-HCV:

TGP:

ANTI-AgHBs:

GLICEMIA:

INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

 Profissional / Carimbo

ANEXOS

ANEXO A - Parecer consubstanciado do CEP:

Página 01 de 04



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Associação entre infecção pelo HTLV-1 e disfunção sexual em mulheres

Pesquisador: Bernardo Galvão Castro Filho

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 33098414.4.0000.5544

Instituição Proponente: Fundação Bahiana para Desenvolvimento das Ciências

Patrocinador Principal: Fundação Bahiana para Desenvolvimento das Ciências - FUNDECI

DADOS DO PARECER

Número do Parecer:

803.974

Data da Relatoria:

27/08/2014

Apresentação do Projeto:

O Vírus Linfotrófico Humano de Células T do tipo 1 (HTLV-1) infecta cerca de 15 a 20 milhões de pessoas em todo o mundo. No Brasil, Salvador é a cidade que apresenta a maior prevalência desta infecção, atingindo cerca de 9% das mulheres acima de 50 anos. A transmissão sexual é uma das principais vias de transmissão do vírus. O HTLV-1 é o agente etiológico da leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL), da mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP), da uveíte associada ao HTLV-1 (HAU) e da dermatite infecciosa (DIH). Existem relatos de uma associação entre Síndrome de Sjögren/Ceratoconjuntivite seca infecção pelo HTLV-1. Além disso, disfunção Erétil (DE) está amplamente relatada em portadores de HTLV-1, porém em mulheres infectadas pelo HTLV-1, não existem estudos sobre disfunção sexual (DS), ou a prevalência de vagina seca.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

1) Determinar a associação entre infecção pelo HTLV-1 e disfunção sexual em mulheres.

Objetivo Secundário:



ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA / FUNDAÇÃO BAHIANA



Página 02 de 04

- 1) Determinar a prevalência e os tipos de disfunção sexual;
- 2) Determinar a carga proviral, citocinas pró-inflamatórias e microflora na secreção vaginal;
- 3) Estudar o perfil clínico e laboratorial na DS e o papel da infecção pelo HTLV nesse fenômeno.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Segundo o Pesquisador Responsável não haverá riscos determinados pois as entrevistas e exames serão feitos por profissional médico com especialidade na área da pesquisa.

Benefícios:

Apontam os benefícios diretos relacionados ao diagnóstico e acompanhamento dos casos positivos e orientações a todas as participantes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Será realizado estudo observacional - transversal descritivo e analítico, cuja variável desfecho é a Disfunção Sexual e a exposição ter ou não diagnóstico de HTLV-1.

Critérios de inclusão:

Diagnóstico de HTLV-1, idade entre 20 e 50 anos; Vida sexual ativa nas últimas quatro semanas; Concordem em participar do estudo e assinem o TCLE.

Critérios de Exclusão: Pacientes em uso de drogas que sabidamente causam DS; Pacientes submetidas a cirurgias mutiladoras em vagina e ovário; Pacientes submetidos à radiação para tratamento de câncer; Pacientes climatéricas.

Local do estudo e população: As pacientes serão atendidas no Centro Integrativo e Multidisciplinar de Atendimento ao Portador de HTLV (CHTLV) do Ambulatório Docente Assistencial (ADAB) da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP).

O ambulatório possui uma equipe multidisciplinar formada por médicos, psicólogos, fisioterapeutas, urologistas, neurologistas, enfermeiros e técnicos, sob a coordenação do pesquisador Prof. Dr. Bernardo Galvão. As pacientes de controle serão atendidas no ambulatório de Ginecologia do ADAB, que atende aproximadamente 400 mulheres por mês distribuídas em 10 turnos por semana. Neste caso o número de participantes estimado será de 103 mulheres com diagnóstico de HTLV-1, após correções. Serão selecionadas igualmente 103 mulheres não infectadas (controles) no ambulatório de Ginecologia do ADAB. Após convite para participar do estudo, as pacientes assinarão o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Será aplicado um questionário para coleta de dados sócio demográficos. A disfunção sexual será avaliada mediante a aplicação, pela pesquisadora,



ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA / FUNDAÇÃO BAHIANA



Página 03 de 04

do questionário Female Sexual Function Index (FSFI), validado no Brasil. O FSFI contém 19 itens que avaliam 6 domínios: desejo sexual, excitação sexual, lubrificação vaginal, orgasmo, satisfação sexual e dispareunia nas últimas quatro semanas. O padrão de resposta recebe pontuação de crescente de 0 a 5 (exceto nas questões sobre dor). O escore total é a soma de cada domínio multiplicado por um fator que homogeneiza a influência de cada um destes domínios. Valores 26 indicam disfunção sexual

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de rosto: totalmente preenchida;

Cronograma: adequado;

Orçamento: adequado informando que a EBMSP será a financiadora;

TCLE: adequado;

Declaração de concordância da instituição: anexada.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sanadas as pendências anteriormente assinaladas no parecer consubstanciado datado de 11.08.2014 o projeto garante o atendimento aos princípios básicos da bioética para pesquisa com seres humanos preconizados pela Res. 466/12 do CNS: autonomia dos participantes, equidade, beneficência e não maleficência.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Atenção: o não cumprimento à Res. 466/12 do CNS abaixo transcrita implicará na impossibilidade de avaliação de novos projetos deste pesquisador. Tendo sido sanadas as pendências anteriormente assinaladas e, estando de acordo com a Res. 466/12 do CNS o projeto encontra-se exequível.

XI ¿ DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL

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

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

c) desenvolver o projeto conforme delineado;



ESCOLA BAHIANA DE
MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA /
FUNDAÇÃO BAHIANA



Página 04 de 04

- d) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final;
- e) apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento;
- f) manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa;
- g) encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto; e
- h) justificar fundamentadamente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados

SALVADOR, 24 de Setembro de 2014

Assinado por:
Roseny Ferreira
(Coordenador)