

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA

**PERFIL DOS BIOMARCADORES PLASMÁTICOS DE
MORBIDADE NA MIELOPATIA ASSOCIADA AO HTLV-
1/PARAPRESIA ESPÁSTICA TROPICAL (HAM/TSP)**

ANA LÚCIA BORGES STARLING

Belo Horizonte

2016

ANA LÚCIA BORGES STARLING

**PERFIL DOS BIOMARCADORES PLASMÁTICOS DE
MORBIDADE NA MIELOPATIA ASSOCIADA AO HTLV-
1/PARAPARESIA ESPÁSTICA TROPICAL (HAM/TSP)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Infecologia e Medicina Tropical da Faculdade de
Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais
para obtenção do título de Doutor em Medicina.

Orientador: Prof^a. Denise Utsch Gonçalves.

Coorientador: Prof .Olindo Assis Martins Filho

Belo Horizonte

Faculdade de Medicina da UFMG

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

REITOR: Prof. Jaime Arturo Ramírez

VICE-REITORA: Prof^a. Sandra Regina Goulart Almeida

Pró-Reitoria de Pós-graduação

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO: Prof. Rodrigo Antônio de Paiva Duarte

Pró-Reitoria de Pesquisa

PRÓ-REITOR DE PESQUISA: Prof^a. Adelina Martha dos Reis

FACULDADE DE MEDICINA

DIRETOR: Prof. Tarcizo Afonso Nunes

VICE-DIRETOR: Prof. Humberto José Alves

Centro de Pós-graduação

COORDENADOR: Prof^a. Sandhi Maria Barreto

SUBCOORDENADOR: Prof^a. Ana Cristina Cortes

Departamento de Clínica Médica

CHEFE: Prof. José Carlos Bruno da Silveira

Programa de Pós-graduação em Infectologia e Medicina Tropical

COORDENADOR: Prof. Eduardo Antonio Ferraz Coelho

SUBCOORDENADOR: Prof. Antônio Luiz Pinheiro

COLEGIADO:

Prof. Maria do Carmo Pereira Nunes (Titular)

Prof. Vandack Alencar Nobre Jr (Titular)

Prof. Antônio Luiz Pinho Ribeiro (Titular)

Prof^a. Denise Utsch Gonçalves (Titular)

Prof. Eduardo Antônio Ferraz Coelho (Titular)

Prof. Unaí Tupinambás (Titular)

Pollyana Anício Magalhães Gontijo (Discente Titular)

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos indivíduos infectados pelo HTLV-1 que, com boa-vontade e disposição participaram deste estudo acreditando na evolução da ciência.

AGRADECIMENTOS

A jornada foi longa, mas profícua, por isso tenho muito a agradecer.

Inicialmente aos meus pais que sempre me ensinaram a importância do saber e da ciência para a evolução humana.

Agradeço aos meus queridos filhos Pedro, Matheus e Davi, luzes da minha vida e ao meu esposo Denis pela paciência durante este período.

À Prof^a. Denise Utsch Gonçalves, agradeço profundamente por ter assumido a orientação desta tese tendo-me brindado com seu exemplo, apoio e incentivo constante.

Agradeço ao Prof Olindo Assis Martins Filho pela disponibilidade, discussões enriquecedoras e sólido apoio técnico- logístico na realização e análises dos biomarcadores.

Ao Prof. José Roberto Lambertucci pelos desafios e questionamentos.

A Prof^a Anna Bárbara Carneiro Proietti por mostrar que mesmo nas situações difíceis sempre existem alternativas.

À equipe do GIPH pela oportunidade de participar de um grupo de pesquisa na vanguarda do estudo desta infecção tão negligenciada.

Ao Prof Manoel Otávio pela oportunidade de participar da criação de um ambulatório de referência no atendimento de indivíduos infectados pelo HTLV-1.

À Prof^a. Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis pela participação nas discussões e redação do artigo científico.

Ao Prof Marcelo Antonio Pascoal Xavier pelo incentivo na criação do ambulatório de referência em HTLV e orientação segura no aperfeiçoamento das análises dos dados.

Ao Dr Sílvio Roberto de Sousa Pereira pela parceria na avaliação dos pacientes.

À Doutoranda Ludimila Labanca pela parceria, esforço, dedicação e boa vontade durante todo o trabalho.

À Fundação de amparo e pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo recurso financeiro que permitiu a realização deste projeto.

À Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) – René Rachou – Laboratório de Biomarcadores pelo apoio técnico e Logístico.

"Quando beberes água, pensa na fonte."

Lin Yutang

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar biomarcadores na infecção pelo HTLV-1 que possam indicar a evolução da fase assintomática para mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espática tropical (HAM/TSP) com base no perfil imunológico. Avaliou-se um painel de biomarcadores em 21 amostras de plasma de doadores de sangue e em 87 amostras de plasma de indivíduos infectados pelo HTLV-1, subdivididos em: 27 portadores assintomáticos (AC), 32 possível HAM (pHAM) e 28 HAM/TSP. A análise das curvas cumulativas e das assinaturas moleculares demonstrou que o grupo HAM/TSP apresentou um perfil pró-inflamatório mediado por CXCL10/LTB-4/IL-6/TNF- α /IFN- γ , contrabalançado pelas citocinas regulatórias IL-4/IL-10. O grupo AC apresentou uma rede de correlações pró-inflamatória/regulatória fortemente interconectada, com IL-4/IL-10 desempenhando um papel central. Assim, delineou-se uma assinatura imunológica de inflamação controlada que caracterizou o AC e outra de inflamação sem controle imunológico que caracterizou a HAM/TSP. Destacaram-se os biomarcadores IL-6 e CysLT como estratégicos na classificação do perfil imunológico do indivíduo no espectro da doença. Esses resultados permitiram a construção de um algoritmo para discriminar os indivíduos AC dos pHAM/TSP e HAM/TSP com base nos biomarcadores: IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6, IL-4 e CysLT. Com esses resultados, utilizando-se a regressão logística, construiu-se a árvore de decisão que poderá ter valor na predição da evolução de infecção assintomática para mielopatia, sendo muito importante em termos de seguimento dos pacientes e de futuras decisões terapêuticas.

Palavras-chave: HTLV-1, HAM/TSP, quimiocinas, leucotrienos, citocinas.

ABSTRACT

This study aimed at evaluating the biomarkers that may indicate the evolution from the state of asymptomatic carrier (AC) to HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) based on the serum biomarkers of different clinical stages of HTLV-1-infection. A panel of serum biomarkers was evaluated in samples of 21 blood donors and 87 HTLV-1-infected individuals: 27 AC, 32 putative HAM/TSP (pHAM/TSP) and 28 HAM/TSP. The analyses of cumulative curves and molecular signatures pointed out that HAM/TSP presented a pro-inflammatory profile mediated by CXCL10/LTB-4/IL-6/TNF- α /IFN- γ , barely counterbalanced by the regulatory cytokines IL-4/IL-10. The group AC presented a strongly pro-inflammatory/regulatory net, with IL-4/IL-10 playing a central role. Therefore, an immunologic signature of controlled inflammation was characteristic of AC and another of uncontrolled inflammation was typical of HAM/TSP. The biomarkers IL-6 and CysLT were crucial to classify the individual in the spectrum of the disease. These results allowed the construction of an algorithm to discriminate AC, pHAM and HAM/TSP based on the selected biomarkers: IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6, IL-4 and CysLT. Based on the logistic regression, a tree of decision was proposed as a possible strategy to predict the evolution from asymptomatic infection to HAM/TSP, which may be very important in terms of follow-up and future therapeutic decisions.

Keywords: HTLV-1, HAM/TSP, Chemokines, Leukotrienes, Cytokines.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ATL	Leucemia de células T do adulto
BD	<i>Becton Dickinson</i>
BHE	Barreira hematoencefálica
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CC	Subgrupo de quimiocinas em que as cisteínas conservadas são contiguas
CCR	Receptor de quimiocinas do subgrupo CC
CTL	Células T CD8 ⁺ citotóxicas
CXC	Subgrupo de quimiocinas em que as cisteínas conservadas são separadas por algum outro aminoácido(X)
CX3C	Subgrupo quimiocina transmembrana fractalquina
CysLT	Cysteinyl leukotrienes
DeCS -	Descritores em Ciências da Saúde
DI	Dermatite infecciosa
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDSS	Escala de Incapacidade Funcional Ampliada
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FL	Fluorescência
CD3,	<i>Antigen, Gamma Polypeptide</i>
LCK,	<i>Proto-Oncogene, Src Family Tyrosine Kinase</i>
VAV1	<i>Guanine nucleotide exchange factor</i>
GIPH	Grupo Interdisciplinar de Pesquisas em HTLV
HAM/ TSP	Mielopatia associada ao HTLV-1/ Paraparesia espástica tropical
HAU	Uveíte associada ao HTLV-1

HEMOMINAS	Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais
HIV	Vírus da imunodeficiência adquirida
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
HTLV	Vírus linfotrópico de células T humano
IFN-γ	Interferon gama
IL	Interleucina
LASER	<i>Light amplification by stimulated emission of radiation</i>
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LT	Leucotrienos
MeSH	<i>Medical Subject Headings</i>
MIG	<i>Monokine induced by IFNγ</i>
MIP	<i>Macrophage Inflammatory Protein</i>
RANTES	<i>Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility complex</i>
NK	<i>Natural killers</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
SNC	Sistema nervoso central
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
TA	Temperatura ambiente
TGF-β	<i>Transforming growth factor-beta</i>
Th1	Linfócito T <i>helper</i> tipo 1
Th2	Linfócito T <i>helper</i> tipo 2
Treg	Linfócito T regulador
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
WB	<i>Western Blot</i>

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figuras e Quadros

FIGURA 1- Representação esquemática dos mecanismos (1 e 2) que levam ao desenvolvimento de HAM/TSP	21
QUADRO 1- Critérios para os níveis de definição diagnóstica da Mielopatia associada ao HTLV-1/ Paraparesia espástica tropical (HAM/TSP).....	22
QUADRO 2- Citocinas, fonte e atividades.....	25
QUADRO 3- Tipos de receptores em células recrutadas pela ação das diferentes quimiocinas estudadas.....	29

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Descrição dos motivos de exclusão e perdas dos indivíduos do estudo.....	45
TABELA 2- Distribuição de 108 indivíduos subdivididos entre os grupos controle, assintomático, possível HAM/TSP e HAM/TSP em relação às variáveis sociodemográficas gênero e idade.....	46
TABELA 3- Análise comparativa por grupo dois a dois de 108 indivíduos subdivididos entre os grupos controle, assintomático, possível HAM/TSP e HAM/TSP em relação às variáveis sociodemográficas gênero e idade.....	47
TABELA 4- Análise comparativa dois a dois de 108 indivíduos subdivididos entre os grupos controle, assintomático, possível HAM/TSP e HAM/TSP em relação às alterações motoras encontradas.....	47
TABELA 5- Análise comparativa de 108 indivíduos subdivididos entre os grupos controle, assintomático, possível HAM/TSP e HAM/TSP quanto às alterações encontradas na avaliação neurológica.....	48

SUMÁRIO

CONSIDERAÇÕES INICIAIS	14
1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 Infecção pelo HTLV-1.....	17
2.1.1 Histórico e dados epidemiológicos.....	17
2.1.2 Evolução natural da infecção por HTLV-1.....	18
2.1.3 Mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP).....	19
2.1.3.1 Evolução Clínica, patogênese e critérios diagnósticos da HAM/TSP.....	19
2.1.3.2 Citocinas e HTLV-1	22
2.1.3.3 Ação das Quimiocinas.....	27
2.1.3.4 Ação dos Leucotrienos.....	30
3 OBJETIVOS	32
3.1 Geral.....	32
3.2 Específicos.....	32
4 PACIENTES E MÉTODOS	33
4.1 Delineamento.....	33
4.1.1 Hipótese nula a ser testada.....	33
4.2 Seleção dos pacientes.....	33
4.2.1 Critérios de inclusão.....	34
4.2.2 Critérios de exclusão.....	34
4.3 Tamanho da amostra.....	34
4.4 Fluxograma.....	35
4.5 Procedimentos, local da pesquisa.....	37
4.5.1 Amostras de sangue.....	38
4.5.1.1 Riscos.....	38
4.5.2 Detecção do nível de citocinas plasmáticas por citometria de fluxo.....	38
4.5.3 Detecção do nível de quimiocinas plasmáticas por citometria de fluxo.....	40
4.5.4 Quantificação de mediadores lipídicos no plasma e sobrenadante de cultura de células.....	41

4.6 Parâmetros avaliados.....	42
4.7 Análise estatística.....	42
4.7.1 Estatísticas descritivas.....	42
4.7.1.1 Comparação dos grupos.....	42
4.7.1.2 Análise da assinatura dos Biomarcadores.....	43
4.7.1.3 Análise das correlações dos Biomarcadores.....	43
4.8 Análise de dados.....	44
5 RESULTADOS.....	46
5.1 Estatísticas descritivas gerais.....	46
5.2 Dados epidemiológicos.....	47
5.3 Dados clínicos.....	48
5.5 Artigo: Dados relacionados aos Biomarcadores	50
6 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	62
6.1 Amostra populacional.....	62
6.2 Características epidemiológicas.....	62
6.3 Características clínicas.....	63
7 CONCLUSÕES.....	63
8 PROPOSIÇÕES.....	63
9 CONSIDERAÇÃO FINAL.....	64
REFERÊNCIAS.....	66
ANEXOS E APÊNDICES.....	76

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O trabalho atual é uma ampliação do trabalho de mestrado da aluna na linha de pesquisa do HTLV-1 denominado - **AVALIAÇÃO DE INDICADORES DA PROGRESSÃO DA INFECÇÃO PELO HTLV 1 ATRAVÉS DO ESTUDO DO PERFIL DE CITOCINAS PLASMÁTICAS E DA DOSAGEM DA CARGA PROVIRAL** este primeiro foi executado de março de 2008 a fevereiro de 2010, com aprovação pelo COEP – parecer nº ETIC090/07- 23 maio 2007, CEP Hemominas - Ofício nº83/2007 – 06 novembro 2007, sendo contemplado pelo Edital Universal da Fapemig nº01/07 contratado em 14 de novembro de 2007 – 184 – APQ - 2064-4.01/07- Denise Utsch Gonçalves UFMG, com verba para a aquisição dos Kits CBA para dosagem das citocinas e quimiocinas plasmáticas.

Os resultados foram apresentados de forma parcial na XVII Semana de Iniciação Científica da UFMG, em 2008, no Congresso Internacional sobre HTLV-1, em 2009. Os resultados finais foram apresentados no I Simpósio Paulista de HTLV – XII / Reunião do Serviço de HTLV – 2 Workshop Brasileiro da Sociedade Panamericana de neurovirologia, em 2010. A apresentação da dissertação foi realizada em Fevereiro de 2011.

O artigo científico *Proviral load and the balance of serum cytokines in HTLV-1-asymptomatic infection and in HTLV-1-associated myelopathy/tropicalspastic paraparesis (HAM/TSP)*. Acta Trop. 2013 Jan; 125(1): 75-81. foi publicado pela Revista Acta Tropica em janeiro de 2013.

Para o doutorado ampliou-se a avaliação da resposta imunológica dos pacientes infectados pelo HTLV-1. A soroteca referente ao estudo de mestrado foi utilizada para a dosagem dos novos biomarcadores propostos no estudo de Doutorado. Dosaram-se os marcadores lipídicos - leucotrienos LTB₄, CysLT e as quimiocinas (CXCL8/IL-8, CXCL9/MIG CXCL10/IP-10, CCL5/RANTES, CCL2/MCP-1,) no soro dos pacientes infectados pelo HTLV-1 e grupo controle que participaram do estudo anterior. As citocinas (IFN-gama, TNF-alfa, IL-6, IL-4, IL-10) e a carga proviral haviam sido previamente dosadas.

Realizaram-se as análises das assinaturas destes biomarcadores, suas correlações através da rede de biomarcadores séricos. Aplicou-se o modelo de regressão logística ordinal

esteriotipada para estabelecer a interrelação entre adoecimento pelo HTLV-1 e mudanças nos biomarcadores séricos

Minha participação nesse trabalho consistiu na revisão da literatura, avaliação clínica dos pacientes e aplicação dos questionários, auxílio na análise laboratorial das citocinas e quimiocinas e na análise estatística. Os resultados foram amplamente discutidos com o grupo de pesquisadores e membros do GIPH envolvidos no projeto. A escrita do artigo científico foi feita por mim juntamente com os pesquisadores envolvidos no projeto.

A importância do presente estudo está na ampliação dos marcadores imunológicos testados, que permitiram uma análise comparativa dos padrões de resposta imunológica ao HTLV-1 nos diferentes grupos de indivíduos infectados.

Os resultados parciais foram apresentados no ***16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses, Montreal, Junho /2013***. Os membros da banca julgadora dos temas livres apresentados no referido congresso sugeriram a reavaliação dos indivíduos da pesquisa do ponto de vista clínico e laboratorial e comparação com os resultados encontrados na primeira análise com o objetivo de identificar possíveis evoluções da infecção.

Como produto do presente trabalho, apresento o artigo ***Immunological signature of the different clinical stages of the HTLV-1 infection: establishing serum biomarkers for HTLV-1-associated disease morbidity***, publicado no periódico Biomarkers ISSN: 1354-750X, 2015; 20(6-7): 502-12

1. INTRODUÇÃO

O vírus linfotrópico de células T humanas é um deltaretrovírus que infecta aproximadamente 10 a 20 milhões de pessoas no mundo (PROIETTI et al. 2015; CARNEIRO-PROIETTI et al., 2002). Além da leucemia de células T do adulto (ATL) (POIESZ et al., 1980) o HTLV-1 está relacionado com a etiologia de doenças inflamatórias como a paraparesia espástica/mielopatia associada ao HTLV-1 (HAM/TSP) (GESSAIN et al., 1985; OSAME et al., 1986), uveíte (MOCHIZUKI et al., 1992), alterações dermatológicas (COELHO-DOS-REIS et al., 2013), dermatite infecciosa (PRIMO et al., 2005; LA GRENADE et al., 1998; NASCIMENTO et al., 2009), podendo estar associada ainda com artropatias, polimiosíte e síndrome de Sjögren (TAYLOR et al., 2005).

Enquanto a maioria dos indivíduos infectados permanece assintomática (AC), as doenças associadas ao HTLV acometem uma minoria, sendo que aproximadamente 3% desenvolvem ATL (TAJIMA et al., 1990) e outros 4% desenvolvem HAM/TSP (OSAME et al., 1986; KAPLAN et al., 1990; NAKAGAWA et al., 1995; HISADA et al., 2004). Em relação às doenças inflamatórias associadas à infecção pelo HTLV-1, inúmeros fatores imunológicos parecem estar envolvidos na interação vírus/hospedeiro influenciando a evolução clínica dos indivíduos da forma assintomática para a HAM/TSP (STARLING et al., 2013).

A HAM/TSP é uma doença neuroinflamatória caracterizada por uma mielopatia crônica e progressiva apresentando infiltrado de células mononucleares na região de desmielinização e distrofia axonal (COOPER et al., 2009). O processo inflamatório crônico causado pelo HTLV-1 é caracterizado pela proliferação espontânea das células T *in vitro* (SIBON D et al., 2006; LUNARDI-ISKANDAR et al. 1993) e pela elevada produção *ex vivo* de IFN- γ e TNF- α pelas PBMC. (BRITO-MELO et al., 2007; CARVALHO et al., 2001). Além disso, IL-2 e as metaloproteinases produzidas pelos linfócitos infectados pelo HTLV-1 são potencialmente inflamatórios podendo danificar o sistema nervoso central (BIDDISON et al., 1997; KUBOTA et al., 2002; MUNIZ et al., 2006). Os monócitos produzem altos níveis de leucotrienos principalmente Cys que também parece estar envolvido na progressão da doença neurológica relacionada ao HTLV (TRINDADE et al., 2012).

Embora o ambiente imunológico pró-inflamatório na HAM/TSP tenha sido bem analisado ao longo dos anos pouco se sabe sobre o valor preditivo dos biomarcadores inflamatórios na distinção entre o estágio assintomático da infecção e o estágio inicial da HAM/TSP.

Considerando tal falta de informação sobre o valor diagnóstico destes marcadores

imunológicos e sua importância na infecção pelo HTLV-1, este estudo visou estabelecer a assinatura imunológica nos diferentes estágios clínicos da infecção pelo HTLV-1, bem como a interação entre essas moléculas nos diferentes estágios clínicos avaliados, com o objetivo final de compreender o poder dessas moléculas como biomarcadores de morbidade da doença.

REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Infecção pelo HTLV-1

2.1.1 Histórico e dados epidemiológicos

Conforme Gallo, no ano de 1979, nos Estados Unidos, foi descrito o primeiro retrovírus humano, o HTLV-1, que foi isolado da linhagem de células T de um paciente com linfoma de células T. No ano seguinte, Poiesz. *et al* relataram pela primeira vez a correlação deste vírus com o linfoma cutâneo de células T, e posteriormente descobriu-se que o retrovírus ATLVI identificado por Hinuma *et al.* 1987 como agente etiológico da leucemia de células T do adulto (ATLL) era idêntico ao HTLV-1. (POIESZ *et al.*, 1980, GALLO, 2005). Segundo Taylor e Matsuoka (2005), estudos posteriores comprovaram a participação do vírus na etiologia da mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP), uveíte associada ao HTLV-1 (HAU), eczema grave da infância - também denominado dermatite infecciosa (DI) e, ainda, possível associação com artropatias, polimiosites e síndrome de Sjögren, entre outras.

A transmissão do HTLV-1 se dá por via vertical (transplacentária, durante o parto e pela amamentação) (MORIUCHI, *et al.* 2013), horizontal (relação sexual) (TAJIMA, *et al.* 1982) e parenteral (transfusão de sangue e hemoderivados contaminados e uso de drogas injetáveis) (OKOCHI, *et al.* 1984, PROIETTI, *et al.* 2005).

Estima-se que 10 a 20 milhões de pessoas no mundo estejam infectadas pelo HTLV-1 (GESSAIN, CASSAR, 2012; PROIETTI *et al.*, 2015; CARNEIRO-PROIETTI *et al.*, 2002). Estudos preconizam que a África seja o reservatório primário desse retrovírus, sendo, o mesmo, endêmico em diversas partes do mundo, em especial no Japão, Caribe, América Central e do Sul, África Equatorial, Oriente Médio e Melanésia (GALLO, 1986, GESSAIN, CASSAR, 2012).

No Brasil, estudos de prevalência confirmam a presença do HTLV-1 em todo o país, sendo o HTLV-1 descrito pela primeira vez em 1989, em comunidade japonesa de Campo Grande-

MS. Entre doadores de sangue provenientes das diferentes regiões do país, a prevalência é variável, sendo de 0,08% no Norte e no Sul do país (Manaus e Florianópolis); 0,33% no Nordeste e no Sudeste (Recife e Rio de Janeiro) e 1,35% em Salvador (CATALAN-SOARES; PROIETTI; CARNEIRO-PROIETTI, 2001; SANTOS; LIMA, 2005).

Em Minas Gerais, a Fundação Hemominas coordena o Grupo Interdisciplinar de Pesquisas em HTLV (GIPH), uma coorte aberta iniciada em Março de 1997 e hoje composta por 570 doadores (classificados entre indivíduos com sorologia positiva para o HTLV-1/2 (n=333, 58,4%), com sorologia indeterminada (237, 41,6%), seus familiares com sorologia positiva ou indeterminada para o HTLV 1/2 (n=97) e um grupo-controle constituído por doadores soronegativos (n=166) (ALLAIN *et al.*, 2009). O estudo do GIPH é, atualmente, referência mundial dentre as coortes que avaliam a história natural da infecção pelo HTLV1/2.

Proietti (2015) informa que, no Brasil, a soroprevalência média encontrada entre doadores aptos à doação é cerca de 20 a 100 vezes mais alta do que a relatada para os Estados Unidos e Europa. Esse fato, aliado à extensão territorial e ao tamanho da população, indica que o Brasil abriga o maior número absoluto de indivíduos soropositivos para HTLV-1 entre todos os países endêmicos. Portanto, tem-se na infecção pelo HTLV-1, um problema de saúde pública (PROIETTI *et al.*, 2015).

2.1.2 Evolução natural da infecção por HTLV-1

A história natural da infecção pelo HTLV-1 não está completamente elucidada, principalmente porque o tempo decorrido entre a exposição/infecção e o início de sintomatologia é muito longo (BORDUCCHI, KERBAUY, OLIVEIRA, 1999). Conforme Martin, F; Taylor; G P; Jacobson, S.J. (2014), aproximadamente 95% dos indivíduos infectados permanecem assintomáticos. Segundo Yamano *et al.* (2002), 0,25 a 3% dos indivíduos desenvolverão mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP) e outros 2 a 6% desenvolverão leucemia de células T do adulto (ATL).

Estudos mostram que a HAM/TSP predomina três vezes mais em indivíduos do gênero feminino na faixa etária de 40 a 50 anos (LEVIN, JACOBSON, 1997).

Sabe-se que diferentes fatores estão envolvidos na interação vírus/hospedeiro e o modo como essa interação se desenvolve determinará o estado do portador como indivíduo assintomático, paciente sofrendo de doença hematológica (ATL) ou inflamatória (HAM/TSP, uveíte, artrite, reumatóide, etc.) (PROIETTI *et al.*, 2015).

Acredita-se que fatores próprios do hospedeiro, incluindo o sistema HLA, devem ser importantes para determinar as manifestações da infecção (JEFFERY *et al.*, 1999, VINE *et al.*, 2002). Rodrigues *et al.* (2014) mostraram que o HTLV-1 causa modificações significativas nas células mesenquimais que apresentam propriedades importantes no processo de imunomodulação, pois proporcionam o equilíbrio da resposta imune ao adquirir perfil inflamatório ou antiinflamatório conforme o estímulo recebido. Observou-se que indivíduos que desenvolvem leucemia de células T do adulto (ATL) apresentam baixo nível de resposta imune, enquanto os com HAM/TSP demonstram resposta intensa aos antígenos do HTLV-1 (MANNIS; HISADA; GRENADE, 1999).

Os indivíduos com HAM/TSP apresentam altos níveis de expressão de Tax (fosfolipoproteína viral essencial para replicação viral e transformação celular, induz o aumento da secreção de várias citocinas) baixos níveis de lise de linfócitos T citotóxicos, presença de células T CD8+ específicas anti-Tax secretora de IL-2 e células T CD4+ específicas anti-Tax secretora de IFN- γ , além de níveis aumentados de IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-6, CXCL10 e CXCL9 no sangue e líquor (PROIETTI *et al.*, 2015; MARTIN, TAYLOR; JACOBSON, 2014). Apesar de diversos aspectos dos eventos que conduzem ao desenvolvimento das doenças associadas ao HTLV-1 não estarem esclarecidos, a resposta imune do hospedeiro frente à infecção viral, principalmente à resposta celular desencadeada por células T CD8+ específicas anti-HTLV, é reconhecida como um evento crucial, determinando o rumo da infecção (BANGHAM; OSAME, 2005). Estudos recentes têm sugerido que essa resposta celular é influenciada pela via de infecção do hospedeiro (mucosa ou sangue periférico), além de fatores genéticos individuais, como polimorfismos de genes HLA e genes envolvidos na resposta imune (JEFFERY *et al.*, 1999; VINE *et al.*, 2002; PROIETTI *et al.*, 2015).

2.1.3 Mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP)

2.1.3.1 Evolução Clínica, patogênese e critérios diagnósticos da HAM/TSP

HAM/TSP é caracterizada por uma atrofia na região torácica da medula espinhal envolvendo desmielinização perivascular e degeneração axonal, acompanhado de uma resposta inflamatória na região afetada e por infiltrado de células mononucleares, destruição de fibras nervosas no foco inflamatório levando à perda da capacidade motora-sensorial

(AKIZUKI et al, 1987). É uma doença lentamente progressiva e de baixa letalidade. O quadro clínico é de início insidioso, o que leva, muitas vezes, ao diagnóstico tardio da doença. Consiste em diminuição gradual da força muscular dos membros inferiores, associada à dor lombar e queixas sensitivas leves do tipo parestesia nas pernas e pés. Subsequentemente, surgem queixas autonômicas tipo urgência miccional, incontinência ou retenção urinária, constipação intestinal, diminuição da libido e da potência sexual. Observou-se que a evolução neurológica não é uniforme ao longo do tempo, ocorrendo predominantemente durante o primeiro e segundo anos da doença, tornando-se relativamente estável nos anos subsequentes (MATSUZAKI *et al.*, 2001; PROIETTI *et al.*, 2015).

Os principais sinais e sintomas de apresentação da doença são os distúrbios da marcha, fraqueza, dor lombar baixa, enrijecimento dos membros inferiores, hiperreflexia e o comprometimento do equilíbrio dinâmico, sendo frequente o relato de disestesias e parestesias (dormência, formigamentos) ao longo dos membros inferiores, predominantemente distais (MANNIS; HISADA; LA GRENADE, 1999). A disfunção vesical é comum em pacientes com HAM/TSP e representa importante causa de morbidade. A época de início dos sintomas é variável, mas normalmente ocorrem paralelamente às alterações motoras ou mais tardiamente. Frequentemente, pacientes apresentam como primeiro sintoma da doença disfunção sexual e do trato urinário (VERDONCK, 2007)

Embora a patogênese da HAM/TSP não se encontre claramente definida, ela é considerada uma doença inflamatória crônica na qual as células T CD4+ e T CD8+ desempenham um papel central. Estudos relacionados a HAM/TSP demonstraram a presença de infiltrado de células T CD4+ e T CD8+ no sistema nervoso central e aumento da produção de citocinas tais como INF- γ , TNF- α e IL 6 no sangue periférico o que sugere serem estes importantes mediadores da patologia da HAM/TSP. (LAIRMORE et al., 2012; MORGAN, 2011; ROMANELLI et al., 2010; OLIÉRE et al., 2011; QUARESMA et al., 2015).

Sabe-se que o organismo responde com mecanismos múltiplos da resposta imune celular e humoral sendo a HAM/TSP considerada uma síndrome de estado hiperimune, no qual ambas as imunidades celular e humoral estão exacerbadas. Estudos sugerem a existência do mecanismo de dano indireto no qual linfócitos T CD4+ e T CD8+ específicos anti Tax (capacitados pela própria Tax) migrariam para o interior do SNC onde sua interação promoveria a produção de citocinas inflamação e destruição tecidual. A Tax capacita as células infectadas a transpor a barreira hemato encefálica sendo também o principal alvo da resposta imune celular.

Em estudo recente, Pinto et al. (2015) sugerem que a proteína *Tax*, em indivíduos com HAM/TSP, pode levar a expressão dos genes CD3, LCK, e VAV1 nas células T CD4+ e a função dos mesmos de forma sincronizada com a ativação celular, o que levaria a exacerbação da resposta imunológica. O segundo mecanismo é o da autoimunidade no qual anticorpos reagiriam de forma cruzada com as células no SNC, imunoglobulinas G isoladas de pacientes portadores de HAM/TSP identificaram a ribonucleoproteína hnRNP-A1, em células Betz TAYLOR 1998; YAMANO et al 2002; Lee e colaboradores, em 2006, corroboraram este resultado demonstrando que os anticorpos que reagiram cruzadamente com hnRNP-A1 foram IgG específicos para Tax de HTLV-1, impedindo o disparo do estímulo nervoso nas células afetadas (Figura-1).

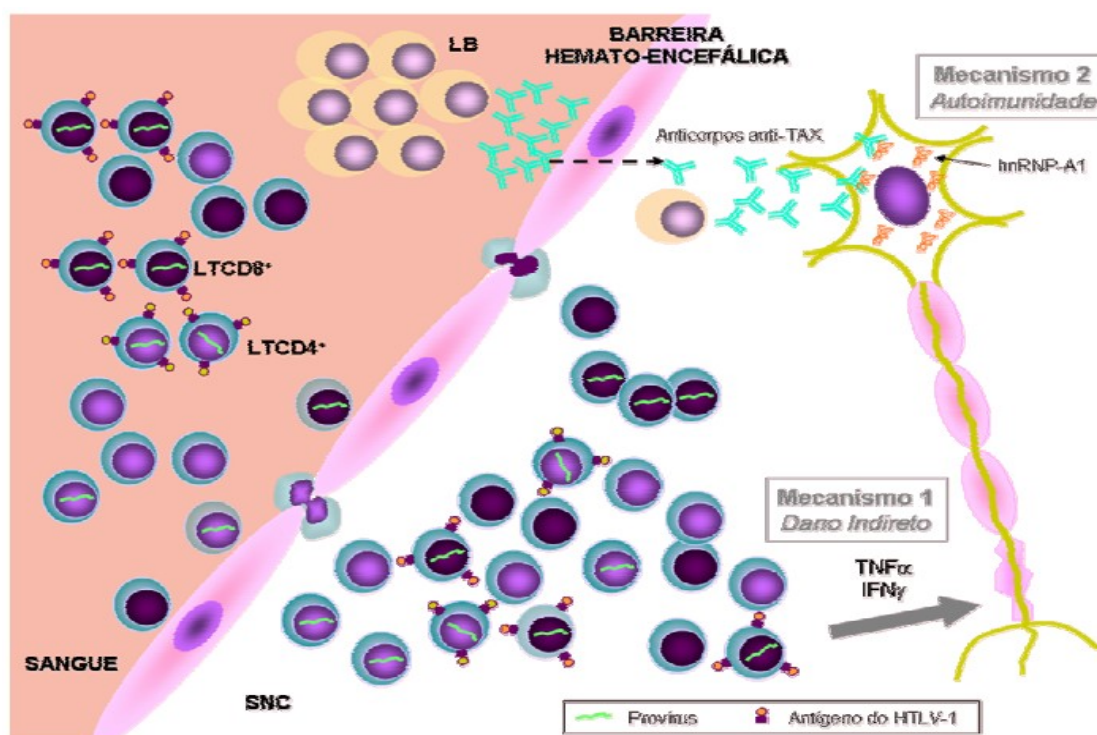


FIGURA 1 Representação esquemática dos mecanismos (1 e 2) que levam ao desenvolvimento de HAM/TSP. LB – Linfócitos B LTCD4 – Linfócitos T CD4 (helper) LTCD8 – T CD8 (citotóxicos). Adaptado de Osame, 2002.

Criterios diagnósticos da HAM/TSP

CASTRO COSTA *et al.*, (2006) elaboraram proposta de um modelo modificado para o diagnóstico e classificação da HAM/TSP baseado em uma revisão da literatura sobre o assunto e nos critérios propostos pela OMS. Os resultados deste estudo encontram-se resumidos na Figura 2.

Quadro 1

Critérios para os níveis de definição diagnóstica da Mielopatia associada ao HTLV-1/ Paraparesia espástica tropical (HAM/TSP)

<p>Definido:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Paraparesia espástica progressiva, não remissiva associada à marcha suficientemente comprometida para ser percebida pelo próprio paciente. Sintomas ou sinais sensitivos podem ou não estar presentes. Quando presentes., permanecem sutis e sem nível sensitivo. Sinais ou sintomas esfínterianos anais e urinários podem ou não estar presentes; 2. Presença de anticorpos anti-HTLV-1 no soro e LCR, confirmados por Western blot e/ou detecção do DNA proviral no sangue e/ou LCR; 3. Exclusão de outras condições que se assemelham à HAM/TSP.
<p>Provável:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Apresentação monossintomática: espasticidade ou hiperreflexia dos membros inferiores ou sinal de babinski com ou sem sinais sensitivos sutis ou bexiga neurogênica isolada confirmada por testes urodinâmicos; 2. Presença de anticorpos anti-HTLV-1 no soro e LCR, confirmados por Western blot e/ou detecção do DNA proviral no sangue e/ou LCR; 3. Exclusão de outras condições que se assemelham à HAM/TSP.
<p>Possível:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Apresentação clínica completa ou incompleta; 2. Presença de anticorpos anti-HTLV-1 no soro e LCR, confirmados por Western blot e/ou detecção do DNA proviral no sangue e/ou LCR; 3. Não exclusão de outras condições que se assemelham à HAM/TSP.

CASTRO COSTA *et al.*, (2006)

2.1.3.2 Citocinas e HTLV-1

A imunidade adquirida depende diretamente da resposta específica das células T CD4+ auxiliares ao vírus HTLV -1, estas células estão envolvidas na coordenação da resposta imune aos patógenos, através da secreção de citocinas em resposta ao reconhecimento de antígenos (GOON *et al.*, 2003).

As células T CD4⁺ auxiliares podem produzir IL-2 e IFN- γ , que aumentam as funções efetoras das CTLs, e IL-4, IL-5, e IL-10, que promovem a respostas das células B e estimulam a produção de anticorpos. Através da secreção de citocinas, as células T-auxiliares podem ativar as células apresentadoras de antígenos ou realizar a suprarregulação do CD40L na superfície das células, este interage com as células B, estimulando sua proliferação (CELLA *et al.*, 1996; KOCH *et al.*, 1996; SALLUSTO; LANZAVECCHIA, 1994).

Diversas observações já demonstraram a importância da resposta imune ao HTLV-1 efetuada pelas células T CD4 tendo em vista que: a) são o principal subtipo celular infectado pelo HTLV-1 *in vivo* (HANON *et al.*, 2000, RICHARDSON *et al.*, 1990); b) secretam citocinas pró-inflamatórias e neurotóxicas como a TNF- α e IFN- γ (HANON *et al.*, 2001; HIGUCHI *et al.*, 1997; NISHIURA *et al.*, 1996), identificando-se altos níveis dessas citocinas no soro, líquido e lesões medulares de pacientes com HAM/TSP (NAKAMURA *et al.*, 1993; UMEHARA *et al.*, 1994); c) a infecção das células T CD4 pelo HTLV-1 pode prejudicar a função das células T-auxiliares (UMEHARA *et al.*, 1994; YARCHOAN *et al.*, 1986); d) nos pacientes com HAM/TSP apresentando lesões recentes do sistema nervoso central (SNC), um dos tipos predominantes no infiltrado celular deste são células T CD4⁺ (IWASAKI *et al.*, 1992).

Outros trabalhos detectaram mais células T CD4⁺ nas lesões do sistema nervoso central de pacientes com quadro recente de HAM/TSP do que em pacientes com doença de longa duração, nos quais predominam as células T CD8 (UMEHARA *et al.*, 1993).

Goon *et al.* (2002) reportaram, que as células T CD4 HTLV-1 específicas secretoras de IFN- γ TNF- α e IL-2 são significativamente mais frequentes nos pacientes com HAM/TSP de início recente do que nos indivíduos assintomáticos com níveis semelhantes de carga proviral. Essas observações sugerem que as células T CD4 HTLV-1 específicas (Th1) podem estar envolvidas no início e na patogênese da HAM/TSP (GOON *et al.*, 2003). Em contrapartida, Izumo, Umehara e Osame (1997) descreveram o predomínio das células T CD8⁺ nas lesões de indivíduos com doença crônica de longa duração.

Conforme a hipótese do dano circundante, as citocinas inflamatórias e neurotóxicas TNF- α e IFN- γ podem causar inflamação e morte celular inespecífica, que é observada nos pacientes com HAM/TSP (DAENKE; BANGHAM, 1994; IJICHI *et al.*, 1993). A alta frequência de células T CD4⁺ específicas para o HTLV-1 secretoras de IFN- γ , TNF- α e IL-2 aumenta a possibilidade de estas contribuírem para a patogênese da doença inflamatória do SNC com a formação de lesões inflamatórias que se autoperpetuam (GOON *et al.*, 2003).

Sabe-se que dentre as citocinas presentes durante a resposta à infecção pelo HTLV-1 a TNF- α é uma citocina pró-inflamatória envolvida em diversas doenças inflamatórias (DINARELLO, 2003, GOON *et al.*, 2003), desempenhando função central na coordenação da resposta inflamatória (FONG *et al.*, 1989) enquanto a IL-2 desempenha importante papel na proliferação dos linfócitos e ativação de células T-efetoras, inclusive as T-auxiliares e CTLs. Recentemente, demonstrou-se que a IL-2 recupera a função e a expansão secundária nas CTLs (JANSSEN *et al.*, 2003).

A descoberta de inúmeras células T CD4⁺ específicas para o HTLV-1 em pacientes com doença inflamatória do SNC, mas não nos portadores assintomáticos, sustenta a hipótese de que o dano circundante ocorre pela invasão dessas células nas lesões iniciais da HAM/TSP (GOON *et al.*, 2003).

Em análises da quantidade total de células T-vírus específicas produtoras de IFN- γ (GOON *et al.*, 2003, 2004), verificou-se que os linfócitos T CD4⁺IFN- γ ⁺ para o HTLV-1 eram 10 a 25 vezes mais numerosos em pacientes com HAM/TSP do que em indivíduos assintomáticos com a mesma carga proviral.

A população de células T CD4⁺CD25⁺CCR4⁺ em indivíduos saudáveis é formada primariamente dos subtipos de células T supressoras como os linfócitos T reguladores (Treg) e os linfócitos Th2, enquanto que nos indivíduos com ATL e HAM/TSP constitui o principal reservatório do HTLV-1. Curiosamente nos indivíduos com HAM/TSP as células T CD4⁺CD25⁺CCR4⁺ tornam-se em termos de comportamento imunológico semelhantes aos linfócitos Th1 (*Th1-like*) evidenciado pela superprodução de IFN- γ , sugerindo que o HTLV-1 possa induzir a plasticidade intracelular das Treg transformando-as em células T IFN- γ ⁺ (ARAYA, SATO, YAGISHITA, 2011).

Goon *et al.* (2003) observaram correlação positiva entre a frequência total estimada de células T CD4⁺ inflamatórias (e o total de células produtoras de IL2) e a carga proviral em indivíduos com HTLV-1 assintomáticos, mas não para aqueles com HAM/TSP. A frequência da resposta mediada por células cresce na medida em que a carga proviral aumenta nos indivíduos assintomáticos, mas não nos indivíduos com HAM/TSP. Além disso, as cargas provirais não são semelhantes nos grupos com HAM/TSP e assintomáticos (STARLING *et al.*, 2013). Isso sugere a existência de diferenças fundamentais na resposta das células T CD4⁺ ao HTLV-1, tanto qualitativas (funcional) quanto quantitativas (GOON *et al.*, 2003, 2004).

O perfil das citocinas citoplasmáticas de neutrófilos e monócitos de pacientes infectados pelo HTLV-1 foi avaliado em estudo recente, constatando-se aumento da produção de TNF- α e IL-12. Neste, os indivíduos infectados considerados assintomáticos apresentavam aumento na

frequência de monócitos pró-inflamatórios e, concomitantemente, níveis elevados de células T-CD4+IL-10+ e CD8+IL-10+, indicando a possível existência de um mecanismo imunorregulatório para contrabalançar o TNF- α secretado pelos monócitos (BRITO-MELO *et al.*, 2006).

Aumento significativo da IL-6 foi observado no soro e líquido de pacientes com HAM/TSP quando comparados com aqueles considerados assintomáticos e com indivíduos não-infectados (NISHIMOTO *et al.*, 1990). Lal e Rudolph (1991) reportaram o aumento de secreção de IL-6 e TNF- α em sobrenadante de culturas de células mononucleares periféricas *peripheral blood mononuclear cells* (PBMC) de pacientes infectados em comparação com os não infectados, mas não informaram diferença significativa nas dosagens de IL-1 β , IL-2, IL-4 e IFN- γ . Starling *et al.*, 2013 mostrou aumento significativo de IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-4 no plasma de indivíduos com HAM/TSP em relação aos assintomáticos. A Figura 2 apresenta a fonte e atividades das citocinas.

Quadro 2 Citocinas fontes e atividades

Citocina	Fontes	Atividade
Interleucina 2 (IL-2) Th-1	Células T	Estimula o crescimento e a diferenciação de células T, células B e células <i>natural killers</i> (NK).
Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) Th-1	Monócitos, macrófagos e outros tipos celulares, incluindo células T-ativadas, células NK, neutrófilos e fibroblastos.	Potente mediador de funções inflamatórias e imunes; regula o crescimento e a diferenciação de uma grande variedade de tipos celulares; citotóxico para muitos tipos de células transformadas; promove angiogênese; reabsorção óssea e processos trombóticos; suprime o metabolismo lipogenético.
Interferon gama (IFN- γ) Th-1	Células T CD4+ e CD8+; células NK.	Afeta a ativação, o crescimento e a diferenciação de células T-células B e macrófagos, bem como células NK; aumenta a expressão de MHC em células apresentadoras de antígeno; diferenciação de T _H 1 de assinatura de citocinas; atividade antiviral e antiproliferativa fracas.
Interleucina 4 (IL-4) Th-2	Mastócitos, células T e células estromáticas de medula óssea.	Promove o crescimento e desenvolvimento de células B e T e células da linhagem monocítica; também afeta células externas ao sistema imune, incluindo células endoteliais e fibroblastos.
Interleucina 6 (IL-6) INATA	Células B, células T, várias células não-linfoides incluindo macrófagos, células estromais de medula óssea, fibroblastos, células endoteliais e astrócitos.	Regula as funções de células B e T; efeitos <i>in vivo</i> na hematopoiese; indutor da resposta de fase aguda.
Interleucina 10 (IL10) Th-2	Subgrupos de células T CD4+ e CD8+ ativadas	Estimula ou aumenta a proliferação de células B, tímócitos e mastócitos; estimula, em cooperação com TGF- β , a síntese e secreção de IgA por células B humanas; antagoniza a geração do subgrupo T _H 1 de células T-auxiliares.

Fonte: Adaptado de Kind, Goldsby e Osborne (2008).

Em síntese, durante a infecção pelo HTLV-1 a resposta imune parece variar de forma qualitativa e quantitativa entre os indivíduos. Aqueles com carga proviral elevada que se mantêm assintomáticos estariam mantendo uma resposta balanceada inflamatória/regulatória, enquanto aqueles que não apresentam um padrão equilibrado de resposta inflamatória/regulatória desenvolveriam HAM/TSP.

2.1.3.3 Ação das Quimiocinas.

Quimiocinas são polipeptídios de 8 a 12 kD e baixo peso molecular, que fazem parte da família das citocinas, atuando na movimentação dos leucócitos (ação quimiotática), envolvendo a migração destes para locais de inflamação tecidual a partir do sangue (KARPUS, 2001).

Além da ação quimiotática, as quimiocinas, realizam outras funções tais como a proliferação, diferenciação, ativação e distribuição de célula T, B, e células dendríticas necessárias para gerar a resposta imune adaptativa, estimulam ainda a indução da adesão celular, fagocitose, apoptose, angiogênese e secreção de citocinas (MURPHY *et al.*, 2000; PROUDFOOT *et al.*, 2003).

Dividem-se as quimiocinas em subfamílias, classificadas de acordo com o número e a localização dos resíduos de cisteína N-terminais, XC, CC, CXC e CX3C, sendo o X um outro aminoácido (ZLOTNIK & YOSHIE, 2000). Atuando em vários tipos celulares como monócitos, linfócitos T, basófilos, eosinófilos e células dendríticas está a subfamília CC, que possui dois resíduos de cisteína adjacentes. A subfamília CXC, em que os resíduos de cisteína são separados por um aminoácido (X) age principalmente sobre os neutrófilos. Enquanto a XC é quimiotática para linfócitos T e células matadoras naturais (NK), e a CX3C atrai linfócitos T, NK e neutrófilos (KARPUS, 2001). Tem-se conhecimento de aproximadamente 50 tipos diferentes de quimiocinas humanas, sendo considerada a maior família de citocinas, estas interagem com 25 diferentes receptores de quimiocinas (GRIFFITH; SOKO ; LUSTER, 2014). Os receptores de quimiocinas classificam-se em XCR, CCR, CXCR e CX3CR em sua maioria reconhecem mais de uma quimiocina, conferindo considerável redundância a esse sistema (ver Quadro 3), expressam-se predominantemente em leucócitos. O recrutamento ou a atração química seletiva de leucócitos ocorre pela complexa combinação entre as quimiocinas e seus receptores, expressos diferentemente conforme o tipo celular, bem como por mediadores lipídicos e componentes do sistema de complemento (CHENSUE SW. 2001).

Como resposta a uma infecção a migração de células do sistema imune vindas do sangue periférico para outros tecidos requer a ação de quimiocinas sobre as mesmas e sobre as células do endotélio vascular permitindo o extravasamento e migração das células do sistema imune para o sítio da inflamação em resposta ao gradiente de quimiocinas. (SPRINGER TA, 1994). No SNC, devido à presença da barreira hematoencefálica (BHE), a migração leucocitária possui características únicas. Através da análise do modelo experimental da encefalomielite aguda, acredita-se que o linfócito migra para o SNC em duas fases: inicialmente somente linfócitos participam, sendo ativados independentemente de sua especificidade, são capazes de atravessar a BHE intacta. Numa segunda fase, ocorre ruptura da BHE, há uma intensa infiltração de outros tipos celulares. Possivelmente após a primeira entrada específica de linfócitos T ativados, estes reconheçam seu antígeno originando um processo inflamatório e subsequente produção de citocinas que ativam o endotélio da BHE, permitindo a passagem de outras células inflamatórias (CHAVARRIA A, ALCOCER-VARELA J. 2004).

As células endoteliais e gliais, uma vez ativadas por citocinas pró-inflamatórias produzidas pelos linfócitos T, liberam quimiocinas. O TNF- α induz a presença de leucócitos no espaço perivascular e no líquido e, junto com o IFN- γ , possuem propriedades citotóxicas no endotélio vascular, mediadas pelo óxido nítrico. De nota, as células endoteliais, além de liberar citocinas e quimiocinas, expressam os receptores de quimiocinas CCR5 e CXCR4. Os astrócitos também produzem várias quimiocinas, como CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES, CXCL8/IL-8 e CXCL10/IP-10, em resposta a citocinas pró-inflamatórias, e expressam receptores como CCR1, CCR5 e CXCR4 (HESELGESSER J, HORUK R. 1999).

As quimiocinas liberadas favorecem a migração de células como neutrófilos, linfócitos T e monócitos (HUANG D 2000, WEKERLE H 1987). Assim que essas células atingem o parênquima cerebral, secretam mais citocinas e quimiocinas, amplificando o processo inflamatório (KARPUS WJ, RANSOHOFF RM 1998).

Outras células endógenas do SNC também podem expressar receptores de quimiocinas, como oligodendrócitos, micróglia e até neurônios. A expressão desses receptores no SNC parece ser regulada pelo TGF β 1 (fator de crescimento transformador β 1) e pelo IFN- γ . A liberação de quimiocinas no SNC é geralmente determinada por estímulo inflamatório através de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1, exceto no caso da CX3CL1/Fractalkina e CXCL12/SDF-1 β , que são expressas de forma constitutiva, respectivamente, em neurônios e astrócitos (BAJETTO A, *et al.* 1999, HARRISON JK, *et al.* 1997, MANTOVANI A. 1999). As quimiocinas mais comumente relacionadas às lesões do SNC, incluindo pesquisas em modelo

experimental, são CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL5/RANTES, CCL8/MCP-2, CXCL8/IL-8 e CXCL10/IP-10 (HESSELGESSER J, HORUK R. 1999, ASENSIO VC, CAMPBELL IL. 1999, BACON KB, HARRISON JK. 2000, BIBER K, *et al.*2002, MENNICKEN F, *et al.*1999, UBOGU, Eroboghene E.; COSSOY, Michael B.; RANSOHOFF, Richard M.2006).

O modelo de resposta inflamatória na HAM/TSP pressupõe que a mesma não é interrompida no sistema nervoso central (SNC) e a sinalização pelas quimiocinas contribui para a manutenção das células T e macrófagos no mesmo sendo que resposta inflamatória destas células levaria a desmielinização (MATSUURA, E, YAMANO, Y, JACOBSON, S.2010; FUZII, *et al.*2014).

As seguintes quimiocinas estão relacionadas à resposta imune na infecção pelo HTLV-1 (ver Quadro 3): a CCL2/MCP-1, importante quimiocina relacionada a resposta Th2; a CCL5/RANTES, envolvida com o receptor CCR5; a CXCL8/IL-8; a CXCL9/MIG e CXCL10/IP-10 que participam da resposta imune Th1, sendo esta última aumentada na HAM/TSP e na esclerose múltipla, que é uma doença neurodegenerativa imunomediada (CHARO IF, RANSOHOFF RM, 2006).

Estudo recente sugere que as quimiocinas IL8, CXCL9 e CXCL10 podem ter um papel no desenvolvimento da HAM/TSP, a IL8 seria importante no recrutamento dos neutrófilos para o SNC contribuindo para a ruptura da barreira hematoencefálica; CXCL9 e CXCL10 teriam importância no recrutamento para o SNC de células infectadas pelo HTLV-1 e linfócitos T HTLV-1 específicos mantendo uma inflamação crônica o que conduz a desmielinização e doença neurológica (CHAVES, *et al.* 2016)

Quadro 3

Tipos de receptores em células recrutadas pela ação das diferentes quimiocinas estudadas

Quimiocina ligante	Receptor	Tipo celular	Observações
CCL5/RANTES	CCR1	Células T, monócitos, eosinófilos, basófilos	
CCL2/MCP-1	CCR2	Monócitos, células dendríticas (imaturas), células T de memória	Resistência a patógenos intracelulares. Influencia diretamente a produção de IL-4 pelas células Th2
CCL5/RANTES	CCR3	Eosinófilos, basófilos, mastócitos, células T Th2, plaquetas	
CCL5/RANTES	CCR5	Células T e monócitos	Correceptor na infecção HIV-1 (cepas T-tropicas)
CXCL8/IL-8	CXCR1	Neutrófilos e monócitos	Inflamação aguda
CXCL8/IL-8	CXCR2	Neutrófilos, monócitos, células endoteliais microvascular	
CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10	CXCR3-A	Células Th1, mastócitos e células mesangiais	A CXCL10/IP-10 é regulada pelo IFN- γ , sendo expressa abundantemente em infecções virais
CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10	CXCR3-B	Células endoteliais microvascular e células neoplásicas	

MCP-1 monocyte chemoattractant protein; Th2 células T helper tipo 2; RANTES regulated T cell expressed and secreted; MIG monokine induced by γ -interferon; IP-10 γ -interferon inducible protein-10; HIV-1 vírus da imunodeficiência humana do tipo 1
Adaptado de CHARO & RANSOHOFF (2006) (135).

2.1.3.4 Ação dos Leucotrienos

Diversos estudos mostraram o envolvimento de mediadores lipídicos na etiologia de certas doenças inflamatórias crônicas. Estes mediadores lipídicos são secretados por diferentes células, entre elas macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e mastócitos (SAMUELSSON, 1983; A LEWIS; AUSTEN, 1984) e são produzidos rapidamente após o estímulo, pois a maquinaria enzimática para síntese destes compostos é constitutiva nas células mielóides (PETERS-GOLDEN; HENDERSON, 2007). A liberação destes mediadores ocorre após ativação celular por patógenos ou mediadores solúveis como citocinas.

Dentre os mediadores lipídicos temos os leucotrienos que são gerados a partir do metabolismo do Ácido Aracdônico sendo metabólitos da 5-lipoxigenase (os leucotrienos (LTs): LTB₄, LTC₄, LTD₄ e LTE₄ sendo os três últimos denominados cisteinil-leucotrienos (CysLTs). Na maioria dos processos inflamatórios crônicos, como psoríase (IKAI, 1999), artrite reumatóide (SPERLING, 1995) e doença inflamatória intestinal (HENDEL; NIELSEN, 1997), a produção de LTs está aumentada. Além disso, esses mediadores estão presentes em uma variedade de desordens inflamatórias do pulmão, incluindo asma (OKUNISHI; PETERS-

GOLDEN, 2011) e doenças infecciosas do trato respiratório (PETERS-GOLDEN, COFFEY M, 1999).

Vários autores têm demonstrado que LTs são fundamentais para os mecanismos de defesa contra patógenos, uma vez que estes mediadores ativam a fagocitose e mecanismos microbicidas das células (MEDEIROS et al., 2004; SEREZANI et al., 2006; PERES et al., 2007).

Trindade BC *et al.* 2012 demonstraram o aumento dos leucotrienos no plasma de indivíduos infectados pelo HTLV-1 assintomáticos e com HAM/TSP. No entanto, é importante considerar que a resposta imune reflete um somatório de interações entre moléculas sinalizadoras sob a forma de fatores solúveis, receptores de superfície celular e imunoglobulinas. A variabilidade e gravidade da expressão clínica dessa infecção, provavelmente refletem o grau e o caráter dos diferentes tipos de resposta imunológica do hospedeiro aos antígenos virais. Assim, os mecanismos imunológicos desencadeados por antígenos derivados do HTLV-1 não devem ser avaliados de forma limitada, restrita a funções imunológicas celulares. Alguns parâmetros como alta carga viral e altos títulos de anticorpos para HTLV-1, tanto no soro quanto no fluido cerebrospinal, parecem estar associados com a ocorrência de HAM/TSP (KUBOTA *et al.*, 1993).

Concluindo, a fisiopatologia da HAM/TSP envolve mecanismos imunorreguladores do hospedeiro associados á patogenia viral que controla a maquinaria celular de modo a favorecer a inflamação tecidual. O dano aparente é irreversível, porém somente é percebido com o avançar da doença. Daí a importância de marcadores imunológicos, subclínicos, que sinalizem o desbalanço imunológico ainda sem um aparente dano clínico.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Avaliar a existência de associações entre o perfil das citocinas, quimiocinas e leucotrienos em sangue periférico de indivíduos infectados pelo HTLV-1 como possíveis indicadores de evolução da infecção assintomática para mielopatia.

3.2 Específicos

- Determinar os níveis plasmáticos das citocinas IL 2, IL6, TNF- α IFN- γ , IL-4, IL-10, das quimiocinas CCL2/MCP1, CCL5/RANTES; a CXCL8/IL-8; a CXCL9/MIG e CXCL10/IP-10 e leucotrienos CysLT e LTB4 nos diferentes grupos avaliados;
- Analisar o perfil imunológico dos grupos nas diferentes fases de evolução da infecção pelo HTLV-1 (assintomático, pHAM e HAM/TSP);
- Identificar a dinâmica da interação entre citocinas, quimiocinas e leucotrienos nos indivíduos dos grupos assintomático, pHAM e HAM/TSP;
- Avaliar a correlação dos níveis de citocinas, quimiocinas e leucotrienos plasmáticos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 com as formas de progressão da infecção;
- Estabelecer um algoritmo de marcadores biológicos para o acompanhamento da morbidade da infecção pelo HTLV-1.

4 PACIENTES E MÉTODOS

O processo de seleção dos artigos relacionados à resposta imunológica na infecção pelo HTLV-1 compreendeu pesquisa nas bases de dados MedLine/PUBmed, LILACS, ADOLEC e Cochrane Library idioma principal inglês. Os termos (DeCS/MeSH) incluídos na pesquisa utilizados isoladamente e combinados foram HTLV-1, HAM/TSP, Chemokines, Leukotrienes, Cytokines and morbidity. Este trabalho segue as regras de redação determinadas pela ABNT, e o artigo publicado atende as normas especificadas pelo periódico Biomarkers com as referências do artigo estruturadas no estilo Harvard.

4.1 Delineamento

Os participantes desse estudo são acompanhados desde 1997, pelo Grupo Interdisciplinar de Pesquisa em HTLV-1 (GIPH), grupo de pesquisa registrado no CNPq como uma coorte aberta de indivíduos infectados pelo HTLV-1. Para o trabalho de mestrado (2008/2010), a variável de interesse foi o nível de citocinas nos subgrupos infectados pelo HTLV-1 (assintomático, pHAM e HAM/TSP e grupo controle soronegativo). O soro utilizado para a testagem das citocinas IL 2, IL6, TNF- α INF- γ , IL-4, IL-10 foi armazenado a -20°C em soroteca na Faculdade de Medicina da UFMG.

Para o estudo de doutorado, utilizaram-se os soros de 2008/2010 e a análise foi ampliada para a testagem das quimiocinas CCL5/RANTES, CCL2/MCP1; a CXCL8/IL-8; a CXCL9/MIG e CXCL10/IP-10 e leucotrienos CysLT e LTB4. Na execução dessa etapa do estudo, utilizou-se 108 amostras da soroteca assim distribuídas: 27 assintomáticos; 32 possível HAM; 28 HAM/TSP e 21 soronegativos. Essa etapa significou uma análise transversal ampliada do perfil imunológico dos indivíduos que participaram do estudo em 2008/2010.

4.1.1 Hipótese nula a ser testada

A associação da variação dos níveis de citocinas, quimiocinas e leucotrienos plasmáticos não são indicadores de progressão da infecção HTLV-1.

4.2 Seleção dos pacientes

Indivíduos adultos entre 18 e 75 anos de idade, de ambos os gêneros, foram informados sobre a pesquisa e assinaram termo de consentimento livre e esclarecido para o uso de todos os dados clínicos e laboratoriais na pesquisa (APÊNDICE A).

1) Grupos de estudo: infectados pelo HTLV-1

- Assintomáticos;
- possível HAM/TSP;
- pacientes com diagnóstico definido de HAM/TSP.

2) Grupo controle:

Realizou-se seleção aleatória dos indivíduos que fariam parte do grupo controle. Estes deveriam preencher as seguintes características: doadores saudáveis (conforme critérios da Hemominas, ou seja, que não possuem diagnóstico positivo de hepatite B e C, e são soronegativos para às doenças transmissíveis pelo sangue, como síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), hepatite, sífilis e doença de Chagas, não-usuários de drogas, sem história de infecção nos últimos 12 meses e sem uso de corticoesteroides).

4.2.1 Critérios de inclusão

Grupo 1 – Assintomáticos

- Sorologia positiva para o HTLV-1 tanto no teste de *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) quanto *western blot* (WB);
- Estar sem sintomas clínicos de acordo com os critérios propostos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) adaptado por Castro-Costa *et al.* (2006), classificados conforme Escala de Incapacidade Funcional Ampliada (EDSS) e OSAME – apresentando classificação - 0 em ambas as escalas (ANEXO B).

Grupo 2- Possível HAM/TSP

- Sorologia positiva para o HTLV-1 tanto no teste de ELISA quanto WB;
- manifestar sintomas que permitam classificá-lo nos critérios propostos pela OMS definido como possível, adaptado por Castro-Costa *et al.* (2006), classificados

conforme escalas de incapacidades EDSS e OSAME apresentando classificação 1 a 2 em pelo menos uma das escalas.

Grupo 3 - Diagnóstico definido de HAM/TSP

- Sorologia positiva para o HTLV-1 tanto no teste de ELISA quanto WB;
- Diagnóstico de HAM/TSP definido como aqueles que apresentem sinais clínicos suficientes, de acordo com os critérios propostos pela OMS adaptado por Castro-Costa *et al.* (2006), para serem incluídos no grupo de indivíduos com HAM/TSP e classificados conforme escala de incapacidade EDSS e OSAME apresentando classificação a partir de 2 em ambas as escalas.

Grupo controle- Doadores saudáveis (grupo-controle)

- Ser doador ou ex-doador regular no Hemominas;
- Pertencer à coorte do GIPH.

4.2.2 Critérios de exclusão

- História clínica de quadros infecciosos/inflamatórios prévios e/ou atuais;
- Coinfecção com vírus da imunodeficiência humana (HIV);
- Coinfecção com HTLV-2;
- Coinfecção com hepatites virais;
- Uso de corticosteróides e outros imunossupressores no período de um ano antecedente a pesquisa.

4.3 Tamanho da amostra

Para o cálculo do tamanho amostral considerou-se o fato da HAM/TSP apresentar baixa incidência optando-se pela realização do cálculo para eventos raros (ROMANELLI, *et al.*, 2013). Considerando-se Z_{β} o valor do erro β , p_1 -2% a proporção de indivíduos que desenvolverão a doença no grupo assintomático e p_2 -8% a proporção de indivíduos que desenvolverão a doença no grupo possível HAM para um poder de 80%.

Aplicando-se a fórmula:

$$n = z_{\beta}^2 [p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)] / (p_2 - p_1)^2 - \text{Tem-se que } n = 19 \text{ indivíduos/grupo}$$

4.4 FLUXOGRAMA

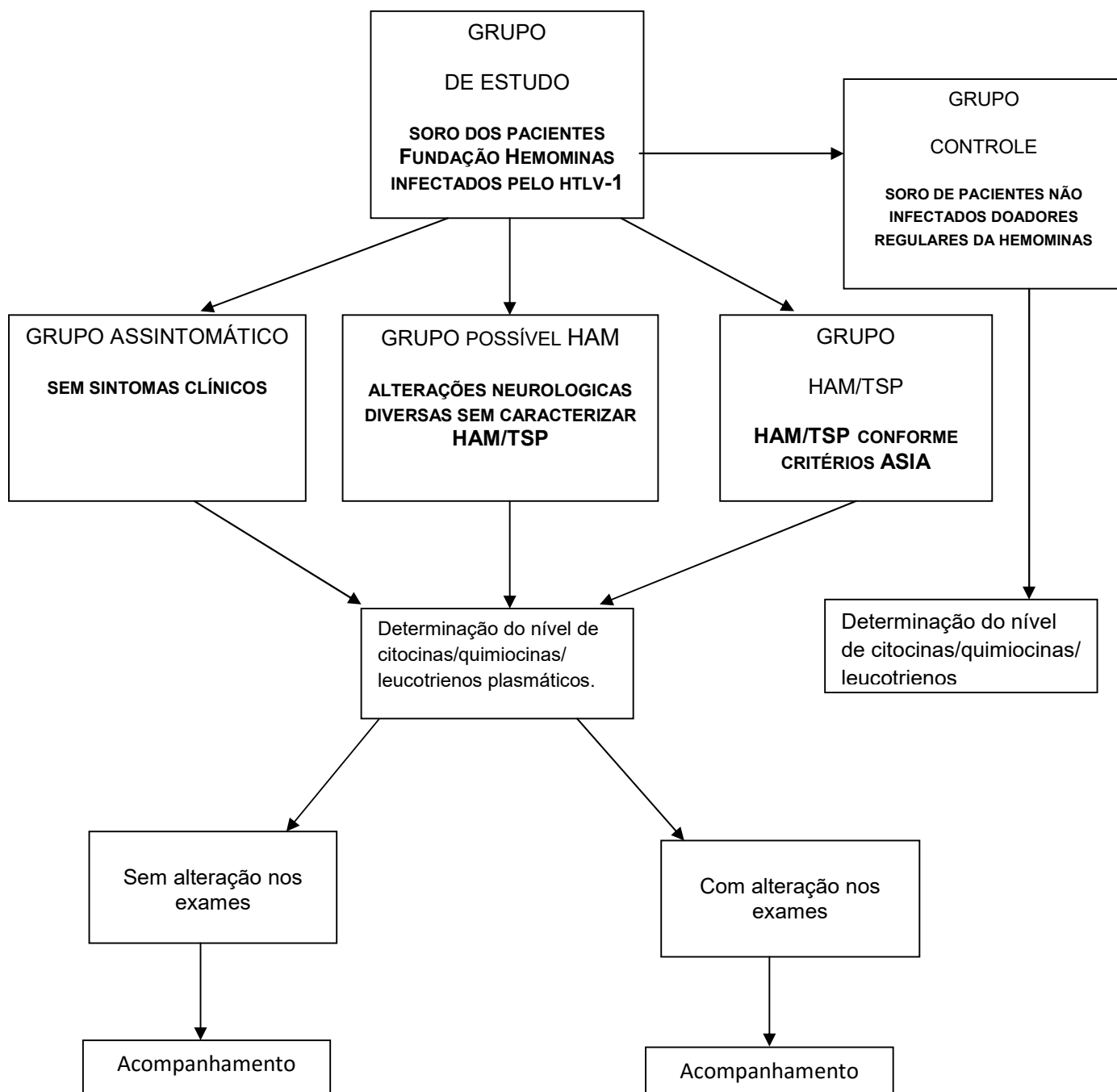


FIGURA 3A - Delineamento do estudo - retestagem soros de 2008/2010

4.5 Procedimentos, local da pesquisa

1ª Fase

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP), parecer ético n° ETIC 090/07, 23 de maio de 2007 (ANEXO A) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hemominas (ANEXO B).

Os pacientes acompanhados pelo GIPH e que preencheram os critérios de inclusão definidos para esse estudo foram convidados a participar a partir de contato por telefone ou por carta. Os que compareceram receberam informações verbais e escritas sobre a pesquisa, as questões éticas e jurídicas e orientações quanto ao projeto e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A).

Após a aceitação, foram submetidos às avaliações:

- Anamnese (questionaram-se queixas referentes ao trato urinário – incontinência, retenção; trato gastrointestinal – constipação; aparelho auditivo - perda auditiva, zumbido, tonteira; aparelho locomotor/neurológico - perda de força, dor, parestesia; uso de medicamentos corticóide e outros imunossupressores. Modelo de anamnese adaptado do GIPH (ANEXO E).
- exame físico geral;
- exame neurológico completo, realizado por um neurologista.
- exames laboratoriais.

2ª Fase

Testagem do soro colhido na primeira fase para quimiocinas e leucotrienos.

4.5.1 Amostras de sangue

As amostras foram colhidas por profissionais treinados. A amostra biológica foi constituída por sangue total, distribuído nos anticoagulantes ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e heparina. Após a coleta, as mesmas foram encaminhadas para determinação do nível de citocinas e quimiocinas plasmáticas, por citometria de fluxo, e para dosagem dos leucotrienos.

4.5.1.1 Riscos

Riscos inerentes à coleta padrão de sangue periférico, sendo mínimos para o paciente. O risco foi apenas o esperado para toda coleta de sangue, como dor no local da picada e possibilidade de hematoma.

4.5.2 Detecção do nível de citocinas plasmáticas por citometria de fluxo

A coleta do material de todos os participantes da pesquisa foi feita no Setor de Neurologia do Hospital das Clínicas e a determinação dos níveis de citocinas plasmáticas realizada no Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração (LBDM) do Centro de Pesquisas René Rachou do Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ, conforme protocolo a seguir.

Para a definição do nível de citocinas plasmáticas, amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos de 5 mL contendo o anticoagulante heparina. As amostras de plasma foram centrifugadas a 4.000 x g durante 15 minutos a 18°C, aliqüotadas e mantidas a -20°C até a realização dos experimentos.

Os níveis plasmáticos de citocinas foram quantificados utilizando-se o sistema *Cytometric Bead Array* (CBA), *Becton Dickinson* (BD), que emprega uma mistura de esferas de poliestireno de intensidades de fluorescência discretas e distintas, recobertas com anticorpos específicos para as citocinas humanas e são detectadas no canal FL3. Essa metodologia permite a avaliação simultânea de diversas citocinas no mesmo ensaio, empregando pequenos volumes de amostra. Neste estudo, a metodologia de CBA foi adaptada dos protocolos originais propostos por CHEN *et al.* (1999), como descrito a seguir.

Alíquotas de 25 µL de plasma-teste diluído 1:5 com diluente G (reagente presente no *kit* CBA), alíquotas de 25 µL dos padrões de citocinas submetidas à diluição seriada com diluente G (*Top Standart* – 5.000 pg/mL, 1:2 – 2.500 pg/mL, 1:4 – 1.250 pg/mL, 1:8 – 625 pg/mL, 1:16 – 312,5 pg/mL, 1:32 – 156 pg/mL, 1:64 – 80 pg/mL, 1:128 – 40 pg/mL e 1:256 – 20 pg/mL) e 25 µL de diluente G apenas (controle negativo) foram transferidos para tubos de poliestireno de 5 mL (Falcon nº 2.052). Em seguida, em cada tubo foram adicionados 15 µL da mistura de esferas de captura conjugadas com anticorpos monoclonais anti-IL-4, IL-10, IL-2, IL-6, TNF- α e IFN- γ (*Human Th1/Th2 Cytokine CBA Kit*), com subsequente incubação por 90 minutos, à temperatura ambiente (TA), ao abrigo da luz. Após a incubação, as esferas de captura foram lavadas com 500 µL da solução F (*wash buffer*, reagente presente no *kit* CBA), centrifugadas a 600 x g por sete minutos a 18°C e o sobrenadante foi cuidadosamente aspirado e descartado. As esferas foram então reincubadas em 20 µL do reagente B, que corresponde a um coquetel de anticorpos monoclonais anticitocinas humanas, conjugados com o fluorocromo PE (FL-2) por 90 minutos, TA, ao abrigo da luz. Após incubação, as esferas de captura foram novamente lavadas com 500 µL da solução F, centrifugadas a 600 x g por sete minutos a 18°C e o sobrenadante cuidadosamente aspirado e descartado. Após centrifugação, as esferas foram ressuspensas em 250 µL de reagente F e imediatamente analisadas no citômetro de fluxo.

A aquisição dos dados foi realizada no citômetro de fluxo FACSCalibur (BD). Embora as esferas fluorescentes presentes no *kit* CBA sejam projetadas para serem excitadas com o *light amplification by stimulated emission of radiation (laser)* de argônio (488 nm), com emissão em comprimento de onda correspondente ao parâmetro fluorescência 3 (FL3), elas também podem ser excitadas pelo *red diodo laser*, com emissão de fluorescência detectada no canal FL-4. Essa possibilidade de leitura pode ser obtida durante o processo de aquisição, a partir da utilização do *dual laser CBA template*, que simplifica os ajustes do equipamento, reduzindo a necessidade de compensações da interferência que a fluorescência emitida pelas esferas possa exercer sobre a fluorescência inerente aos anticorpos monoclonais anticitocinas humanas, conjugados com o fluorocromo PE (FL2).

O *kit* CBA adquirido (*Kit 551809*) continha as seguintes citocinas: *Human Th1/Th2 Cytokine CBA Kit II* – IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , INF- γ .

4.5.3 Detecção do nível de quimiocinas plasmáticas por citometria de fluxo

A coleta, do material sangue, foi realizada na Faculdade de Medicina UFMG e a determinação dos níveis de quimiocinas plasmáticas conforme protocolo abaixo.

Para a determinação do nível de quimiocinas plasmáticas, amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos de 5mL contendo o anticoagulante EDTA. As amostras de plasma foram centrifugadas a 4000 x g durante 15 minutos a 18oC, aliquotadas e mantidas a -20oC até a realização dos experimentos.

Os níveis plasmáticos de quimiocinas foram quantificados utilizando-se o sistema Cytometric Bead Array (CBA), Becton Dickinson-BD, que emprega uma mistura de seis esferas de poliestireno, de intensidades de fluorescência discretas e distintas, recobertas com anticorpos específicos para as quimiocinas humanas, e são detectadas no canal FL-3. Essa metodologia permite a avaliação simultânea de diversas quimiocinas no mesmo ensaio, empregando pequenos volumes de amostra. Neste estudo, a metodologia de CBA foi adaptada dos protocolos originais propostos por CHEN et al. (1999), como descrito a seguir:

Alíquotas de 25µL de plasma teste diluído 1:5 com diluente G (reagente presente no kit CBA), alíquotas de 25µL dos padrões de quimiocinas, submetidos a diluição seriada com diluente G (“Top Standart” – 5000pg/mL, 1:2 – 2500pg/mL, 1:4 – 1250pg/mL, 1:8 – 625pg/mL, 1:16 – 312,5pg/mL, 1:32 – 156pg/mL, 1:64 – 80pg/mL, 1:128 – 40pg/mL e 1:256 – 20pg/mL) e 25µL de diluente G apenas (Controle Negativo), foram transferidas para tubos de poliestireno de 5mL (Falcon no 2052). Em seguida, a cada tubo foram adicionados 15µL da mistura de esferas de captura, conjugadas com anticorpos monoclonais anti- MIG (CXCL9), IP10(CXCL10), IL-8 (CXCL8), MCP-1(CCL2), RANTES(CCL5) (Human Chemokine Kit) com subsequente incubação por 90 minutos, à temperatura ambiente (T.A.), ao abrigo da luz. Após a incubação, as esferas de captura foram lavadas com 500µL da solução F (“Wash buffer”, reagente presente no kit CBA), centrifugadas a 600 x g, por 7 minutos a 18oC e, o sobrenadante cuidadosamente aspirado e descartado. As esferas foram então re-incubadas na presença de 20µL do reagente B, que corresponde a um coquetel de anticorpos monoclonais anti-quimiocinas humanas, conjugados com o fluorocromo PE (FL-2) por 90 minutos, T.A., ao abrigo da luz. Após incubação, as esferas de captura foram novamente lavadas com 500µL da solução F, centrifugadas a 600 x g, por 7 minutos a 18oC e, o sobrenadante cuidadosamente aspirado e descartado. Após centrifugação, as esferas foram ressuspensas em 250µL de reagente F e imediatamente analisadas no citômetro de fluxo.

A aquisição dos dados obtidos será realizada no citômetro de fluxo FACSCalibur® (BD). Embora as esferas fluorescentes presentes no kit CBA sejam projetadas para serem excitadas com o laser de argônio (488nm), com emissão em comprimento de onda correspondente ao parâmetro Fluorescência 3 – FL-3, elas também podem ser excitadas pelo “red diodo laser”, com emissão de fluorescência detectadas no canal FL-4. Esta possibilidade de leitura pode ser obtida durante o processo de aquisição através da utilização do “Dual Laser CBA Template”, que simplifica os ajustes do equipamento, reduzindo a necessidade de compensações da interferência que a fluorescência emitida pelas esferas possa exercer sobre a fluorescência inerente aos anticorpos monoclonais anti-quimiocinas humanas, conjugados com o fluorocromo PE (FL-2).

4.5.4 Quantificação de mediadores lipídicos no plasma

A presença de leucotrieno B4 (Cayman Chemical Co., MI, USA) e Cys (C4/D4/E4) (Amersham Biosciences, UK) nas amostras de plasma purificadas. (Cayman Chemical Co., MI, USA) foi avaliada por ensaio imunoenzimático de competição de acordo com instruções do fabricante. Para purificação da fração lipídica do plasma, 1 mL da amostra foi acidificada com HCl 1N pH 3,4 – 3,6 e vagarosamente passada através de colunas Sep-Pak® C 18 (Waters Associates, MA, USA) previamente lavadas com 10 mL de água e 10 mL de etanol 35%. Os leucotrienos contidos nas amostras foram eluídos da coluna com 2 mL de etanol absoluto e liofilizadas em banho de nitrogênio até a secagem completa. Após liofilização, as amostras foram ressuspensas em 200 µL de solução tamponada. Para o ensaio imunoenzimático, foram utilizadas alíquotas deste plasma purificado. Resumidamente, em placas com 96 poços recobertas com anticorpos anti-IgG fornecidas pelo fabricante, foram adicionados 50 µL de cada amostra, leucotrienos (LTB4 ou cysLTs) conjugados com a enzima acetilcolinaesterase, e anticorpos específicos anti LTB4, LTC4, cysLTs. Após 18 horas de incubação as placas foram lavadas em lavadora de ELISA (ELx 50, Biotek Instruments Inc.). Após, foram adicionados aos poços 200 µL do substrato (acetilcolina: “Reagente de Ellman’s”) e as placas novamente incubadas de 1 a 2 horas sob agitação orbital. As absorbâncias foram determinadas em leitor de ELISA a 420 nm (uQuant, Biotek Instruments Inc.) e as concentrações de eicosanóides calculadas a partir da curva padrão.

4.6 Parâmetros avaliados

Avaliou-se a existência de associações entre quimiocinas, citocinas e leucotrienos para cada grupo clínico e a possibilidade de utilização destes biomarcadores na identificação da evolução da infecção pelo HTLV-1.

4.7 Análise estatística

O registro dos dados foi realizado em formulário padronizado para todos os pacientes. Na execução das análises estatísticas, adotou-se o *software Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 15.0 for windows - SPSS Incorporation, Chicago, Illinois, Estados Unidos da América, 2008* (disponível no Laboratório de Informática do Centro de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da UFMG). Em todas as análises foi considerado o nível de 5% de significância.

A análise epidemiológica descritiva abordou as características dos grupos em estudo, avaliando se existe diferença estatisticamente significativa entre as variáveis analisadas.

4.7.1 Estatísticas descritivas

Inicialmente, foi feita uma análise descritiva das variáveis utilizadas no estudo. Para as variáveis categóricas, foram feitas tabelas de distribuição de frequências. Para as variáveis contínuas, foram utilizadas medidas de tendência central e variabilidade. A análise descritiva foi empregada para o total de pacientes e separadamente para cada um dos tres grupos.

4.7.1.1 Comparação dos grupos

Para comparação dos três grupos com variáveis categóricas, foi feito o teste do qui-quadrado de Pearson, apropriado para comparação de proporções, ou teste de Fisher, quando foram utilizadas amostras com poucas frequências. Na pesquisa de possíveis relações de causalidade, foi considerado o nível de significância de 5% (erro tipo I) e poder do estudo de 80% (erro tipo II). Para verificar diferenças entre os tres grupos, quando se consideraram variáveis contínuas numéricas, foi adotado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis.

Nas comparações múltiplas dos grupos dois a dois, usou-se o teste Mann-Whitney com correção de Bonferroni. Optou-se por utilizar testes não-paramétricos devido ao caráter assimétrico das variáveis testadas.

4.7.1.2 Análise da Assinatura dos Biomarcadores

Estruturou-se a assinatura dos biomarcadores conforme descrito previamente por LUIZA-SILVA et al., 2011 e COSTA-SILVA et al. (2014). Calculou-se a distribuição global de cada biomarcador por tercís utilizando-se todo o universo de dados (AC+pHAM+HAM/TSP) para definir cada indivíduo como "baixo" ou "alto" produtor destes marcadores (Fig 3 do artigo). Esta estratégia permitiu a computação final da percentagem de indivíduos apresentando altos níveis de biomarcadores. Além disso, realizou-se a montagem e sobreposição de curvas ascendentes de assinatura dos biomarcadores para identificar mudanças no perfil global destes.

4.7.1.3 Análise das correlações dos biomarcadores

A montagem das redes de correlações dos biomarcadores objetivou a verificação da existência de associações entre quimiocinas, citocinas e leucotrienos para cada grupo clínico. Utilizou-se a correlação de Spearman para avaliar a associação entre os níveis séricos dos biomarcadores (pg/ml), considerou-se correlação positiva ou negativa significativa se $p < 0.05$. Para melhor representar a interatividade entre as moléculas testadas utilizou-se o software open source Cytoscape (2.8) na composição das redes de interação das biomoléculas. Utilizou-se três *layouts* para a construção da rede de correlações dos biomarcadores sendo uma para cada categoria (quimiocina, citocina, leucotrieno) representados por círculos sólidos (●) para níveis elevados ou vazados (○) para níveis baixos de biomarcadores. Conforme proposto por TAYLOR (1990), utilizou-se linhas para destacar conexões negativas (— —), moderadas (—) e fortes (—■—).

4.8 Análise de dados

Na avaliação da resposta immune relacionada ao HTLV-1, aplicou-se quatro conjuntos de análises de dados utilizados em investigações observacionais:

1) Teste de Gehan-Breslow-Wilcoxon; 2) Análise de Assinatura de Biomarcadores; 3) Rede de Biomarcadores Séricos; 4) Regressão logística e árvore de classificação. Estas abordagens mostram elevada sensibilidade na detecção das alterações nas assinaturas de citocina que não são detectáveis por métodos estatísticos convencionais.

- 1) Teste de Gehan-Breslow-Wilcoxon: A análise de frequências cumulativas é empregada na comparação de curvas de sobrevivência. Aplicou-se este método para identificar, entre grupos, diferenças importantes na frequência cumulativa de indivíduos com um determinado nível de um dos biomarcadores sorológicos. Na figura 2 do artigo a linha tracejada delimita o ponto em que se atingiu 80% da amostra com uma diferença significativa de $p < 0.05$, destacado nos gráficos através de colchetes. Para análise de dados e construção dos gráficos utilizou-se o Software Prisma 5.0 (San Diego, USA).
- 2) Análise de Assinatura de Biomarcadores: A utilização desta abordagem, para identificar as diferenças relevantes nas assinaturas de quimiocinas / citocinas / leucotrienos entre os grupos, foi adaptado a partir de um estudo pioneiro de COSTA-SILVA et al. (2014). Inicialmente, classificou-se os níveis de quimiocinas / citocinas / leucotrienos como baixo -“low” (L) - ou alto - “high” (H) utilizando como referência a distribuição por mediana. Os valores da mediana foram calculados para cada biomarcador de uma maneira cega antes de atribuir a um grupo. Estes valores foram utilizados como ponto de corte de forma que indivíduos com um valor de corte acima da mediana foi considerado alto produtor. Cada conjunto de dados foi montado em diagramas em preto e branco, a fim de calcular a frequência de "altos produtores" e “baixo produtores” dentro de cada grupo clínico. Considerou-se que as frequências relevantes eram aquelas quando mais de 50% do grupo de estudo era formado por altos produtores. (Figura3A). É importante ressaltar que o conceito de alto e baixo produtor aplica-se apenas a este conjunto de dados e a media global só é aplicável como limite para a população estudada. Além disso, montou-se a assinatura ascendente dos biomarcadores de AC, pHAM e HAM /TSP sobrepondo-as para indicar em cada grupo clínico aqueles com altos níveis ($\geq 50\%$) (Figura 3B).

- 3) Rede de Biomarcadores Séricos: Montou-se uma rede de biomarcadores para avaliar a associação entre quimiocinas, leucotrienos e citocinas plasmáticos dentro de cada grupo. Calculou-se o coeficiente de correlação de Spearman, sendo considerado estatisticamente significativo se $p < 0,05$. Utilizou-se o índice de correlação para caracterizar a força das correlações como: negativa ($r < 0$), moderada ($0,36 > r < 0,67$) e forte ($r > 0,68$) conforme proposto por TAYLOR (1990) (Figure 4). Para a análise de dados, utilizou-se o software Prisma 5.0 (San Diego, USA) e o Cytoscape (versão 2.8) para as redes, como uma representação da correlação das moléculas testadas. (Figura 4 do artigo).
- 4) Regressão logística e árvore de classificação: Aplicou-se o modelo de regressão logística ordinal esteriotipada para estabelecer a interrelação entre adoecimento pelo HTLV-1 e mudanças nos biomarcadores séricos, $\log \left[\frac{\pi_j}{\pi_{AC}} \right] = \alpha_j + \sum \beta_i x_i$ onde $j=2,3$ representam respectivamente as classes pHAM e HAM/TSP, e i representa a expressão do biomarcador e estima o valor de β como proposto por ANDERSON (1984). Utilizou-se a distribuição das variáveis no grupo controle para a categorização dos biomarcadores e o método de Log-verossimilhança para testar o coeficiente de significância. Para classificar os elementos da amostra e aplicar o conjunto de dados na prática clínica utilizou-se a análise discriminante e a árvore de classificação e regressão (CART) Figura 5 do artigo. Considerou-se um resultado estatisticamente significativo quando $p < 0.05$. Realizou-se as análises estatísticas com a utilização dos pacotes VGAM, Rpart, Rattle, Rpart.plot, RColorBrewer, Party, Partykit Caret do software estatístico R (Version 2.15.3; <http://www.r-project.org>).

5 RESULTADOS

5.1 Estatísticas descritivas gerais

Convocaram-se 155 indivíduos, 19 se recusaram a participar e sete não compareceram aos atendimentos agendados. Os demais 129 participaram da avaliação clínica e neurológica, sendo 40 excluídos por não atenderem aos critérios de inclusão conforme TAB 1

TABELA 1

Descrição dos motivos de exclusão e perdas dos indivíduos do estudo.

<i>Motivo da Exclusão</i>	<i>Número de pacientes</i>
Pacientes que recusaram a participar da pesquisa.	19
Pacientes com sorologia positiva para HTLV-1 e HTLV-2.	2
Pacientes com sorologia positiva para HTLV-1 e HIV.	1
Pacientes que não participaram da etapa de Avaliação Neurológica e/ou Avaliação Clínica.	3
Pacientes com sorologia negativa para o HTLV-1 que relataram, durante a avaliação clínica, quadros de doenças inflamatórias/infecciosas no último ano.	13
Pacientes com problemas de leitura da amostra de plasma para a dosagem de citocinas.	2
TOTAL	40

Participaram 87 indivíduos com sorologia positiva para o HTLV-1, subdividido nos subgrupos; 27 assintomáticos, 32 com possível HAM/TSP (CASTRO-COSTA *et al.*, 2006), e 28 com diagnóstico definido de HAM/TSP e 21 indivíduos do grupo-controle.

5.2 Dados epidemiológicos

Percebe-se na TAB. 3 que o percentual de indivíduos do sexo feminino foi mais baixo entre os controles (42,9%) e mais alto entre os HAM/TSP (89,3%). Além disso, os controles tiveram média e mediana de idade menores.

Verifica-se na TAB. 4 a comparação das variáveis sociodemográficas entre os grupos, evidenciando-se diferenças entre os quatro grupos no que se refere a gênero e idade (valor- $p < 0,05$).

TABELA 2

Distribuição de 108 indivíduos subdivididos entre os grupos controle, assintomático, possível HAM/TSP e HAM/TSP em relação às variáveis sociodemográficas gênero e idade
Belo Horizonte 2008-2010

VARIÁVEIS	NÃO INFECTADO PELO HTLV-1 (controle) (n=21)	INFECTADO PELO HTLV-1			Valor-p
		Assintomático (n=27)	Possível HAM/TSP (n=32)	HAM/TSP (n=28)	
Gênero					
Masculino	12 (57,1%)	13 (48,1%)	8 (25,0%)	3 (10,7%)	0,001*
Feminino	9 (42,9%)	14 (51,9%)	24 (75,0%)	25 (89,3%)	
Idade					
Média	42	51	49	58	
Mediana	42	52	51	58	
Desvio- padrão	10	12	12	9	<0,001***
Mínimo	28	19	31	34	
Máximo	60	69	72	72	

*Teste Qui-quadrado

***Teste Kruskal-Wallis

TABELA 3

Distribuição comparativa por grupo dois a dois de 108 indivíduos subdivididos entre os grupos controle, assintomático, possível HAM/TSP (pHAM) e HAM/TSP em relação às variáveis sociodemográficas gênero e idade. Belo Horizonte, 2008 – 2010.

COMPARAÇÕES 2 x 2	Gênero				Idade			
	p	OR	IC 95%		p	OR	IC 95%	
			Lim. Inf.	Lim. Sup.			Lim. Inf.	Lim. Sup.
Controle X Assintomático	0,536	1,436	0,456	4,524	0,004	1,076	1,017	1,139
Controle X pHAM	0,018	4,000	1,232	12,989	<0,001	1,066	1,009	1,127
Controle X HAM/TSP	<0,001	11,111	2,537	48,657	0,025	1,156	1,070	1,249
Assintomático X pHAM	0,064	2,786	0,927	8,369	0,451	0,986	0,943	1,031
Assintomático X HAM/TSP	0,002	7,738	1,879	31,874	0,032	1,058	1,002	1,118
pHAM X HAM/TSP	0,154	2,778	0,658	11,727	0,003	1,076	1,019	1,137

*Teste qui-quadrado **Teste Mann-Whitney (com correção Bonferroni – valor-p<0,02)

5.3 Dados clínicos

Constatou-se diferença entre os grupos para todas as dificuldades listadas, que foram mais frequentes no grupo HAM/TSP (TAB. 5).

TABELA 4

Descrição comparativa de 108 indivíduos subdivididos entre os grupos controle (21), assintomático (27), possível HAM/TSP (32) e HAM/TSP (21) em relação às alterações motoras encontradas, Belo Horizonte, 2008 - 2010.

COMPARAÇÕES 2 x 2	Dificuldades				
	Deambular	Correr	Pular	Subir escadas	Descer escadas
Controle X Assintomático	0,186	0,186	**	0,574	0,574
Controle X pHAM	0,069	0,069	0,002	0,029	0,029
Controle X HAM/TSP	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Assintomático X pHAM	<0,001	<0,001	0,001	0,002	0,002
Assintomático X HAM/TSP	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
pHAM X HAM/TSP	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

*Teste exato Fisher (com correção Bonferroni – valor-p<0,02); **Nenhum controle ou assintomático apresentou essa dificuldade.

Observa-se na TAB. 6 que o grupo HAM/TSP é o que apresenta mais alterações com diferenças estatisticamente significativas nas comparações dois a dois no exame neurológico.

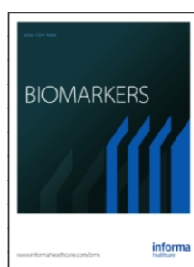
TABELA 5

Análise comparativa de 108 indivíduos subdivididos entre os grupos controle, assintomático, possível HAM/TSP e HAM/TSP quanto às alterações encontradas na avaliação neurológica Belo Horizonte 2008-2010.

COMPARAÇÕES 2 x 2	Alteração			Romberg
	Reflexo	Força	Marcha	
Controle X Assintomático	0,771	0,999	0,999	0,999
Controle X pHAM	0,037	0,070	0,999	0,118
Controle X HAM/TSP	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Assintomático X pHAM	0,007	0,112	0,999	0,152
Assintomático X HAM/TSP	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
pHAM X HAM/TSP	0,057	<0,001	<0,001	<0,001

*Teste exato Fisher (com correção Bonferroni – valor-p<0,02).

5.5 Artigo: Dados relacionados aos Biomarcadores



Biomarkers



ISSN: 1354-750X (Print) 1366-5804 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/ibmk20>

Immunological signature of the different clinical stages of the HTLV-1 infection: establishing serum biomarkers for HTLV-1-associated disease morbidity

Ana Lúcia Borges Starling, Jordana Graziela Alves Coelho-dos-Reis, Vanessa Peruhype-Magalhães, Marcelo Antônio Pascoal-Xavier, Denise Utsch Gonçalves, Samantha Ribeiro Béla, José Roberto Lambertucci, Ludimila Labanca, Silvio Roberto Souza Pereira, Andréa Teixeira-Carvalho, João Gabriel Ribas, Bruno Caetano Trindade, Lucia Helena Faccioli, Anna Bárbara Freitas Carneiro-Proietti & Olindo Assis Martins-Filho

To cite this article: Ana Lúcia Borges Starling, Jordana Graziela Alves Coelho-dos-Reis, Vanessa Peruhype-Magalhães, Marcelo Antônio Pascoal-Xavier, Denise Utsch Gonçalves, Samantha Ribeiro Béla, José Roberto Lambertucci, Ludimila Labanca, Silvio Roberto Souza Pereira, Andréa Teixeira-Carvalho, João Gabriel Ribas, Bruno Caetano Trindade, Lucia Helena Faccioli, Anna Bárbara Freitas Carneiro-Proietti & Olindo Assis Martins-Filho (2015): Immunological signature of the different clinical stages of the HTLV-1 infection: establishing serum biomarkers for HTLV-1-associated disease morbidity, *Biomarkers*, DOI: [10.3109/1354750X.2015.1094141](https://doi.org/10.3109/1354750X.2015.1094141)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.3109/1354750X.2015.1094141>



Published online: 16 Oct 2015.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 30



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
<http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=ibmk20>

RESEARCH ARTICLE

Immunological signature of the different clinical stages of the HTLV-1 infection: establishing serum biomarkers for HTLV-1-associated disease morbidity

Ana Lúcia Borges Starling^{1,2,3}, Jordana Graziela Alves Coelho-dos-Reis^{1#}, Vanessa Peruhype-Magalhães^{1#}, Marcelo Antônio Pascoal-Xavier^{3,4#}, Denise Utsch Gonçalves³, Samantha Ribeiro Béla¹, José Roberto Lambertucci³, Ludimila Labanca³, Silvio Roberto Souza Pereira³, Andréa Teixeira-Carvalho¹, João Gabriel Ribas⁵, Bruno Caetano Trindade^{1,6}, Lucia Helena Faccioli⁶, Anna Bárbara Freitas Carneiro-Proietti², and Olindo Assis Martins-Filho^{1#}

¹Centro De Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ-Minas, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, ²Fundação Centro De Hematologia E Hemoterapia De Minas Gerais – HEMOMINAS, Santa Efigênia, Minas Gerais, Brazil, ³Programa De Pós-Graduação Em Infectologia E Medicina Tropical – Faculdade De Medicina Da Universidade Federal De Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, ⁴Department of Anatomic Pathology, Medicine School, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, ⁵Hospital Sarah Kubitschek, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, and ⁶Laboratório De Inflamação E Imunologia Das Parasitoses, Faculdade De Ciências Farmacêuticas De Ribeirão Preto, Universidade De São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

Abstract

This study aimed at establishing the immunological signature and an algorithm for clinical management of the different clinical stages of the HTLV-1-infection based on serum biomarkers. A panel of serum biomarkers was evaluated by four sets of innovative/non-conventional data analysis approaches in samples from 87 HTLV-1 patients: asymptomatic carriers (AC), putative HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (pHAM/TSP) and HAM/TSP. The analysis of cumulative curves and molecular signatures pointed out that HAM/TSP presented a pro-inflammatory profile mediated by CXCL10/LTB-4/IL-6/TNF- α /IFN- γ , counterbalanced by IL-4/IL-10. The analysis of biomarker networks showed that AC presented a strongly intertwined pro-inflammatory/regulatory net with IL-4/IL-10 playing a central role, while HAM/TSP exhibited overall immune response toward a predominant pro-inflammatory profile. At last, the classification and regression trees proposed for clinical practice allowed for the construction of an algorithm to discriminate AC, pHAM and HAM/TSP patients with the elected biomarkers: IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6, IL-4 and CysLT. These findings reveal a complex interaction among chemokine/leukotriene/cytokine in HTLV-1 infection and suggest the use of the selected but combined biomarkers for the follow-up/diagnosis of disease morbidity of HTLV-1-infected individuals.

Keywords

Chemokines, cytokines and morbidity, HAM/TSP, HTLV-1, leukotrienes

History

Received 23 April 2015
Revised 20 July 2015
Accepted 4 September 2015
Published online 15 October 2015

Introduction

The human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) is a delta-type retrovirus, which infects approximately 10–20 million people worldwide (Carneiro-Proietti et al., 2002; Proietti et al., 2005). In addition to adult T-cell leukemia (ATL) (Poesz et al., 1980), HTLV-1 is also involved in the etiology of chronic inflammatory diseases, such as the HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/

TSP) (Gessain et al., 1985; Osame et al., 1986) uveitis (Mochizuki et al., 1992) skin disorders (Coelho-dos-Reis et al., 2013) infective dermatitis (La Grenade et al., 1998; Nishimoto et al., 2009; Primo et al., 2005) and may also be associated with arthropathies, polymyositis and Sjögren syndrome (Taylor & Matsuoka, 2005).

While the majority of infected individuals remain lifelong asymptomatic carriers (ACs), the HTLV-associated diseases can occur in the minority, approximately 3% develop ATL (Tajima et al., 1990) and other 4% develop HAM/TSP (Hisada et al., 2004; Nakagawa et al., 1995; Osame M et al., 1986, 1990). Regarding the inflammatory disorders associated with HTLV-1 infection, several immunological factors seem to be involved in the HTLV-1/host interaction influencing the clinical evolution of HTLV-1-infected subjects from asymptomatic status to HAM/TSP (Starling et al., 2013).

HAM/TSP is a neuroinflammatory disease characterized by a chronic progressive myelopathy with infiltrating

[#]Jordana Graziela Alves Coelho-dos-Reis, Marcelo Antônio Pascoal-Xavier, Vanessa Peruhype-Magalhães and Olindo Assis Martins-Filho are responsible for statistical design/analysis. E-mail: jordana.reis@cpqrr.fiocruz.br (J. G. A. Coelho-dos-Reis); mpascoal@medicina.ufmg.br (M. A. Pascoal-Xavier); vanessa@cpqrr.fiocruz.br (V. Peruhype-Magalhães); oamfilho@cpqrr.fiocruz.br (O. A. Martins-Filho)

Address for correspondence: Jordana Graziela Alves Coelho-dos-Reis, Av. Augusto de Lima, 1715, Barro Preto, 30.190-002 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Tel/Fax: +55 3133497764. E-mail: jordana.reis@cpqrr.fiocruz.br

mononuclear cells in the area of demyelination and axonal dystrophy (Cooper et al., 2009). The chronic pro-inflammatory process caused by HTLV-1 is characterized by spontaneous *in vitro* T cell proliferation (Lunardi-Iskandar et al., 1993; Sibon et al., 2006) and by elevated *ex vivo* production of IFN- γ and TNF- α by the peripheral blood mononuclear cells (Brito-Melo et al., 2001; Carvalho et al., 2001). Moreover, IL-2 and metalloproteinases produced by HTLV-1-infected lymphocytes are potentially inflammatory and may damage the central nervous system (Biddison et al., 1997; Kubota et al., 2002; Muniz et al., 2006). The monocytic cells produce high level of leukotrienes (LTs), mainly Cys type, which also appear to be involved in the progression of the HTLV-neurologic disease (Trindade et al., 2012).

While the pro-inflammatory immunological environment in HAM/TSP was well-scrutinized over the years, little is known about the predictive value of the inflammatory biomarkers to distinguish the asymptomatic stage from the early phase of HAM/TSP. Considering such lack of information on the diagnostic value of these immunological molecules and their importance on HTLV-1 infection, this study aimed at establishing the immunological signature of different clinical status of the HTLV-1 infection as well as the interaction between these molecules in the different clinical statuses evaluated with the ultimate goal of understanding the power of these molecules as biomarkers of disease morbidity.

Materials and methods

Study population

This was a transversal study comprised of 108 participants that belong to a cohort study of former blood donors infected by HTLV, all living in Minas Gerais, Brazil. This cohort has been followed by the HTLV Interdisciplinary Research Group (Grupo Interdisciplinar de Pesquisa em HTLV – GIPH) since 1997 concerning the clinical and immunological aspects of this infection.

Different spectrums of the HTLV-1-associated outcome other than HAM/TSP were included in this study in order to identify possible biomarkers that may present prognostic value. In this respect, HTLV-1 carriers with no symptoms (AC) and patients with initial symptoms, but without full clinical diagnosis of HAM/TSP (putative HAM/TSP), were included in this study.

Participants were diagnosed as infected with HTLV-1, if they presented positive serology for HTLV-1, both by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test and western blot (WB) test. As described in Box 1, 87 HTLV-1 infected patients were categorized according to their clinical status as ACs (AC=27), patients with putative HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (pHAM/

TSP=32) and patients with defined HAM/TSP (HAM/TSP=28). In addition, a group of 21 healthy blood donors with negative HTLV-1 serologic tests (ELISA and WB tests) were included as an uninfected control group.

All the participants were submitted to serologic screening for blood-borne pathogens and showed negative serology for *Trypanosoma cruzi*, *Treponema pallidum*, HBV, HCV and HIV infections.

This study was approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Minas Gerais, protocol ETIC 090/07 and the Research Ethics Committee of Hemominas – protocol n 83/2007. Free and informed consent forms were obtained from all participants.

Flow cytometry quantitative analysis of serum chemokines and cytokines

The serum levels of chemokines (CXCL8/IL-8, CCL5/RANTES, CXCL9/MIG, CCL2/MCP-1, CXCL10/IP-10) and cytokines (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α and IFN- γ) were measured in serum samples from all patients. The samples were centrifuged at 4000g for 15 min at 18 °C, aliquoted and stored at -20 °C until analysis. The serum chemokines and cytokines were quantified using the Cytometric Bead Array (CBA) System, Becton Dickinson (BD) according to Peruhype-Magalhaes et al. (2006). Data acquisition was achieved by flow cytometry using a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, La Jolla, CA).

Leukotrienes immunoassay

A specific enzyme-linked immunoassay (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI) was used to quantify LTB₄ and CysLT in serum samples as recommended by the manufacturer. Serum samples stored at 27 °C were purified on Waters C18 Sep-Pak cartridges (Waters Associates, Milford, MA), spun dried in a vacuum centrifuge, and reconstituted in assay buffer prior to performing the assay.

Analysis of biomarker signatures

The biomarker signature was assembled as previously reported by Costa-Silva et al. (2014). The frequency of ‘‘high’’ and ‘‘low’’ producers was defined according to the global median values. The median values of all data set were calculated for each biomarker in a blind manner prior to assigning the groups. The median value for each biomarker was utilized as a cut-off in such a way that patients with results for a particular biomarker above the global median value were attributed as high producers, whereas a patient with a result lower than the global median value was assigned as a low producer. In is important to consider that the concept of ‘‘high’’ and ‘‘low’’

Box 1. Study population.

		Gender		Median age (Min and max)
		Male	Female	
Healthy controls	(n=21)	12 (57.1%)	9 (42.9%)	42 (28–60)
Asymptomatic carriers (AC)	(n=27)	13 (48.1%)	14 (51.9%)	52 (19–69)
putative HAM/TSP (pHAM)	(n=32)	8 (25.0%)	24 (75.0%)	51 (31–72)
HAM/TSP	(n=28)	3 (10.7%)	25 (89.3%)	58 (34–72)

producer only applies to the present data set and the global median values should only be taken as a threshold for this specific study population. Following, the “ascendant biomarker signature” for each group was then assembled and compared. Additionally, the “ascendant biomarker signature” for each clinical group was also assembled and overlaid to identify changes in the overall biomarker profile.

Biomarker network analysis

Biomarker networks were assembled to assess the association between the serum chemokines, leukotrienes and cytokines for each clinical group. Spearman’s correlation test was performed to assess the association between serum biomarker levels (pg/mL). The positive and negative correlations were significant when p value <0.05 . Cytoscape (version 2.8, San Diego, CA), an open source software, was used for composing networks of interactions among biomolecules in order to better represent the interactivity among the molecules tested (Shannon et al., 2003). The biomarker networks were constructed using three layouts, one for each biomarker category (chemokine, leukotrienes and cytokine) represented by globular nodes to underscore the biomarkers with “High” levels (●) as compared to those with “Low” levels (○). Connecting edges display underscore negative (—), moderate (—) and strong (—) as proposed by Taylor (1990).

Data analysis

Three sets of innovative/non-conventional data analysis approaches for observational investigation of the immune response related to the HTLV-1 infection were applied: (1) Gehan–Breslow–Wilcoxon test, (2) biomarker signature analysis, (3) serum biomarker networking and (4) logistic regression and classification tree. These approaches have been shown to be relevant to detect, with high sensitivity, putative changes in the cytokine signatures that are not detectable by conventional statistical approaches.

Gehan–Breslow–Wilcoxon test

This cumulative frequency analysis is usually employed to compare survival curves. The method can be applied to identify relevant differences in the cumulative frequency of subjects with a given biomarker serum level among groups. The dashed line underscore when the number of patients achieved 80% of the sample size and at the significant difference at $p < 0.05$ highlighted on graphs by brackets between groups as shown in Figure 1. The Graphpad Prism 5.0 software (San Diego, CA) was used data analysis and graph arts.

Biomarker signature analysis

The use of this approach to identify relevant differences in the chemokine/cytokine/LT signatures between the groups has been adapted from a pioneering study by Costa-Silva et al. (2014). Initially, serum levels of cytokines/chemokines/leukotrienes were initially classified as “low” or “high” based on the global median (as the cut-off) as proposed by Costa-Silva et al. (2014). Each data set was assembled in gray-scale diagrams in order to calculate the frequency “high producers” within each clinical group. Relevant frequencies

were considered when above 50% of the study group. Following, ascendant biomarkers signatures for AC, pHAM and HAM/TSP were assembled and overlaid to point out for each clinical groups the biomarkers with relevant “high” levels ($\geq 50\%$) as highlighted by black rectangles. The Graphpad Prism 5.00 software was used for graph arts.

Serum biomarker network

To evaluate the association between chemokine, leukotrienes and cytokines, the Spearman’s correlation test and significance were calculated and statistically significant differences were considered if p value <0.05 . The correlation index (r) was used to categorize the correlation strength as negative ($r < 0$), moderate ($0.36 > r < 0.67$) and strong ($r > 0.68$) as proposed by Taylor (1990) (Figure 4). The Graphpad Prism 5.0 software was used for data analysis and the Cytoscape (version 2.8) used for assembling networks.

Logistic regression and classification tree

To establish a relationship between HTLV-1-associated disease and changes in serum biomarker, we fitted the stereotype ordinal logistic regression model, $\log[\pi_j/\pi_{AC}] = \alpha_j + \theta_j\beta_i x_i$, where $j = 2, 3$ represents the pHAM and HAM/TSP classes, respectively, and i represents the biomarker expression, and estimate the value of β as proposed by Anderson (1984). We used the distributions of variables in the control group for categorization of the biomarkers and log-likelihood method for to test the coefficient significance. In order to classify the elements of the sample and to apply the data set in clinical practice we used discriminant analysis and classification and regression tree (CART), respectively. A result was considered statistically significant when the $p < 0.05$. We performed the statistical analyses with the VGAM, Rpart, Rattle, Rpart.plot, RColorBrewer, Party, Partykit Caret packages of the R statistical software (Version 2.15.3; <http://www.r-project.org>).

Results

The concentration of chemokines, leukotrienes and cytokines is altered in patients with different clinical status of HTLV-1 infection

Figure 1 shows the results of concentration of chemokines, leukotrienes and cytokines in the sera of asymptomatic (AC), putative HAM/TSP (pHAM) and HAM/TSP (HAM/TSP) patients. The gray rectangles express the concentration range in healthy blood donors (first and third tertiles). It was possible to observe that the HAM/TSP group presented statistically higher levels of CXCL9, CXCL10, CysLT, IL-6, IFN- γ , TNF- α when compared to pHAM. In parallel, the levels of CysLT, IL-6, IFN- γ , TNF- α and IL-4 in HAM/TSP were significantly higher when compared to AC.

Biomarker cumulative curves analysis demonstrated a predominant pro-inflammatory profile in HAM/TSP patients

Figure 2 shows the cumulative frequency (%) of subjects according to their chemokine, leukotriene and cytokine

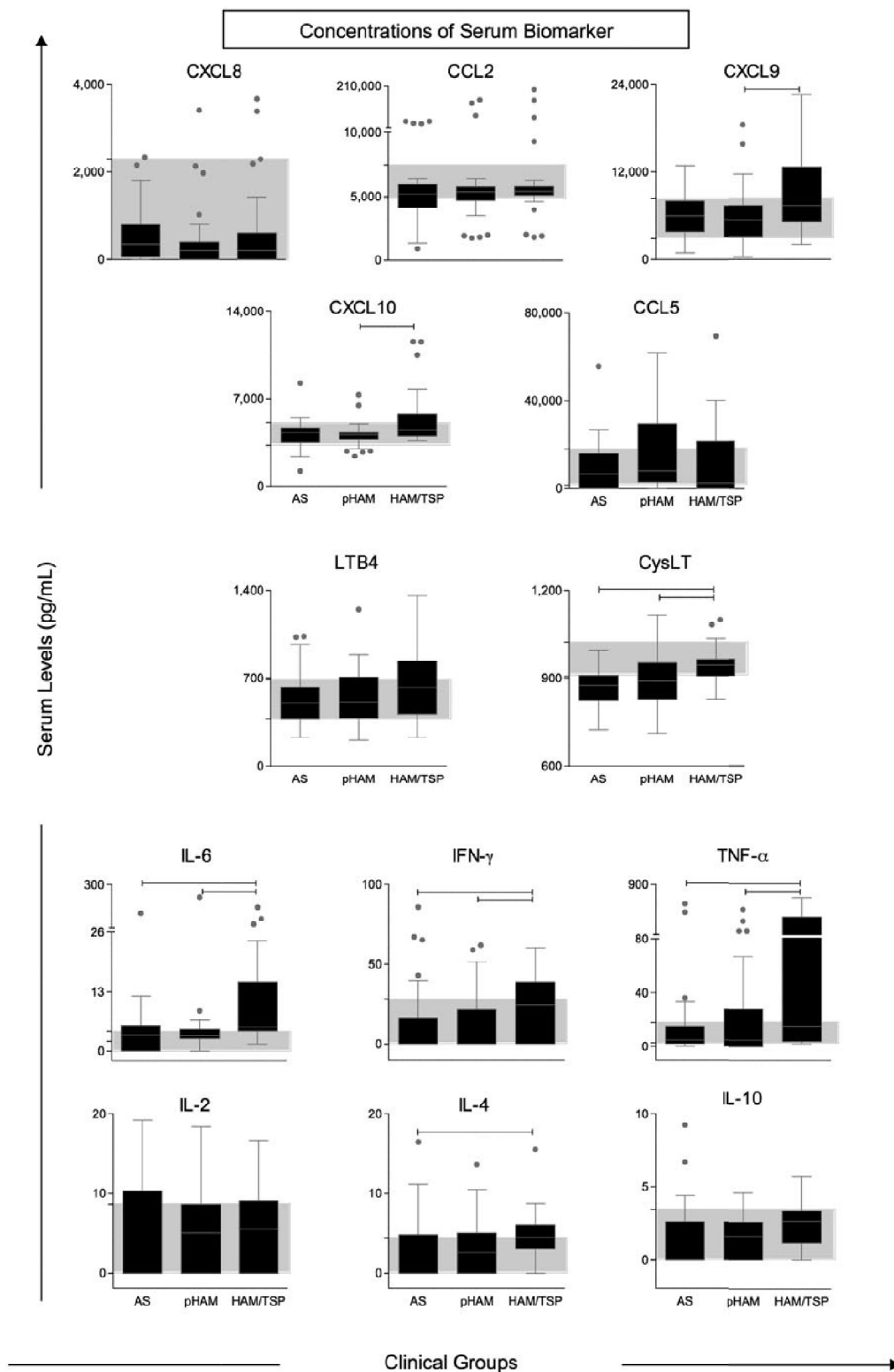


Figure 1. Quantitative biomarker measurements were performed to identify the serum levels of IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6, IL-4, IL-2, CXCL10, CCL2, CXCL9, CCL5, CXCL8, LTB₄ and CysLT as described in the "Materials and methods" section. Results are expressed as box-and-whiskers plot. Gray rectangles demonstrate the range of concentrations observed in healthy blood donors (first and third quartiles). Statistical differences at $p < 0.05$ are displayed as connecting lines.

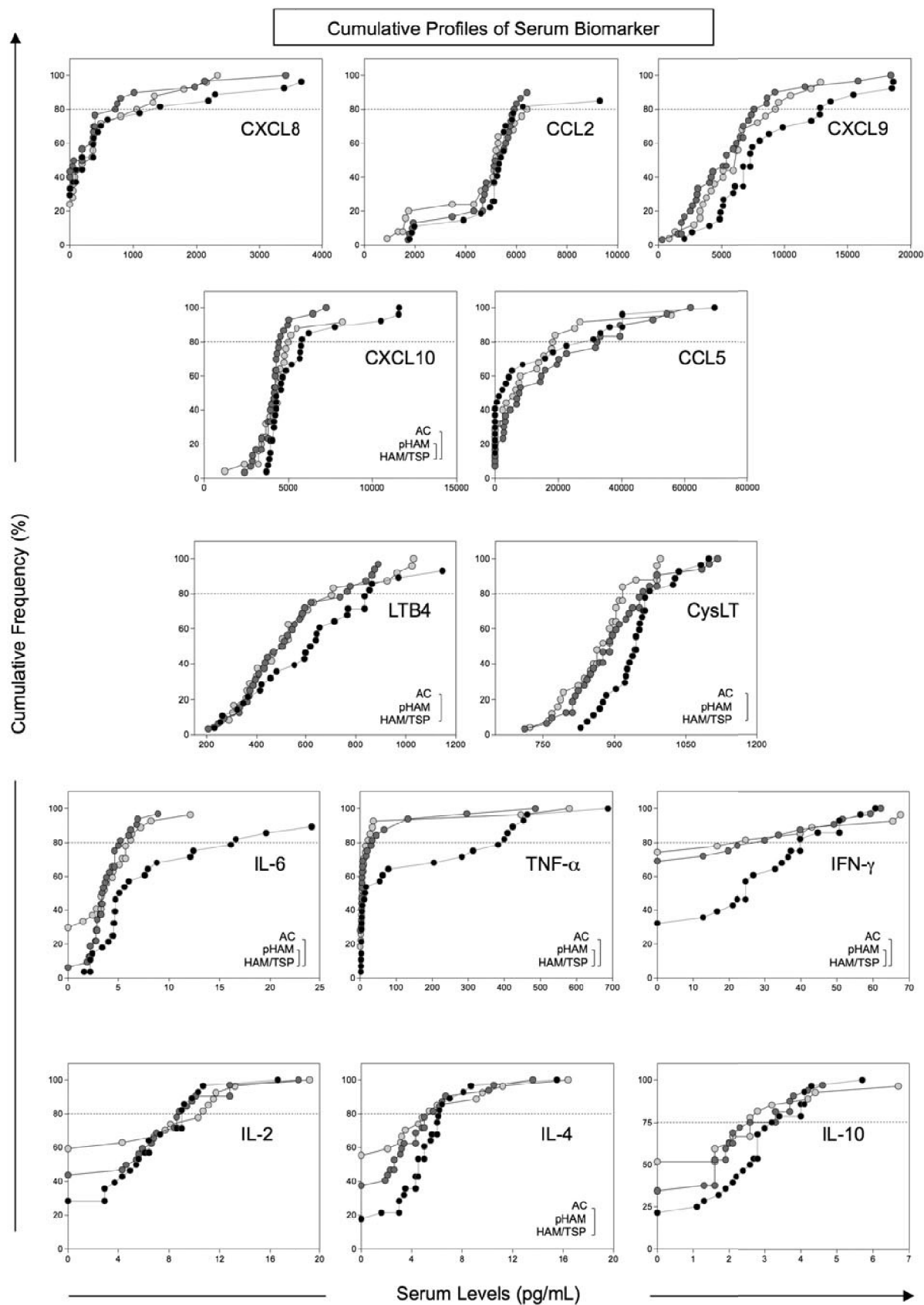


Figure 2. Cumulative frequency (%) of serum chemokines, leukotrienes and cytokines in HTLV-1 infected patients and healthy controls. HTLV-1 patients were categorized according to their clinical records as asymptomatic carrier (AC=○), patients with putative HTLV-1 associated mielopathy (pHAM=◐) and patients with HTLV-1 associated mielopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP=●). The results are expressed as cumulative percentages of subjects with a given serum level of each biomarker expressed as pg/mL. The statistical analysis was carried out by Gehan-Breslow-Wilcoxon Test and significant differences among groups at $p < 0.05$ highlighted by brackets on the graphs. The dashed line underscore when the number of patients achieved 80% of the sample size.

6

sera levels. Data analysis was performed using the Gehan–Breslow–Wilcoxon test to identify differences between sets of cumulative curves. Dashed lines were used to illustrate the maximum sera levels of each biomarker produced by 80% of individuals in each clinical group. Data analysis demonstrated that HAM/TSP group has a CXCL10 cumulative curve that is shifted toward higher values as compared to AC and pHAM groups. No difference was observed to CXCL8, CCL2, CXCL9 and CCL5 cumulative curves.

HAM/TSP groups also demonstrated distinct LTB₄ cumulative curve shifted to higher values as compared to AC groups. However, AC clinical group showed CysLT cumulative curve deviated toward reduced values as compared to HAM/TSP groups. CysLT cumulative curves for pHAM were also with frequency peak in lower levels of this molecule as compared to healthy controls.

The analysis of cytokine demonstrated that the inflammatory cytokines IL-6, TNF- α and IFN- γ cumulative curves were significantly shifted toward higher serum levels in HAM/TSP group as compared to AC and pHAM groups. Moreover, HAM/TSP also displayed cumulative curve peaks in higher levels for IL-4 as compared to AC groups. No difference was observed for IL-2 and IL-10 cumulative curves.

Enhanced frequency of cytokine and leukotrienes “high-producers” was observed in HAM/TSP patients

Serum levels of cytokines/chemokines/leukotrienes were initially classified as “low” or “high” based on the global median (Figure 3). The number of subjects for each biomarker varied depending on the total number of tested samples included in each group (Figure 3A). Each data set was assembled in black and white diagrams in order to calculate the frequency of “high producers” within each clinical group (Figure 3A). After establishing the frequency of high producers for each biomarker, these frequencies were organized in an ascendant fashion and a curve of biomarkers was built for each clinical group. In order to select the relevant biomarkers for each group, it was established a 50% cut-off corresponding to the frequency of high producers among groups (Figure 3B). Data analysis demonstrated that the majority of serum biomarkers tested in HAM/TSP remained above the 50% threshold (CXCL10, IL-2, CCL2, TNF- α , IL-10, CXCL9, LTB₄, IFN- γ , IL-4, IL-6 and CysLT), while only few of them were above this threshold in AC (CXCL8 and CXCL10) and pHAM (IL-2, CCL2 and CCL5) curves. Below the ascendant curve, it is highlighted in black the biomarkers which were above 50% (Figure 3B).

A strong connection of the pro-inflammatory/regulatory network is observed in AC, whereas CysLT seems to interfere in the IL-4/IL-10 regulatory axis in HAM/TSP patients

Aiming at accessing the dynamics of interaction between chemokines, leukotrienes and cytokines in HTLV-1 infected patients; we have assembled the biomarkers network based on the significant Spearman correlation indices. Black circles refer to elevated frequency of high producers of this

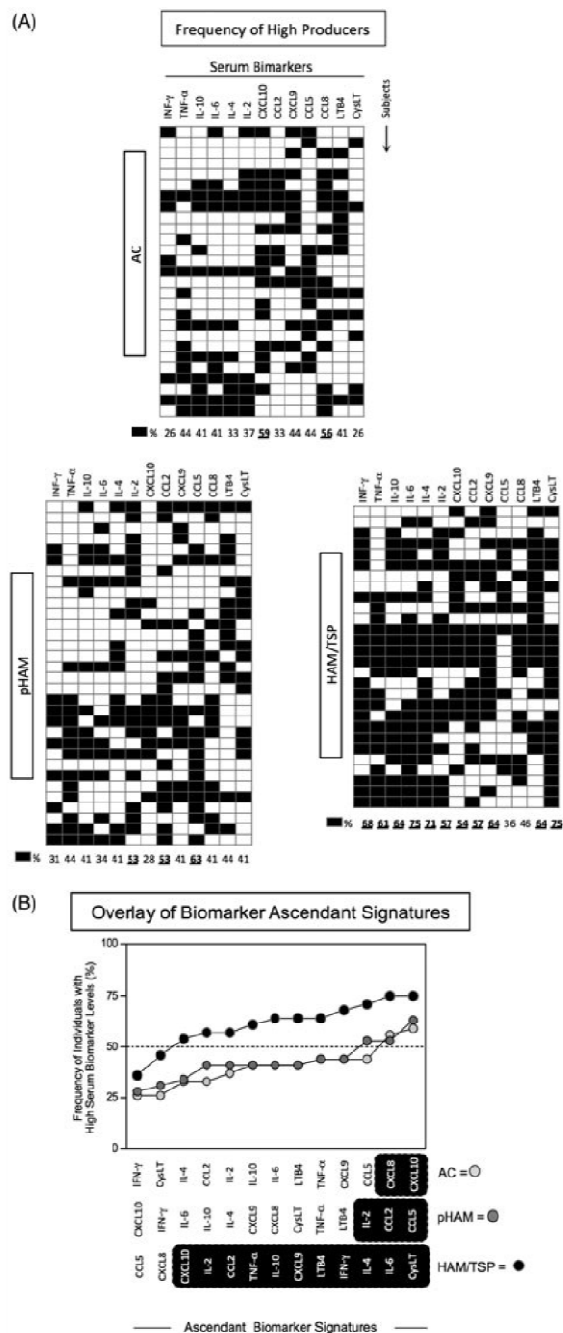


Figure 3. Establishment of serum biomarkers ascendant curve of the frequency of “high producers” in HTLV-1 infected patients. Quantitative biomarker measurements were performed to identify the serum levels of IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6, IL-4, IL-2, CXCL10, CCL2, CXCL9, CCL5, CXCL8, LTB₄ and CysLT. (A) Black-and-white diagrams were used to assemble to calculate the final frequency of “high producers” for each clinical group. Relevant frequencies of “higher producers” ($\geq 50\%$) are highlighted by underline format. Subjects were categorized as low (white) or high (black) producers based on their serum biomarker level, according the global data median distribution. The HTLV-1 patients were categorized according to their clinical records as asymptomatic carrier (AC), patients with putative HTLV-1 Associated Myelopathy (pHAM) and patients with HTLV-1 Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP). ND, not determined levels. (B) Overlay of ascendant biomarkers signatures of AC(○), pHAM(●), HAM (●) was assembled and the biomarkers with frequency higher or equal to the 50th percentile are highlighted by black rectangles in the panel below the curve.

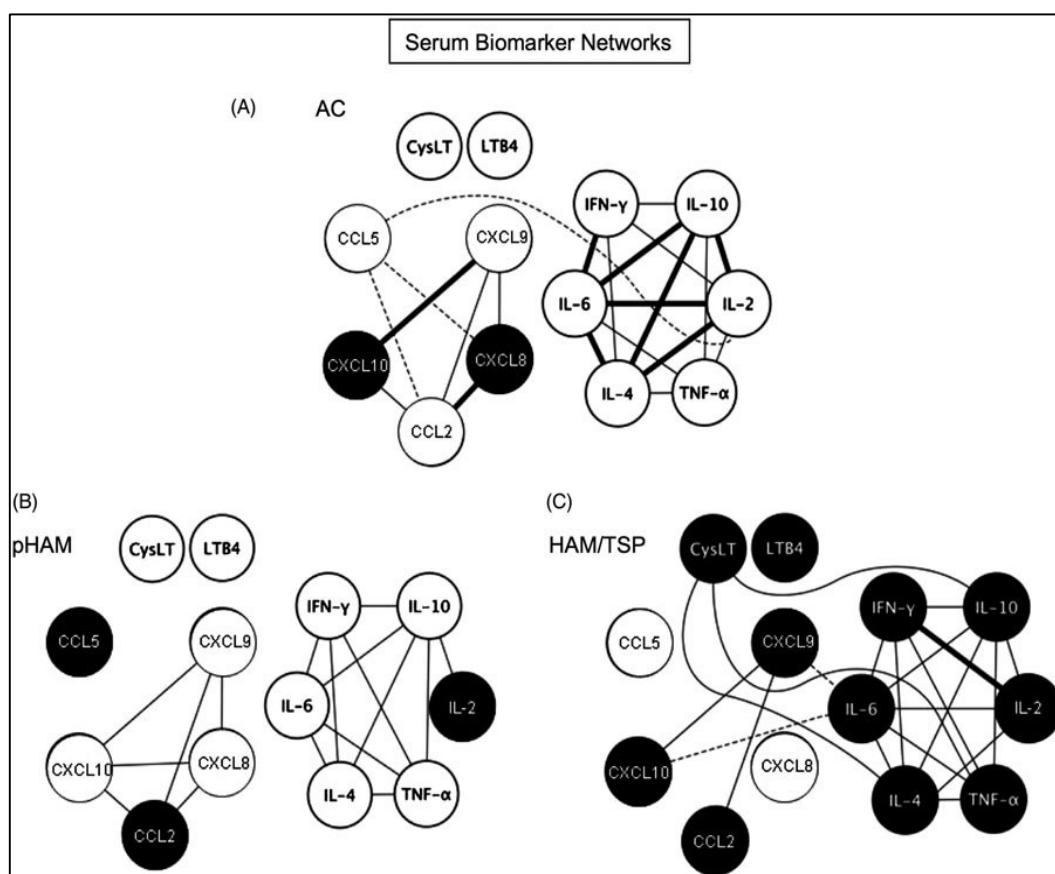


Figure 4. Biomarker networks in AC, pHAM and HAM/TSP. (A) Chemokine, leukotriene and cytokine nodes were assembled to point out significant differences in the serum levels (low=○ and high=● producers) as well as the biomarkers correlation indexes among groups (negative __; moderate — and strong — positive correlation).

biomarker (Figure 4). AC presented a strongly connected pro-inflammatory/regulatory cytokine network with IL-4 and IL-10 representing central hinges, as demonstrated by the axes IL-6/IL-4/IL-2 and IL-6/IL-10/IL-2 (Figure 4A). No participation of leukotrienes CysLT and LTB₄ was observed in the AC or pHAM networks (Figure 4B).

In HAM/TSP patients, there was a clear up-regulation of pro-inflammatory cytokines, including CysLT, LTB₄, IL-6, TNF-α and IFN-γ with a relevant bridge composed of a strong correlation between two essential mediators such as IFN-γ and IL-2. Although there was a parallel increase in the frequency of high serum levels of IL-4 and IL-10, a clear arm of CysLT counterbalanced the putative regulatory activity of IL-4 and IL-10. Moreover, a complementary arm between CysLT and TNF-α further favored a shift of the immune response toward a predominant pro-inflammatory response in HAM/TSP patients (Figure 4C).

An additional analysis of biomarker connections revealed that despite the differences in the magnitude and intensity of the correlations, some preserved axes of pro-inflammatory/regulatory cytokines such as IL-6/IL-4/IL-10/IL-2/IFN-γ and chemokines CXCL10/CXCL9/CCL2/CXCL8 could be observed in all groups (Figure 4). This analysis showed that, independently of the HTLV-clinical status, there was a general pro-inflammatory/regulatory axis composed of IL-6/TNF-α counterbalanced by IL-10 and IL-4 with contributions of

IFN-γ and IL-2 (Figure 4). The hallmark of HAM/TSP-immunological profile was the inclusion on an additional link mediated by CysLT with TNF-α, IL-10 and IL-4. Interestingly, a progressive loss of links between pairs of chemokines can be observed from AC to HAM/TSP clinical groups.

Establishing an algorithm of serum biomarkers for follow up/diagnosis of disease morbidity

The logistic regression analysis selected IFN-γ, TNF-α, IL-10, IL-6, IL-4 and CysLT biomarkers for modeling ($p < 0.25$). Table 1 summarizes the results of first stereotype regression analysis. Among these selected biomarkers, the best settings were with IL-6 and CysLT biomarkers. According to the $\log[\pi_j/\pi_{AC}] = \alpha_j + \theta_j\beta_i x_i$, $j=1, 2$ and $i=IL-6$ and CysLT model (Anderson, 1984) with identifiability constrains ($\theta_{HAM/TSP} = 1, \theta_{AC} = 0$), we estimate $\theta_{pHAM} = 0.70$ and β_i values, and set models $\log[\pi_{HAM/TSP}/\pi_{AC}] = 2.34 + (-0.83)x_{IL6} + (-1.06)x_{CYST}$ for HAM/TSP and $\log[\pi_{pHAM}/\pi_{AC}] = 2.77 + (-0.83)x_{IL6} + (-1.06)x_{CYST}$ for pHAM. The model log-likelihood was -81.92 on 168 degrees of freedom. Deviance residuals of model indicated general goodness of fit of the model to the data obtained. Table 2 summarizes the results of final stereotype regression analysis.

Table 1. Estimated coefficients, standard errors, z-scores, and two-tailed p-values for the fitted stereotype regression model.

Coefficients	Estimate	SE	z-Score	p Value
θ_{AC}	0 ^a	–	–	–
θ_{pHAM}	0.80	0.18	4.38	<0.001
$\theta_{HAM/TSP}$	1 ^a	–	–	–
α_{pHAM}	2.77	0.90	3.07	0.0002
$\alpha_{HAM/TSP}$	2.57	0.87	2.95	0.0003
β_{IFN}	–0.46	0.29	–1.56	0.1184
β_{TNF}	–0.15	0.30	–0.51	0.6074
β_{IL10}	0.63	0.41	1.54	0.1232
β_{IL6}	–0.70	0.38	–1.83	0.0667
β_{IL4}	–0.27	0.29	–0.92	0.3572
β_{CYST}	–1.04	0.32	–3.19	0.0001
Log-likelihood: –79.82 on 164 degrees of freedom				

SE, standard error.

^aIdentifiability constraints.

Table 2. Estimated coefficients, standard errors, z-scores, and two-tailed p-values for the final fitted stereotype regression model.

Coefficients	Estimate	SE	z-Score	p Value
θ_{AC}	0 ^a	–	–	–
θ_{pHAM}	0.70	0.17	3.94	<0.0001
$\theta_{HAM/TSP}$	1 ^a	–	–	–
α_{pHAM}	2.77	0.82	3.37	<0.0001
$\alpha_{HAM/TSP}$	2.34	0.82	2.82	0.0004
β_{IL6}	–0.83	0.30	–2.75	0.0007
β_{CYST}	–1.06	0.32	–3.33	<0.0001
Log-likelihood: –81.92 on 168 degrees of freedom				

SE, standard error.

^aIdentifiability constraints proposed by Anderson (1984).

From the final model above, we calculated the odds ratio (OR) of the IL-6 and CysLT predictors by the $e^{\theta\beta}$ formula (Lunt, 2004). Table 3 represents the OR values for the selected predictors, with confidence intervals and values p . The results indicate substantial decreases in pHAM and HAM/TSP odds of the development related to both IL-6 as CysLT, suggesting a protective role of these biomarkers.

The results of the discriminant analysis of predictors selected by logistic regression are shown in Table 4. Sixteen elements of pHAM group and 14 elements of HAM/TSP group were classified incorrectly, resulting in the following percentage of correct answers: 50% for pHAM group and 57% for HAM/TSP group. These hit ratios indicate limited quality of the discriminant function of IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6, IL-4 and CysLT predictors between pHAM and HAM/TSP groups.

The method CART proposed for clinical practice classification of the IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6, IL-4 and CysLT biomarkers created a rule among these predictors to identify the three clinical groups of HTLV disease: AC, pHAM and HAM/TSP (Figure 5). The first initialization variable (“root node”) was CysLT. Using the method of CART, it was possible to propose a classification for each of the biomarkers, meaning that a rule was created to identify the three clinical groups of HTLV disease: AC, pHAM and HAM/TSP. If we count the number of patients with categorized values of CysLT, which are less than 1.5 and at the same time have IL-6 less than 0.5, we will find 11 AC patients. However, if we

Table 3. Results of the logistic regression analysis involving HTLV disease and IL6 and CYST predictors.

	OR pHAM	OR HAM/TSP
IL-6	0.55	0.43
CysLT	0.47	0.34

Table 4. Summary of quadratic discriminant analysis between HTLV disease groups for predictors IFN, TNF, IL10, IL6, IL4 and CYST.

Put into Group	True group		
	AS	pHAM	HAM/TSP
Classification			
AS	22	10	8
pHAM	3	16	4
HAM/TSP	2	6	16
Total N	27	32	28
N correct	22	16	16
Proportion	0.815	0.500	0.571
<i>N</i> =87; <i>N</i> correct = 54; proportion correct = 0.621			
Classification with cross-validation			
AS	19	12	9
pHAM	4	11	6
HAM/TSP	4	9	13
Total N	27	32	28
N correct	19	11	13
Proportion	0.704	0.344	0.464
<i>N</i> =87; <i>N</i> correct = 43; proportion correct = 0.494			

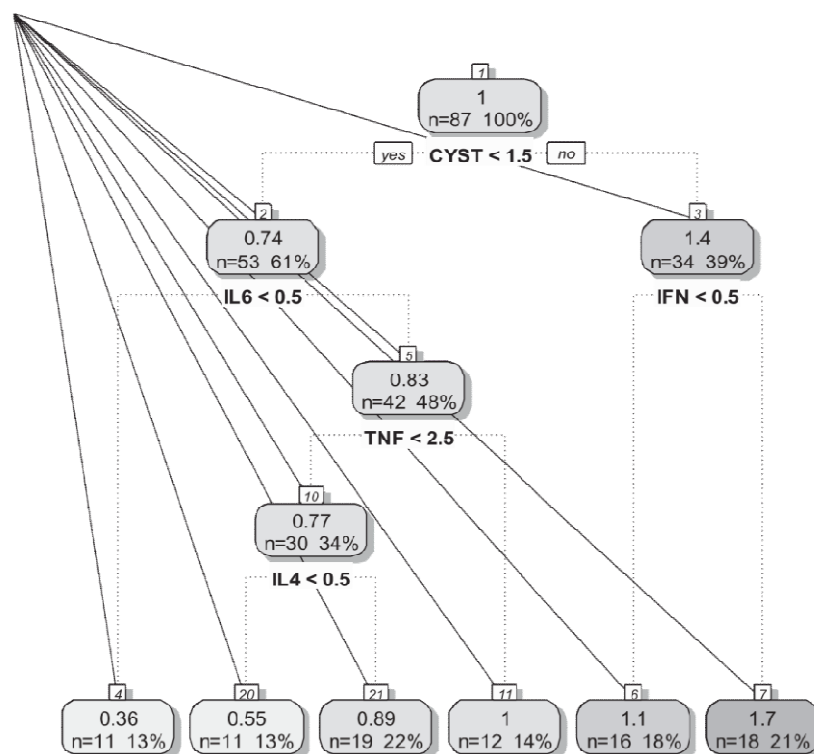
count the number of patients with categorized values of CysLT, which are greater than 1.5 and at the same time have IFN- γ greater than 0.5, we will find 18 HAM/TSP patients. Between the extremes AC and HAM/TSP shown in Figure 5, combinations of values of TNF- α and IL-4 biomarkers greater than 2.5 and 0.5, respectively, with IL-6 values greater than 0.5 favored the pHAM group.

Discussion

During the chronic infection by HTLV-1, the virus induces a strong activation and proliferation of many subsets of cells, especially T cells. HTLV-1 preferentially persists in the host by clonal expansion of CD4⁺ T-cells of the infected host and by viral synapses (Sibon et al., 2006; Umeki et al., 2009). There are evidences that the immunological profile of HAM/TSP patients is composed by a robust pro-inflammatory response (Zane et al., 2009), contrasting with ATL patients. Increased levels of Type-1/2 cytokines such as IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-9 and IL-13 are found in HAM/TSP (Bangham & Osame, 2005; Goon et al., 2002, 2003; Jacobson et al., 1990; Montanheiro et al., 2009), whereas asymptomatic HTLV-1 carriers display a balanced response characterized by high frequency of IL-10 secreted by CD4⁺ and CD8⁺ T-cells (Brito-Melo et al., 2001).

Doubtless, there is an essential role of pro-inflammatory and regulatory mediators involved in the progression of disease as well as a protection against the development of inflammatory symptoms. Even though the immunological status of HAM/TSP and the AC have been scrutinized, some patients that have borderline diagnosis are difficult to

Figure 5. Classification and regression trees (CARTs) of the selected biomarkers: IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6, IL-4 and also the leukotriene CysLT in the identification of AC, pHAM and HAM/TSP groups. *N*=sample size; the number on top correspond to odds ratio and the percentage corresponds to the group frequency in that condition.



characterize by the laboratorial methods currently available. The HTLV-1 proviral load has been largely utilized as a prognostic laboratorial biomarker, however, HTLV-1-infected individuals without myelopathy can present high HTLV-1 proviral load, which prevents the use of this molecular test from being the gold standard to define HAM/TSP (Taylor, 1998). In addition, despite the clear evidence of a vigorous inflammatory response in HAM/TSP, there is no clear standardization of the immunological markers that are suitable for the follow-up of either HTLV-1-ACs or putative HAM/TSP individuals.

In the present study, the cytokine, chemokine and leukotriene secretion profile of healthy blood donors, ACs, putative HAM/TSP and HAM/TSP were evaluated and refined diagnostic measurements were performed in order to establish an immunological signature that would lead to the design of a panel of markers for monitoring disease progression. Networks composed of the correlations among cytokines, chemokines and leukotrienes were built for each group in order to verify the differences in the interactions. In addition, the CARTs proposed for clinical practice allowed the construction of an algorithm to discriminate AC, pHAM and HAM/TSP individuals with the elected biomarkers: IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6, IL-4 and CysLT. To the best of our knowledge, this is the first proposal of an algorithm based on serum biomarkers applied to the clinical management of HTLV-1-infected people.

The results obtained in the present study confirm previous results from other cohorts (Muniz et al., 2006), showing that there is a strong pro-inflammatory response in HAM/TSP. The secretion profile of inflammatory cells produced by

HAM/TSP group was established in order to create an immunological signature of these subjects.

The cumulative frequency of the serum concentration of IL-6, TNF- α , IFN- γ and CXCL10 was higher in the HAM/TSP when compared to the AC and pHAM groups. A higher cumulative frequency of IL-4, LTB₄ and CysLT in the HAM/TSP when compared to AC group was observed. The immunological signature delineated for the HAM/TSP group was mostly composed by increased secretion of the cytokines IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-10, and also LTB₄ and CysLT, which supports the present findings obtained by the cumulative frequency of the serum concentration of these molecules.

These cytokines have important pro-inflammatory activity and performs a central role in the coordination of the inflammatory response. Moreover, classical studies have already demonstrated that higher concentration of IL-6 and TNF- α can be observed in HTLV-1-infected individuals (Jeffery et al., 1999; Lal & Rudolph, 1991).

We have found that IL-4, a cytokine involved in controlling inflammation, was higher in the HAM/TSP group. This finding is not in accordance with previous studies, which showed that HAM/TSP evolves to a prominent and uncontrolled pro-inflammatory process (Brito-Melo et al., 2001; Jeffery et al., 1999; Nishimoto et al., 1990). The serum concentration of IL-10, another regulatory cytokine, was high in HAM/TSP group as well as in the other HTLV-1 groups. It is known that the HTLV-1-ACs have an immune-modulated response that controls inflammation (Starling et al., 2013). Maybe, the HAM/TSP-signature of pro-inflammatory profile associated to IL-4 and IL-10 is yet an attempt of the

immunological system of keeping the control of the inflammation.

When taking into consideration the interaction between molecules, the presence of CysLT reinforces the role of the inflammatory axis since this molecule is involved in events such as increased vascular permeability and cell trafficking. Interestingly, the pHAM group demonstrates an intermediate profile between AC and HAM/TSP. Even without strong correlations and leukotriene interactions, the increased production of RANTES and IL-2 in this group may suggest a possible switching to a pro-inflammatory profile.

The analysis of the HTLV-1 groups with and without myelopathy clarified the essential role of pro-inflammatory and regulators mediators involved in the control of viral load and progression of the disease. Besides, the presence of CysLT composing the inflammatory net may contribute to the events such as increased vascular permeability and cell trafficking. Considering that leukotrienes and TNF- α are key biomolecules in the development of the inflammatory process that leads to HAM/TSP as identified in this study, it is essential to consider the possibility of testing the selective leukotriene receptor antagonists and anti-TNF- α antibody therapy for the treatment of patients in future larger studies.

The present results demonstrated that studying the cytokine microenvironment is important to the analysis of the balance of proinflammatory/regulatory biomarkers. The correlation among these mediators brought more information about the role of this network of molecules analyzed as possible biomarkers of neurological disease progression during HTLV-1 infection.

Conclusion

The molecules IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6, IL-4 and also the leukotriene cysteinyl leukotrienes are demonstrated as important biomarkers of HAM/TSP and should be taken together as a combined algorithm to follow and identify the HTLV-1-AC that may evolve to neurologic damage.

Acknowledgment

The authors thank the program for technological development in tools for health-PDTIS-FIOCRUZ for the use of its facilities.

Declaration of interest

The authors report no declarations of interest. This work was supported by FAPEMIG and received technical and financial support from HEMOMINAS, FIOCRUZ and the Graduate Program on Tropical Medicine of the Federal University of Minas Gerais (Programa de Pós-Graduação em Infectologia e Medicina Tropical – Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG). O.A.M.F., J.R.L., L.H.F. and A.T.C. are thankful to CNPq for the PQ research fellowship support. J.G.C.-d-R. received fellowship from Programa Nacional de Pós-Doutorado (PNPD/CAPES). This study was conducted with the support of the Grupo Interdisciplinar de Pesquisas em HTLV-1 (GIPH).

References

- Anderson JA. (1984). Regression and ordered categorical variables. *J Roy Stat Soc B Methodol* 46:1–30.
- Bangham CR, Osame M. (2005). Cellular immune response to HTLV-1. *Oncogene* 24:6035–46.
- Biddison WE, Kubota R, Kawanishi T, et al. (1997). Human T cell leukemia virus type I (HTLV-I)-specific CD8⁺ CTL clones from patients with HTLV-I-associated neurologic disease secrete proinflammatory cytokines, chemokines, and matrix metalloproteinase. *J Immunol* 159:2018–25.
- Brito-Melo GE, Peruhype-Magalhaes V, Teixeira-Carvalho A, et al. (2001). Cytokine profile and immunomodulation in asymptomatic human T-lymphotropic virus type 1-infected blood donors. *J Acquir Immune Defic Syndr* 27:1–6.
- Carneiro-Proietti AB, Catalan-Soares B, Proietti FA, GIPH (Interdisciplinary HTLV-1/II Research Group). (2002). Human T cell lymphotropic viruses (HTLV-I/II) in South America: should it be a public health concern? *J Biomed Sci* 9:587–95.
- Coelho-dos-Reis JG, Passos L, Duarte MC, et al. (2013). Immunological profile of HTLV-1-infected patients associated with infectious or autoimmune dermatological disorders. *PLoS Negl Trop Dis* 7: e2328.
- Cooper SA, van der Loeff MS, Taylor GP. (2009). The neurology of HTLV-1 infection. *Pract Neurol* 9:16–26.
- Costa-Silva MF, Gomes LI, Martins-Filho OA, et al. (2014). Gene expression profile of cytokines and chemokines in skin lesions from Brazilian Indians with localized cutaneous leishmaniasis. *Mol Immunol* 57:74–85.
- Gessain A, Barin F, Vernant JC, et al. (1985). Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet* 2:407–10.
- Goon PK, Hanon E, Igakura T, et al. (2002). High frequencies of Th1-type CD4(+) T cells specific to HTLV-1 Env and Tax proteins in patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Blood* 99:3335–41.
- Goon PK, Igakura T, Hanon E, et al. (2003). High circulating frequencies of tumor necrosis factor alpha- and interleukin-2-secreting human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-specific CD4+T cells in patients with HTLV-1-associated neurological disease. *J Virol* 77: 9716–22.
- Hisada M, Stuver SO, Okayama A, et al. (2004). Persistent paradox of natural history of human T lymphotropic virus type I: parallel analyses of Japanese and Jamaican carriers. *J Infect Dis* 190:1605–9.
- Jacobson S, Shida H, McFarlin DE, et al. (1990). Circulating CD8+ cytotoxic T lymphocytes specific for HTLV-I pX in patients with HTLV-I associated neurological disease. *Nature* 348:245–8.
- Jeffery KJ, Usuku K, Hall SE, et al. (1999). HLA alleles determine human T-lymphotropic virus-I (HTLV-I) proviral load and the risk of HTLV-I-associated myelopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:3848–53.
- Kubota R, Soldan SS, Martin R, Jacobson S. (2002). Selected cytotoxic T lymphocytes with high specificity for HTLV-I in cerebrospinal fluid from a HAM/TSP patient. *J Neurovirol* 8:53–7.
- La Grenade L, Manns A, Fletcher V, et al. (1998). Clinical, pathologic, and immunologic features of human T-lymphotropic virus type I-associated infective dermatitis in children. *Arch Dermatol* 134: 439–44.
- Lal RB, Rudolph DL. (1991). Constitutive production of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha from spontaneously proliferating T cells in patients with human T-cell lymphotropic virus type-I/II. *Blood* 78:571–4.
- Lunardi-Iskandar Y, Gessain A, Lam VH, Gallo RC. (1993). Abnormal *in vitro* proliferation and differentiation of T cell colony-forming cells in patients with tropical spastic paraparesis/human T lymphocyte virus type I (HTLV-I)-associated myeloencephalopathy and healthy HTLV-I carriers. *J Exp Med* 177:741–50.
- Lunt M. (2004). Prediction of ordinal outcomes when the association between predictors and outcome differs between outcome levels. *Stat Med* 24:1357–69.
- Mochizuki M, Yamaguchi K, Takatsuki K, et al. (1992). HTLV-I and uveitis. *Lancet* 339:1110.
- Montanheiro PA, Penalva de Oliveira AC, Smid J, et al. (2009). The elevated interferon gamma production is an important immunological marker in HAM/TSP pathogenesis. *Scand J Immunol* 70:403–7.

- Muniz AL, Rodrigues Jr W, Santos SB, et al. (2006). Association of cytokines, neurological disability, and disease duration in HAM/TSP patients. *Arq Neuropsiquiatr* 64:217–21.
- Nakagawa M, Izumo S, Ijichi S, et al. (1995). HTLV-I-associated myelopathy: analysis of 213 patients based on clinical features and laboratory findings. *J Neurovirol* 1:50–61.
- Nascimento MC, Primo J, Bittencourt A, et al. (2009). Infective dermatitis has similar immunological features to human T lymphotropic virus-type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Clin Exp Immunol* 156:455–62.
- Nishimoto N, Yoshizaki K, Eiraku N, et al. (1990). Elevated levels of interleukin-6 in serum and cerebrospinal fluid of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Neurol Sci* 97:183–93.
- Nishiura Y, Nakamura T, Ichinose K, et al. (1996). Increased production of inflammatory cytokines in cultured CD4⁺ cells from patients with HTLV-I-associated myelopathy. *Tohoku J Exp Med* 179:227–33.
- Osame M, Janssen R, Kubota H, et al. (1990). Nationwide survey of HTLV-I-associated myelopathy in Japan: association with blood transfusion. *Ann Neurol* 28:50–6.
- Osame M, Usuku K, Izumo S, et al. (1986). HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet* 1:1031–2.
- Peruhype-Magalhaes V, Martins-Filho OA, Prata A, et al. (2006). Mixed inflammatory/regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon-gamma and interleukin-10 and low frequency of tumour necrosis factor-alpha(+) monocytes are hallmarks of active human visceral Leishmaniasis due to *Leishmania chagasi* infection. *Clin Exp Immunol* 146:124–32.
- Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, et al. (1980). Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:7415–9.
- Primo JR, Brites C, Oliveira MF, et al. (2005). Infective dermatitis and human T cell lymphotropic virus type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in childhood and adolescence. *Clin Infect Dis* 41:535–41.
- Proietti FA, Carneiro-Proietti AB, Catalan-Soares BC, Murphy EL. (2005). Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene* 24:6058–68.
- Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* 13:2498–504.
- Sibon D, Gabet AS, Zandecki M, et al. (2006). HTLV-1 propels untransformed CD4 lymphocytes into the cell cycle while protecting CD8 cells from death. *J Clin Invest* 116:974–83.
- Starling AL, Martins-Filho OA, Lambertucci JR, et al. (2013). Proviral load and the balance of serum cytokines in HTLV-1-asymptomatic infection and in HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *Acta Trop* 125:75–81.
- Tajima K. (1990). The 4th nation-wide study of adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) in Japan: estimates of risk of ATL and its geographical and clinical features. The T- and B-cell Malignancy Study Group. *Int J Cancer* 45:237–43.
- Taylor R. (1990). Interpretation of the correlation coefficient: a basic review. *JDMS* 1:35–9.
- Taylor GP. (1998). Pathogenesis and treatment of HTLV-I associated myelopathy. *Sex Transm Infect* 74:316–22.
- Taylor GP, Matsuoka M. (2005). Natural history of adult T-cell leukemia/lymphoma and approaches to therapy. *Oncogene* 24:6047–57.
- Trindade BC, Sorgi CA, Nicolette LD, et al. (2012). Leukotrienes are upregulated and associated with human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-associated neuroinflammatory disease. *PLoS One* 7:e51873.
- Umeki K, Hisada M, Maloney EM, et al. (2009). Proviral loads and clonal expansion of HTLV-1-infected cells following vertical transmission: a 10-year follow-up of children in Jamaica. *Intervirology* 52:115–22.
- Zane L, Sibon D, Mortreux F, Wattel E. (2009). Clonal expansion of HTLV-1 infected cells depends on the CD4 versus CD8 phenotype. *Front Biosci* 14:3935–41.

6 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Alguns tópicos não abordados no artigo serem descritos a seguir.

6.1 Amostra populacional

Desenvolveu-se o estudo com 21 pacientes no grupo-controle, 27 no grupo assintomático, 32 no grupo possível HAM/TSP e 28 no grupo HAM/TSP em conformidade com o cálculo amostral para eventos raros que estabeleceu um n de 19 indivíduos por grupo. Os pacientes foram selecionados por uma única pesquisadora, a avaliação clínica realizada pelo mesmo clínico e a neurológica por apenas um especialista, com o propósito de se evitar variáveis de confusão.

O tamanho desta amostra (108 participantes) foi comparável à de outros autores. Porto *et al.* (2002) avaliou 37 pacientes, com pesquisa semelhante no desenho, mas diferente na técnica usada para a dosagem de linfocinas. Muniz *et al.* (2006) avaliaram 237 pacientes. No presente estudo, todos os pacientes foram igualmente selecionados, contatados e questionados quanto à presença de queixas gerais e específicas, história pregressa de doenças e medicações em uso e submetidos à coleta de sangue periférico.

6.2 Características epidemiológicas

Conforme observado na TAB. 3, os grupos foram diferentes no que se refere às variáveis idade e gênero, sendo que no grupo-controle houve predominância dos indivíduos do sexo masculino mais jovens, média de 42 anos, e nos grupos HTLV-1 número significativamente maior de mulheres com média de idade maior, variando de 51 anos no grupo assintomáticos a 58 no grupo HAM/TSP. Esta observação corrobora as evidências descritas em outros estudos quanto a maior prevalência da infecção em mulheres com idade acima de 30 anos (MANNIS; HISADA; GRENADE 1999), estas diferenças foram estatisticamente significativas entre os grupos. Na tabela 4 verifica-se que estas diferenças foram estatisticamente significativas entre os grupos CONTROLE x possível HAM/TSP, CONTROLE x HAM/TSP, assintomático x HAM/TSP para a variável gênero e para a variável idade a comparação entre todos os outros grupos exceto os grupos, assintomático x possível HAM/TSP e assintomático x HAM/TSP

6.3 Características clínicas

Pode-se constatar na TAB. 5 que as queixas de dificuldades motoras em membros inferiores e as alterações no exame neurológico TAB. 6 aumentaram significativamente entre os grupos, sendo pior no grupo HAM/TSP. Isso era esperado, por tratar-se de doença na qual ocorre lesão inflamatória crônica medular acometendo tanto a substância branca quanto a cinzenta, especialmente o trato córtico-espinhal lateral (IWASAKI *et al.*, 1992).

As alterações intestinais predominaram nos grupos possível HAM/TSP e HAM/TSP, confirmando os estudos que caracterizam este como um dos sintomas iniciais da doença (LEVIN; JACOBSON, 1997, *apud* NAKAGAWA *et al.*, 1995).

Além do comprometimento medular, os pacientes com HAM/TSP podem apresentar evidências de envolvimento neurológico extra-medular (AYE, Moe Moe *et al.*, 2000; FELIPE L. *et al.*, 2008) o que justifica a ocorrência de queixas auditivas significativamente maior no grupo de indivíduos com HAM/TSP quando comparado aos outros grupos conforme TAB. 3.

7 CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou a importância de IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6, IL-4 e ainda de CysLT como marcadores efetivos da HAM/TSP, possibilitando a utilização dos mesmos em um algoritmo combinado para seguimento e identificação de indivíduos assintomáticos que apresentem risco para desenvolver lesão neurológica.

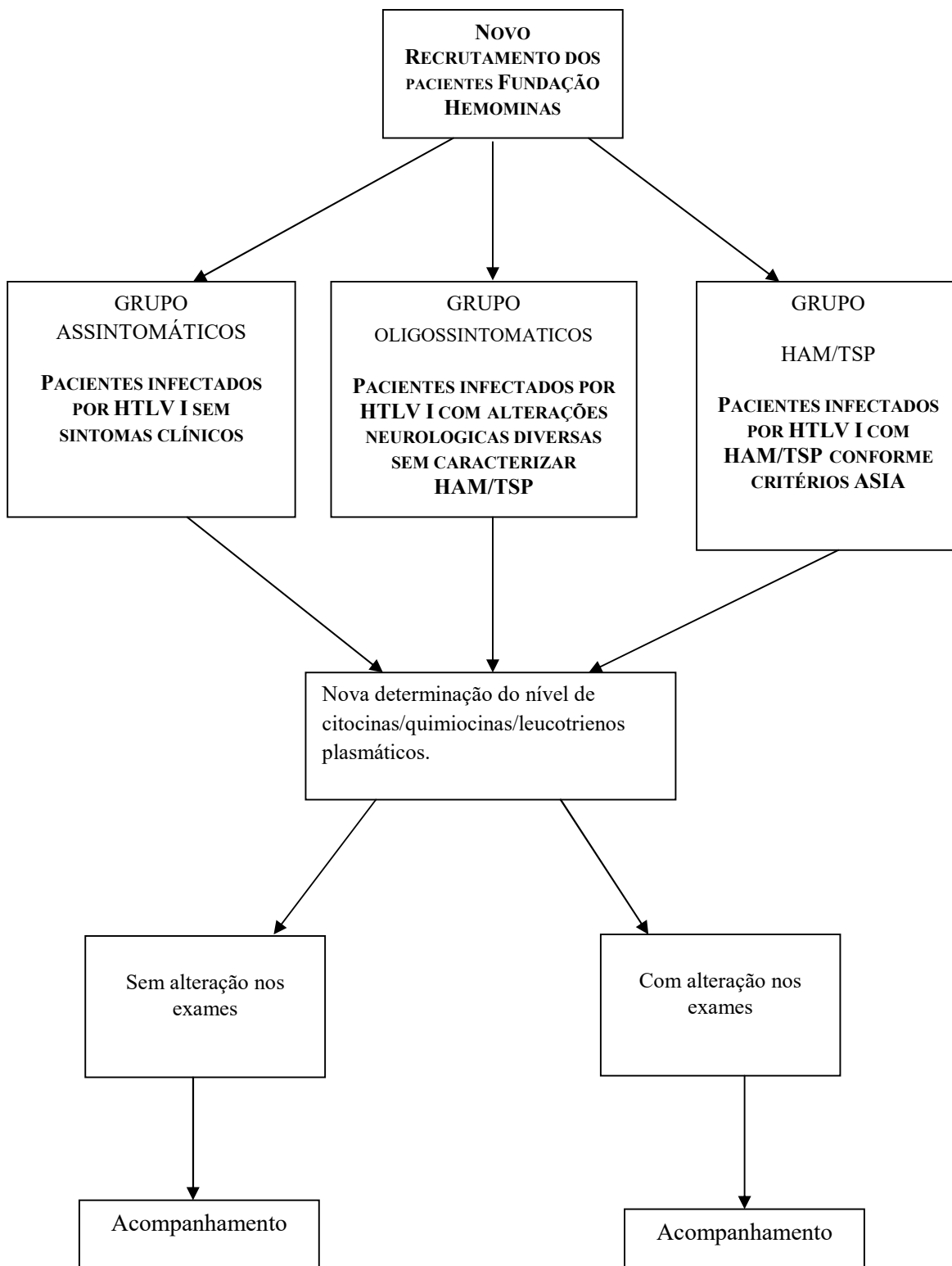
8 PROPOSIÇÕES

- Estudos prospectivos que busquem acompanhar a evolução do perfil inflamatório nos indivíduos com possível HAM/TSP, correlacionando-o com a evolução clínica.
- Estudos que avaliem outros possíveis componentes da resposta inflamatória, correlacionando-os com as formas de evolução da doença.
- Estudos tipo ensaio clínico que avaliem a correlação entre o uso de medicamento com e a mudança do perfil das citocinas, quimiocinas e leucotrienos.

9 CONSIDERAÇÃO FINAL

Com o propósito de manter o seguimento da coorte do GIPH e identificar possíveis mudanças no padrão de resposta imunológica que possa estar relacionada com a evolução para HAM/TSP, realizou-se em 2014 a reavaliação dos pacientes inicialmente estudados em 2008. Nova coleta de sangue foi realizada em 2015 e todos os biomarcadores aqui apresentados estão sendo retestados. Tais resultados não estão disponíveis para a apresentação nessa defesa, pois estão em fase de execução. A proposta é que todos os testes estejam finalizados no pós-doutorado com resultados provavelmente muito interessantes, por se tratar de um estudo longitudinal. A evolução imunológica em cinco anos de seguimento será apresentada de modo a permitir estabelecer possíveis biomarcadores preditivos de evolução de infecção assintomática para mielopatia.

Atualmente, não existem marcadores definidos e de fácil execução para o acompanhamento da evolução da infecção pelo HTLV-1 para HAM/TSP, o que dificulta o diagnóstico precoce e a tomada de medidas para retardar ou minimizar a evolução do quadro. Outro fator importante é ampliar possibilidades para a realização de ensaios clínicos em pacientes sem comprometimento neurológico avançado. Conhecer sobre a evolução imunológica da doença propiciará ferramentas de seguimento quanto á resposta terapêutica. O propósito é que o atual estudo torne-se a base para a definição destes marcadores favorecendo pesquisas que permitam a descoberta de tratamentos adequados para doença tão incapacitante.



REFERÊNCIAS

- AKIZUKI, S. Necropsy findings in HTLV-I-associated myelopathy. **The Lancet**, v.329.n. 8525 p. 156–157, 1987.
- ALLAIN, J. P. et al. Transfusion-transmitted infectious diseases. **Biologicals**, v. 37, n. 2, p. 71–77, 2009.
- ANDERSON, John A. Regression and ordered categorical variables. **Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)**, p. 1-30, 1984.
- ARAYA, N. et al. Human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and regulatory T cells in HTLV-1-associated neuroinflammatory disease. **Viruses**, v. 3, n. 9, p. 1532–1548, 2011.
- ASENSIO, V. C.; CAMPBELL, I. L. Chemokines in the CNS: Plurifunctional mediators in diverse states. **Trends in Neurosciences**, v. 22, n. 11, p. 504–512, 1999.
- AYE, M. M. et al. Histopathological analysis of four autopsy cases of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: inflammatory changes occur simultaneously in the entire central nervous system. **Acta neuropathologica**, v. 100, n. 3, p. 245–252, 2000.
- BACON, K. B.; HARRISON, J. K. Chemokines and their receptors in neurobiology: Perspectives in physiology and homeostasis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 104, n. 1, p. 92–97, 2000.
- BAJETTO, A. et al. Glial and neuronal cells express functional chemokine receptor CXCR4 and its natural ligand stromal cell-derived factor 1. **Journal of Neurochemistry**, v. 73, n. 6, p. 2348–2357, 1999..
- BANGHAM, C. R. M.; OSAME, M. Cellular immune response to HTLV-1. **Oncogene**, v. 24, n. 39, p. 6035–6046, 2005.
- BIBER, K. et al. Chemokines in the brain: Neuroimmunology and beyond. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 2, n. 1, p. 63–68, 2002.
- BIDDISON, W. E. et al. Human T cell leukemia virus type I (HTLV-I)-specific CD8+ CTL clones from patients with HTLV-I-associated neurologic disease secrete proinflammatory cytokines, chemokines, and matrix metalloproteinase. **The Journal of Immunology**, v. 159, n. 4, p. 2018-2025, 1997.
- BORDUCCHI, D. M. M.; KERBAUY, J.; OLIVEIRA, J. S. R. Linfoma/Leucemia de células T do adulto. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 45, n. 1, p. 63-70, 1999.
- BRITO-MELO, G. E. A. et al. IL-10 produced by CD4+ and CD8+ T cells emerge as a putative immunoregulatory mechanism to counterbalance the monocyte-derived TNF- α and guarantee asymptomatic clinical status during chronic HTLV-I infection. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 147, n. 1, p. 35–44, 2007.
- CARNEIRO-PROIETTI, A. B. F. et al. Infecção e doença pelos vírus linfotrópicos

humanos de células T (HTLV-I/II) no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 5, p. 499–508, 2002.

CARVALHO, E. M. et al. Cytokine profile and immunomodulation in asymptomatic human T-lymphotropic virus type 1-infected blood donors. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 27, n. 1, p. 1-6, 2001.

CASTRO-COSTA, C. M. D. E. et al. Proposal for Diagnostic Criteria of Tropical Spastic Paraparesis/HTLV-I- Associated Myelopathy (HAM/TSP). **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 22, n. 10, p. 931–935, 2006..

CATALAN-SOARES, B.; PROIETTI, F. A.; CARNEIRO-PROIETTI, A. B. F. Os vírus linfotrópicos de célulasT humanos (HTLV) na última década (1990-2000). **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 4, n. 1, p. 81-95, 2001.

CELLA, M. et al. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T_H help via APC activation. **The Journal of experimental medicine**, v. 184, n. 2, p. 747-752, 1996.

CHARO, I. F.; RANSOHOFF, R. M. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. **New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 6, p. 610-621, 2006

CHAVARRIA, A.; ALCOCER-VARELA, J. Is damage in central nervous system due to inflammation? **Autoimmunity Reviews**, v. 3, n. 4, p. 251–260, 2004.

CHAVES, D. G. et al. **Journal of Medical Virology**, v. 88, n. 8, p. 1438–1447, ago. 2016.

CHEN, R. et al. Simultaneous Quantification of Six Human Cytokine in a Single Sample Using Microparticle-based Flow Cytometric Technology. **Clinical Chemistry**, v. 45, n. 9, p. 1693–1694, 1999.

CHENSUE, S. W. Molecular machinations: chemokine signals in host-pathogen interactions. **Clinical microbiology reviews**, v. 14, n. 4, p. 821-835, 2001.

COELHO-DOS-REIS, J. G. A. et al. Immunological Profile of HTLV-1-Infected Patients Associated with Infectious or Autoimmune Dermatological Disorders. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 7, p 23-28, 2013.

COOPER, S. A; VAN DER LOEFF, M. S.; TAYLOR, G. P. The neurology of HTLV-1 infection. **Practical neurology**, v. 9, n. 1, p. 16–26, 2009.

COSTA-SILVA, M. F. et al. Gene expression profile of cytokines and chemokines in skin lesions from Brazilian Indians with localized cutaneous leishmaniasis. **Molecular Immunology**, v. 57, n. 2, p. 74–85, 2014.

DAENKE, S.; BANGHAM, C. R. Do T cells cause HTLV-1-associated disease?: a taxing problem. **Clinical and experimental immunology**, v. 96, n. 2, p. 179–81, 1994.

DINARELLO, C. A. Cytokines: interleukin-1 and tumour necrosis factor in

inflammation. **Oxford textbook of medicine**, v. 1, p. 108-111, 2003.

FELIPE, L. et al. Vestibular-evoked myogenic potential (VEMP) to evaluate cervical myelopathy in human T-cell lymphotropic virus type I infection. **Spine**, v. 33, n. 11, p. 1180-1184, 2008.

FONG, Y. et al. Antibodies to cachectin/tumor necrosis factor reduce interleukin 1 beta and interleukin 6 appearance during lethal bacteremia. **The Journal of experimental medicine**, v. 170, n. 5, p. 1627-1633, 1989.

FURUKAWA, Y. et al. Different cytokine production in tax-expressing cells between patients with human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis and asymptomatic HTLV-I carriers. **Journal of Infectious Diseases**, v. 187, n. 7, p. 1116-1125, 2003.

FUZII, H. T. et al. Immunopathogenesis of HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). **Life sciences**, v. 104, n. 1, p. 9-14, 2014.

GALLO, R. C. History of the discoveries of the first human retroviruses: HTLV-1 and HTLV-2. **Oncogene**, v. 24, n. 39, p. 5926-5930, 2005.

GALLO, R. C. Personal reflections on the origin of human leukemia. **Modern trends in human leukemia VII. Wilsede, June**, p. 22-27, 1986.

GESSAIN, A. et al. Comparative seroepidemiology of HTLV-I and HTLV-III in the French West Indies and some African countries. **Cancer research**, v. 45, n. 9 Supplement, p. 4633s-4636s, 1985.

GESSAIN, A.; CASSAR, O. Epidemiological aspects and world distribution of HTLV-1 infection. **Frontiers in microbiology**, v. 3, p. 388, 2012.

GOON, P. KC et al. High circulating frequencies of tumor necrosis factor alpha-and interleukin-2-secreting human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-specific CD4+ T cells in patients with HTLV-1-associated neurological disease. **Journal of virology**, v. 77, n. 17, p. 9716-9722, 2003.

GOON, P. KC et al. High frequencies of Th1-type CD4+ T cells specific to HTLV-1 Env and Tax proteins in patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Blood**, v. 99, n. 9, p. 3335-3341, 2002.

GRIFFITH, J. W.; SOKOL, C. L.; LUSTER, A. D. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. **Annual review of immunology**, v. 32, p. 659-702, 2014.

HANON, E. et al. Abundant tax protein expression in CD4+ T cells infected with human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) is prevented by cytotoxic T lymphocytes. **Blood**, v. 95, n. 4, p. 1386-1392, 2000.

HANON, E. et al. High production of interferon γ but not interleukin-2 by human T-lymphotropic virus type I-infected peripheral blood mononuclear cells. **Blood**, v. 98, n. 3, p.

721-726, 2001.

HARRISON, L. H. et al. Myelopathy among Brazilians coinfectd with human T-cell lymphotropic virus type I and HIV. **Neurology**, v. 48, n. 1, p. 13-18, 1997.

HENDEL, J.; NIELSEN, O. H. Expression of cyclooxygenase-2 mRNA in active inflammatory bowel disease. **American Journal of Gastroenterology**, v. 92, n. 7, 1997.

HESSELGESSER, J.; HORUK, R. Chemokine and chemokine receptor expression in the central nervous system. **Journal of neurovirology**, v. 5, n. 1, p. 13-26, 1999.

HIGUCHI, M. et al. Membrane tumor necrosis factor- α (TNF- α) expressed on HTLV-I-infected T cells mediates a costimulatory signal for B cell activation—characterization of membrane TNF- α . **Clinical immunology and immunopathology**, v. 82, n. 2, p. 133-140, 1997.

HISADA, M. et al. Persistent paradox of natural history of human T lymphotropic virus type I: parallel analyses of Japanese and Jamaican carriers. **Journal of Infectious Diseases**, v. 190, n. 9, p. 1605-1609, 2004.

HUANG, D. et al. Chemokines and chemokine receptors in inflammation of the nervous system: manifold roles and exquisite regulation. **Immunological Reviews**, v. 177, n. 1, p. 52-67, 2000.

IJICHI, S. et al. An autoaggressive process against bystander tissues in HTLV-I-infected individuals: A possible pathomechanism of HAM TSP. **Medical Hypotheses**, v. 41, n. 6, p. 542-547, 1993.

IKAI, K. Psoriasis and the arachidonic acid cascade. **Journal of Dermatological Science**, v. 21, n. 3, p. 135-146, 1999.

IWASAKI, Y.; OHARA, Y. Infiltration of Helper / Inducer T Lymphocytes Heralds Central Nervous System Damage in Human T-cell Leukemia Virus Infection. **American journal of pathology**, v. 140, n. 5, p. 1003-1008, 1992.

IZUMO, S.; UMEHARA, F.; OSAME, M. Works hop Neuropathology of human T lymphotropic virus type I-associated myelopathy. n. October 1996, p. 49-51, 1997.

JANSSEN, E. M. et al. CD4⁺ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8⁺ T lymphocytes. **Nature**, v. 421, n. 6925, p. 852-856, 2003.

JEFFERY, K. J. et al. HLA alleles determine human T-lymphotropic virus-I (HTLV-I) proviral load and the risk of HTLV-I-associated myelopathy. **Immunology**, v. 96, n. 7, p. 3848-3853, 1999.

KAPLAN, J. E. et al. The risk of development of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis among persons infected with HTLV-I. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 3, n. 11, p. 1096-1101, 1990.

KARPUS, W. J. Chemokines and central nervous system disorders. **Journal of**

neurovirology, v. 7, n. 6, p. 493–500, 2001.

KARPUS, W. J.; RANSOHOFF, R. M. Cutting edge commentary: chemokine regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis: temporal and spatial expression patterns govern disease pathogenesis. **The Journal of Immunology**, v. 161, n. 6, p. 2667-2671, 1998.

KINDT, T.J.; GOLDSBY, R.A.; OSBORNE, B.A. **Imunologia de Kuby**. 6. ed., Porto Alegre: Editora Artmed, 704 p. 2008.

KOCH, F. et al. High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. **The Journal of experimental medicine**, v. 184, n. 2, p. 741–746, 1996.

KUBOTA R, *et al.* Selected cytotoxic T lymphocytes with high specificity for HTLV-I in cerebrospinal fluid from a HAM/TSP patient. **Journal of Neurovirol**, v. 8, p.53-57. 2002.

KUBOTA, R. et al. Fluctuation of HTLV-I proviral DNA in peripheral blood mononuclear cells of HTLV-I-associated myelopathy. **Journal of neuroimmunology**, v. 42, n. 2, p. 147-154, 1993.

LA GRENADE, L.; MANNS, A.; FLETCHER, V. Clinical, pathologic, and immunologic features of human T lymphotropic virus type-1 associated infective dermatitis in children. **Arch Dermatol**, v. 134, p. 439–444, 1998.

LAIRMORE, M. D.; HAINES, R.; ANUPAM, R. Mechanisms of human T-lymphotropic virus type 1 transmission and disease. **Current Opinion in Virology**, v. 2, n. 4, p. 474–481, 2012.

LAL, R. B.; RUDOLPH, D. L. Constitutive production of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha from spontaneously proliferating T cells in patients with human T-cell lymphotropic virus type-I/II. **Blood**, v. 78, n. 3, p. 571-574, 1991.

LEE, S. M. et al. Autoantibodies that recognize functional domains of hnRNPA1 implicate molecular mimicry in the pathogenesis of neurological disease. **Neuroscience Letters**, v. 401, n. 1-2, p. 188–193, 2006.

LEVIN, M. C.; JACOBSON, S. HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP): a chronic progressive neurologic disease associated with immunologically mediated damage to the central nervous system. **Journal of neurovirology**, v. 3, n. 2, p. 126–40, 1997.

LEWIS, R. A.; AUSTEN, K. F. The biologically active leukotrienes. Biosynthesis, metabolism, receptors, functions, and pharmacology. **Journal of Clinical Investigation**, v. 73, n. 4, p. 889–897, 1984.

LUIZA-SILVA, M. et al. Cytokine signatures of innate and adaptive immunity in 17DD yellow fever vaccinated children and its association with the level of neutralizing antibody.

Journal of Infectious Diseases, v. 204, n. 6, p. 873–883, 2011.

MANNS, A.; HISADA, M.; LA GRENADE, L. Human T-lymphotropic virus type I infection. **The Lancet**, v. 353, n. 9168, p. 1951–1958, 1999.

MANTOVANI, A. The chemokine system: Redundancy for robust outputs. **Immunology Today**, v. 20, n. 6, p. 254–257, 1999.

MARTIN, F.; TAYLOR, G. P.; JACOBSON, S. Inflammatory manifestations of HTLV-1 and their therapeutic options. **Expert review of clinical immunology**, v. 10, n. 11, p. 1531–1546, 2014.

MATSUURA, E.; YAMANO, Y.; JACOBSON, S. Neuroimmunity of HTLV-I infection. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 5, n. 3, p. 310–325, 2010.

MATSUZAKI, T. et al. 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. **Journal of neurovirology**, v. 7, n. 3, p. 228–234, 2001.

MEDEIROS, A. I. et al. Blockade of Endogenous Leukotrienes Exacerbates Pulmonary Histoplasmosis. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 3, p. 1637–1644, 2004.

MENNICKEN, F. et al. Chemokines and chemokine receptors in the CNS: A possible role in neuroinflammation and patterning. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 20, n. 2, p. 73–78, 1999.

MOCHIZUKI, M. et al. HTLV-I and uveitis. **The Lancet**, v.339, n.8801,p.1110, 1992.

MORGAN, O. HTLV-1 Associated Myelopathy / Tropical Spastic Paraparesis How Far have We Come ? **West Indian Medical Journal**, v. 60, n.5, p.505-512, 2011.

MORIUCHI, H. et al. Mother-to-child transmission of human t-cell lymphotropic virus type 1. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 32, n. 2, p. 175–177, 2013.

MUNIZ, A. L. et al. Association of cytokines, neurological disability, and disease duration in HAM/TSP patients. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 64, n. 2 A, p. 217–221, 2006.

MURPHY, P. M. et al. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. **Pharmacological reviews**, v. 52, n. 1, p. 145–176, 2000.

NAKAGAWA, M. et al. HTLV-I-associated myelopathy: analysis of 213 patients based on clinical features and laboratory findings. **Journal of neurovirology**, v. 1, n. 1, p. 50-61, 1995.

NAKAMURA, S. et al. Detection of tumor necrosis factor- α -positive cells in cerebrospinal fluid of patients with HTLV-I-associated myelopathy. **Journal of neuroimmunology**, v. 42, n. 2, p. 127-130, 1993.

NASCIMENTO, M. C. F. et al. Infective dermatitis has similar immunological features to

human T lymphotropic virus-type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 156, n. 3, p. 455–462, 2009.

NISHIMOTO, N. et al. Elevated levels of interleukin-6 in serum and cerebrospinal fluid of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 97, n. 2-3, p. 183–193, 1990.

NISHIURA, Y. et al. Increased production of inflammatory cytokines in cultured CD4+ cells from patients with HTLV-I-associated myelopathy. **The Tohoku journal of experimental medicine**, v. 179, n. 4, p. 227-233, 1996.

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

OKUNISHI, K.; PETERS-GOLDEN, M. Leukotrienes and airway inflammation. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1810, n. 11, p. 1096–1102, 2011.

OLIÈRE, S, et al. Modulation of innate immune responses during human T-cell leukemia virus (HTLV-1) pathogenesis. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 22, n. 4, p. 197-210, 2011.

OSAME, M. et al. Chronic progressive myelopathy associated with elevated antibodies to human T-lymphotropic virus type I and adult T-cell leukemialike cells. **Annals of neurology**, v. 21, n. 2, p. 117-122, 1987.

OSAME, M. et al. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. **The Lancet**, v. 327, n. 8488, p. 1031-1032, 1986.

PERES, C. M. et al. Inhibition of leukotriene biosynthesis abrogates the host control of Mycobacterium tuberculosis. **Microbes and infection**, v. 9, n. 4, p. 483-489, 2007.

PETERS-GOLDEN, M.; COFFEY, M. Role of leukotrienes in antimicrobial host defense of the lung. **Clinical reviews in allergy and immunology**, v. 17, n. 1-2, p. 261–269, 1999.

PETERS-GOLDEN, M.; HENDERSON JR, W. R. Leukotrienes. **New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 18, p. 1841-1854, 2007.

PINTO, M. T. et al. T cell receptor signaling pathway is overexpressed in CD4(+) T cells from HAM/TSP individuals. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 19, n. 6, p. 578–584, 2015.

POIESZ, B. J. et al. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, n. 12, p. 7415–7419, 1980.

PORTO, M. A. F. et al. Implicações clínicas e imunológicas da associação entre o HTLV-1 e a espongiloidíase. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 6, p.

641–649, 2002.

PRIMO, J. R. L. et al. Infective dermatitis and human T cell lymphotropic virus type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in childhood and adolescence. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 41, n. 4, p. 535–541, 2005.

PROIETTI, A.B.F.C. et al. **Cadernos Hemominas**. 6. ed. Belo Horizonte: Fundação Hemominas, 2015. 124 p.

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

PROUDFOOT, A. E. I. et al. Strategies for chemokine antagonists as therapeutics. **Seminars in Immunology**, v. 15, n. 1, p. 57–65, 2003.

QUARESMA, J. A. S. et al. HTLV-1, immune response and autoimmunity. **Viruses**, v. 8, n. 1, p. 2–11, 2015.

RANSOHOFF, R. M.; TANI, M. Do chemokines mediate leukocyte recruitment in post-traumatic CNS inflammation? **Trends in Neurosciences**, v. 21, n. 4, p. 154–159, 1998.

RICHARDSON, J. H. et al. In vivo cellular tropism of human T-cell leukemia virus type 1. **Journal of virology**, v. 64, n. 11, p. 5682-5687, 1990.

RODRIGUES, E. S. et al. HTLV-1 infects human mesenchymal stromal cell in vitro and modifies their phenotypic characteristics. **Virology**, v. 449, p. 190–199, 2014.

ROMANELLI, L. C. F.; CARAMELLI, P.; PROIETTI, A. B. F. C. Human T cell lymphotropic virus (HTLV) 1: When should infection be suspected? **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 3, p. 340-347, 2010.

ROMANELLI, L. C. F. et al. Incidence of human T cell lymphotropic virus type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in a long-term prospective cohort study of initially asymptomatic individuals in Brazil. **AIDS research and human retroviruses**, v. 29, n. 9, p. 1199-1202, 2013.

SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. **The Journal of experimental medicine**, v. 179, n. 4, p. 1109-1118, 1994.

SAMUELSSON, B. Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. **Science**, v. 220, n. 4597, p. 568-575, 1983.

SANTOS, F. L. N.; LIMA, F. W. D. M. Epidemiologia, fisiopatogenia e diagnóstico laboratorial da infecção pelo HTLV-I. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 41, n.2, p. 105–116, 2005.

SEREZANI, C. H. et al. Leukotrienes are essential for the control of Leishmania

amazonensis infection and contribute to strain variation in susceptibility. **The Journal of immunology**, v. 177, n. 5, p. 3201–3208, 2006.

SPERLING, R. I. Eicosanoids in rheumatoid arthritis. **Rheumatic diseases clinics of North America**, v. 21, n. 3, p. 741-758, 1995.

SPRINGER, T. A. et al. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. **Cell**, v. 76, n. 2, p. 301-314, 1994.

STARLING, A. L. B. et al. Proviral load and the balance of serum cytokines in HTLV-1-asymptomatic infection and in HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). **Acta tropica**, v. 125, n. 1, p. 75-81, 2013.

TAJIMA, K. et al. Prospective studies of HTLV-I and associated diseases in Japan. **Human Retrovirology: HTLV**. New York: Raven Press, Ltd, p. 267-80, 1990.

TAJIMA, K. et al. Epidemiological analysis of the distribution of antibody to adult T-cell leukemia-virus-associated antigen: possible horizontal transmission of adult T-cell leukemia virus. **Gann= Gan**, v. 73, n. 6, p. 893-901, 1982.

TAYLOR, G. P. Pathogenesis and treatment of HTLV-I associated myelopathy. **Sexually transmitted infections**, v. 74, n. 5, p. 316-322, 1998.

TAYLOR, G. P.; MATSUOKA, Masao. Natural history of adult T-cell leukemia/lymphoma and approaches to therapy. **Oncogene**, v. 24, n. 39, p. 6047-6057, 2005.

TAYLOR, R. Interpretation of the correlation coefficient: a basic review. **Journal of diagnostic medical sonography**, v. 6, n. 1, p. 35-39, 1990.

TRINDADE, B. C. et al. Leukotrienes Are Upregulated and Associated with Human T-Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1)-Associated Neuroinflammatory Disease. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p 518-73 2012.

UBOGU, E. E.; COSSOY, M. B.; RANSOHOFF, R. M. The expression and function of chemokines involved in CNS inflammation. **Trends in pharmacological sciences**, v. 27, n. 1, p. 48-55, 2006.

UMEHARA, F. et al. Cytokine Expression in the Spinal Cord Lesions in HTLV-1-associated Myelopathy. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 53, n. 1, p. 72-77, 1994.

UMEHARA, F. et al. Immunocytochemical analysis of the cellular infiltrate in the spinal cord lesions in HTLV-I-associated myelopathy. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 52, n. 4, p. 424-430, 1993.

VERDONCK, K. et al. Human T-lymphotropic virus 1: recent knowledge about an ancient infection. **The Lancet infectious diseases**, v. 7, n. 4, p. 266-281, 2007.

VINE, A. M. et al. Polygenic control of human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) provirus load and the risk of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic

paraparesis. **Journal of infectious diseases**, v. 186, n. 7, p. 932-939, 2002.

WEKERLE, H. et al. Immune reactivity in the nervous system: modulation of T-lymphocyte activation by glial cells. **Journal of experimental biology**, v. 132, n. 1, p. 43-57, 1987.

YAMANO, Y. et al. Correlation of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) mRNA with proviral DNA load, virus-specific CD8⁺ T cells, and disease severity in HTLV-1-associated myelopathy (HAM/TSP). **Blood**, v. 99, n. 1, p. 88-94, 2002.

YARCHOAN, R. et al. Alterations in cytotoxic and helper T cell function after infection of T cell clones with human T cell leukemia virus, type I. **Journal of Clinical Investigation**, v. 77, n. 5, p. 1466, 1986.

ZLOTNIK, A.; YOSHIE, O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. **Immunity**, v. 12, n. 2, p. 121-127, 2000.

ANEXOS E APÊNDICES

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Protocolo: Avaliação do perfil de citocinas plasmáticas e da dosagem da carga proviral na mielopatia associada ao HTLV-1

Patrocinador:

Representantes do patrocinador:

Coordenador geral do estudo: Dr^a. Denise Utsch Gonçalves

Investigador: Dr^a. Ana Lúcia Borges Starling

Centro de Pesquisa: Faculdade de Medicina - Av. Alfredo Balena, 190,

Belo Horizonte-MG, Telefone:

Emergência 24 horas: Telefone (31)96133576

Leia este documento cuidadosamente para entender a importância e o significado do estudo. Ele pode conter palavras que você não entende. Para esclarecer suas dúvidas, faça todas as perguntas que achar necessário.

Você deve saber que quando assinar este documento estará concordando em participar de uma pesquisa clínica, não devendo permanecer qualquer dúvida.

Colocamo-nos à disposição para respondermos todas as suas perguntas.

CONVITE PARA PARTICIPAÇÃO

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa clínica. Após ler atentamente e compreender as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, deverá assinar ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa, você não será punido (a) de forma alguma.

Carta de Informação

Prezado (a) participante,

A mielopatia associada ao HTLV-1 (HAM), também conhecida como paraparesia espástica tropical (TSP), é uma doença crônica progressiva que afeta a medula espinal e o cérebro. Menos de 5% dos portadores crônicos do HTLV-1 desenvolverão essa complicação. Não estão definidos quais fenômenos levam indivíduos infectados a desenvolverem HAM/TSP e por que outros permanecem assintomáticos ao longo de toda a vida, nem quais são os marcadores sanguíneos que indicam a sua evolução.

Por isso, realizaremos uma pesquisa que tem o objetivo de verificar se as alterações da carga proviral e dos níveis de citocinas e quimiocinas no sangue estão relacionadas com as formas de evolução da infecção pelo HTLV 1, para que as condutas de avaliação e tratamento dessa doença sejam adotadas o mais rapidamente possível, melhorando a qualidade de vida de quem é infectado.

Todos os participantes que concordarem serão submetidos gratuitamente às avaliações da carga proviral e dos níveis de citocinas e quimiocinas no sangue periférico, a serem realizadas na Fundação Hemominas. Essas avaliações não oferecem qualquer risco a você nem ao seu tratamento, uma vez que são exames simples, realizados rotineiramente. Caso seja detectada alguma alteração nessas avaliações, você receberá tratamento e acompanhamento adequados.

Sua participação é voluntária e você poderá desistir de participar a qualquer momento da pesquisa, sem a perda de nenhum de seus benefícios. Durante toda a realização da pesquisa, você tem o direito de sanar suas dúvidas sobre os procedimentos a que está sendo submetido.

Os dados desta pesquisa serão analisados e os resultados serão divulgados em revista científica da área de interesse, mas seu nome sempre estará guardado, em sigilo, não aparecendo em nenhum local.

Sendo assim, sua colaboração é fundamental e, desde já, contamos com sua participação.

Atenciosamente,

Dra. Ana Lúcia Borges Starling

Dra. Denise Utsh Gonçalves

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO


Eu, (nome do participante), concordo em participar da pesquisa “Avaliação de indicadores da progressão da infecção pelo HTLV-1”, no estudo do perfil de citocinas e quimiocinas plasmáticas e da dosagem da carga proviral” sabendo que meus dados serão guardados em total sigilo e que poderei deixar de participar do estudo em qualquer momento, sem a perda de nenhum de seus benefícios.

Belo Horizonte, _____, de _____ .2008.

Telefones para contato:

Dr^a. Ana Lúcia Borges Starling: (31) (31)96133576

ANEXO A - APROVAÇÃO PROJETO COEP

	Universidade Federal de Minas Gerais <i>Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP</i>
---	--

Parecer nº. ETIC 090/07

Interessado(a): Profa. Denise Utsch Gonçalves
Depto. de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Fonoaudiologia
Faculdade de Medicina-UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 23 de maio de 2007, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado **"Avaliação de indicadores da progressão da infecção pelo HTLV I através do estudo de perfil de citocinas e quimiocinas plasmáticas e da dosagem da carga proviral"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.



Profa. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia
Presidente do COEP-UFMG

ANEXO B – APROVAÇÃO PROJETO CEP HEMOMINAS



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

PARECER CONSUBSTANCIADO

1. Título do Projeto de Pesquisa: "Avaliação de indicadores da progressão da infecção pelo HTLV-1 através do estudo do perfil de citocinas e quimiocinas plasmáticas e da dosagem da carga proviral"	
SUJEITOS DA PESQUISA	
2. Número de sujeitos No Centro: 100 Total: 100	3. Grupos Especiais: () Menor de 18 anos; () Portador de deficiência mental () Embrião/feto; () Relação de dependência (militares, presidiários...) () Outros; () Não se aplica
PESQUISADOR RESPONSÁVEL	
4. Nome: Denise Utsch Gonçalves	
5. Instituição a que pertence:	
INSTITUIÇÃO (ÕES) ONDE SERÁ REALIZADO	
6. Nome: Fundação Hemominas	
7. Unidade/Órgão: Hemocentro de Belo Horizonte	
8. Participação Estrangeira: Sim () Não (X)	
9. Projeto Multicêntrico: Sim (X) Não () Nacional (X) Internacional ()	
PATROCINADOR Não se aplica ()	
10. Nome:	
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP	
11. Data de Entrada: 04/06/07	12. Registro no CEP: 171
13. Objetivos: <u>Geral:</u> Avaliação do perfil das citocinas e quimiocinas plasmáticas e carga proviral, em sangue periférico, como indicadores de progressão da infecção pelo HTLV1. <u>Específicos:</u> Avaliar a correlação dos níveis de citocinas e quimiocinas plasmáticas de indivíduos infectados pelo HTLV 1 com as formas de progressão da infecção; Avaliar a correlação da carga proviral de indivíduos infectados pelo HTLV 1 com as formas de progressão da infecção.	
14. Sumário do Projeto: A população do estudo é composta por indivíduos pertencentes à coorte aberta do Grupo Interdisciplinar de Pesquisa em HTLV 1 (GIPH). Serão recrutados 100 indivíduos a serem divididos em 3 grupos (assintomáticos, com alterações neurológicas mas que não se enquadram nos critérios de ASIA de definição de HAM/TSP e pacientes com diagnóstico definido de HAM/TSP). Estão descritos os critérios de inclusão dos sujeitos no estudo. Os sujeitos serão submetidos à anamnese, exame físico geral, exame neurológico completo e exames laboratoriais. Está descrito como serão feitos os exames para detectar os níveis de citocinas/quimiocinas plasmáticas e a quantificação da carga proviral. Os demais procedimentos previstos não estão detalhados. Está descrita como será feita a análise estatística, é apresentado o orçamento financeiro, o cronograma e a bibliografia.	
15. Comentário dos Relatores: As pendências levantadas em pareceres anteriores foram atendidas, tornando assim o projeto adequado à Resolução CNS 196/96 e estando em condições de ser executado.	
16. Parecer: Aprovado (X) Pendência () Não Aprovado () Data: 05/11/2007 Data: Data:	
17. Cronograma de execução: 17 meses	18. Enviar relatórios em:
Início: Fim:	após 12 meses e término da execução do projeto
19. Encaminhamento à CONEP:	20. Coordenador
Os dados acima para registro () O projeto para apreciação () Data:	 Assinatura <small>Coordenadora de Comitê de Ética em Pesquisa Fundação Hemominas</small>

**ANEXO C – APROVAÇÃO DO PROJETO PELA CÂMARA
DEPARTAMENTAL FACULDADE DE MEDICINA UFMG**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Medicina
Departamento Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Fonoaudiologia

Imo. Sr.
Prof. Henrique Vitor Leite
Diretor de Ensino, Pesquisa e Extensão do Hospital das Clínicas/UFMG

PARECER

Título do Projeto de Pesquisa :

"Avaliação de indicadores da progressão da infecção pelo HTLV I através do estudo do perfil de citocinas e quimiocinas plasmáticas e da dosagem da carga proviral."

Pesquisadores responsáveis:

Profa. Denise Utsch Gonçalves - Orientadora
Dra. Ana Lúcia Borges Starling

A Câmara do Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia da Faculdade de Medicina da UFMG aprovou, em 13 / 3 / 2007, após avaliação do Relator, Prof. Joel Edmur Boteon o projeto de pesquisa intitulado, " Avaliação de indicadores da progressão da infecção pelo HTLV I através do estudo do perfil de citocinas e quimiocinas plasmáticas e da dosagem da carga proviral ", sob orientação da Profa. Denise Utsch Gonçalves. O estudo será conduzido no serviço de pesquisa da Fundação Hemominas.

Belo Horizonte, 13 de março de 2007

Profa. Ana Rosa Pimentel de Figueiredo
Chefe do Deptº de Oftalmo e Otorrino FM/UFMG

Parecer do Relator em anexo.

ANEXO D – ESCALAS DE INCAPACIDADE FUNCIONAL EDSS e OSAME (REVISADA)

ESCALA DE INCAPACIDADE FUNCIONAL AMPLIADA (EDSS)

(KURTZKE, 1965; KURTZKE, 1983)

0. Exame neurológico normal (grau 0) em todas as avaliações do sistema funcional - SF.
- 1,0. Nenhuma incapacidade; sinais mínimos em um SF (ou seja grau 1).
- 1,5. Nenhuma incapacidade; sinais mínimos em mais de um SF (mais de um SF grau 1).
- 2,0. Incapacidade mínima em um SF (um SF grau 2; outros graus 0 ou 1).
- 2,5. Incapacidade em dois SF (dois SF grau 2; outros graus 0 ou 1).
- 3,0. Incapacidade moderada em um SF (um SF grau 3 , outros grau 0 ou 1),ou discreta incapacidade em três ou quatro SF (três ou quatro SF grau 2 ;outros 0 ou 1) embora completamente ambulatorial.
- 3,5. Deambulação plena, com incapacidade moderada em um SF (um SF grau 3) e um ou dois SF grau 2; ou dois SF grau 3; ou cinco SF grau 2 (outros 0 ou 1).
- 4,0. Deambulação plena sem ajuda; auto-suficiente; ativo por cerca de 12 horas por dia, apesar da incapacidade relativamente grave consistindo de um SF grau 4 (outros 0 ou 1), ou combinações de graus menores excedendo os limites das etapas anteriores capaz de caminhar cerca de 500 metros sem ajuda ou descanso.

- 4,5. Deambulação plena sem ajuda; ativo durante grande parte do dia; capaz de trabalhar por um dia inteiro; porém, pode apresentar alguma limitação da atividade completa ou precisar de um pouco de ajuda; caracteriza-se por incapacidade relativamente grave, geralmente consistindo de um SF grau 4 (outros 0 ou 1), ou combinações de graus menores excedendo os limites das etapas anteriores; capaz de caminhar cerca de 300 metros sem ajuda ou descanso.
- 5,0. Deambulação sem ajuda ou descanso para caminhar cerca de 200 metros; incapacidade grave o suficiente para comprometer as atividades diárias (por exemplo, trabalhar o dia inteiro sem dispositivos especiais); os equivalentes comuns do SF são de grau 5, isoladamente (outros 0 ou 1), ou combinações de graus menores, geralmente excedendo os limites da etapa 4,0.
- 5,5. Deambulação sem ajuda ou descanso para caminhar por 100 metros; incapacidade grave o suficiente para impedir a realização de atividades diárias; os equivalentes comuns do SF são de grau 5, isoladamente (outros 0 ou 1), ou combinações de graus menores, geralmente excedendo os limites da etapa 4,0.
- 6,0. Assistência intermitente ou com auxílio unilateral constante (bengala, muleta ou suporte) para caminhar cerca de 100 metros com ou sem descanso; os equivalentes comuns do SF são combinações com mais de 2 SF grau 3+.

http://www.bibliotecadigital.ufba.br/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=465.

- 6,5. Assistência bilateral constante (bengala, muleta, suporte) para caminhar cerca de 20 metros sem descanso; os equivalentes comuns do SF são combinações com mais de dois SF grau 3 +.
- 7,0. Incapacidade para caminhar além de cerca de 5 metros, mesmo com auxílio; restrito a cadeira de rodas; capaz de conduzir a cadeira de rodas comum sem auxílio, além de entrar e sair da cadeira sem ajuda; consegue permanecer em atividade, na cadeira de rodas, por cerca de 12 horas por dia; os equivalentes comuns do SF são combinações com mais de um SF grau 4+; muito raramente, função piramidal grau 5 isoladamente.
- 7,5. Incapacidade para dar mais do que alguns passos; confinamento à cadeira de rodas; pode precisar de ajuda para sair e sentar na cadeira; capaz de conduzir a cadeira sem ajuda, mas não consegue permanecer na cadeira de rodas comum o dia inteiro; precisa de cadeira de rodas motorizada; os equivalentes comuns do SF são combinações com mais de um SF grau 4+.
- 8,0. Restrito ao leito ou a cadeira, ou consegue se locomover com a cadeira de rodas, porém não consegue ficar fora da cama por muito tempo; consegue realizar algumas funções para cuidar da sua própria higiene e mantém o uso dos braços; os equivalentes comuns do SF são combinações com grau 4+ em diferentes sistemas.

- 8,5. Essencialmente confinado a cama na maior parte do dia; consegue realizar algumas funções para cuidar de sua própria higiene e mantém algum uso dos braços; os equivalentes comuns do SF são combinações com grau 4+ em diferentes sistemas.
- 9,0. Paciente acamado e desamparado; consegue se comunicar e comer; os equivalentes comuns do SF são combinações, em sua maioria, do grau 4+
- 9,5. Paciente totalmente desamparado e acamado; incapaz de se comunicar com eficácia ou comer/engolir; os equivalentes comuns do SF são combinações, quase todos do grau 4+.
- 10. Morte devida a complicações da EM.

http://www.bibliotecadigital.ufba.br/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=465.

BASELINE
ESCALA DE INCAPACIDADE MOTORA REVISADA DE OSAME
 IZUMO *et al.*, 1996

ESCALA OSAME	
0	Deambula e corre normalmente
1	Marcha normal mas corre lentamente
2	Marcha anormal(vacilante ou espástica)
3	Marcha anormal e incapacidade para correr
4	Necessita apoio para usar escadas mas deambula sem auxilio
5	Necessita apoio em uma das mãos para deambular
6	Necessita apoio nas duas mãos para deambular
7	Incapaz para deambular embora engatilhe
8	Incapaz de engatilhar embora mude posição no leito
9	Incapaz de mudar a posição no leito embora mova os dedos
10	Completamente restrito ao leito

ANEXO E - ANAMNESE ADAPTADA GIPH HEMOMINAS

QUESTIONÁRIO

{Protocolo}: __/__/__ {Registro no {SAME}: / / / / / / {data preenchimento}: __/__/__

IDENTIFICAÇÃO:

{Nome}: _____
 {Endereço}: Rua/Av. _____ Nº: _____
 Apto: _____ Bairro: _____ Cidade: _____
 CEP: / / / / / / - / / / Telefones: _____
 {Sexo}: / __ /
 {DN}: __ / __ / ____
 {Idade} completa (em anos): ____
 {Natural} idade: _____

HISTÓRIA CLÍNICA:

{Grupo}: / __ /

sintomas na cabeça {V006}: / __ /

O que você sente ou percebe {V007}: / __ /

Há quanto tempo {V008}: / __ /

Melhorou, piorou ou igual {V009}: / __ /

Consultou médico {V010}: / __ /

Diagnóstico {V011}: _____

sintomas nos olhos {V012}: / __ /

O que você sente ou percebe {V013}: / __ /

Há quanto tempo {V014}: / __ /

Melhorou, piorou ou igual {V015}: / __ /

Consultou médico {V016}: / __ /

Diagnóstico {V017}: _____

sintomas nos ouvidos {V018}: / __ /

O que você sente ou percebe {V019}: / __ /

Há quanto tempo {V020}: / __ /

Melhorou, piorou ou igual {V021}: / __ /

Consultou médico {V022}: / __ /

Diagnóstico {V023}: _____

sintomas no intestino {V048}: / __ /

O que você sente ou percebe {V049}: / __ /

Há quanto tempo {V050}: / __ /

Melhorou, piorou ou igual {V051}: / __ /

Consultou médico {V052}: / __ /

Diagnóstico {V053}: _____

sintomas na urina {V054}: / __ /

O que você sente ou percebe {V055}: / __ /

Há quanto tempo {V056}: / __ /

Melhorou, piorou ou igual {V057}: / __ /

Consultou médico {V058}: / __ /

Diagnóstico {V059}: _____

sintomas genital feminino {V060}: / __ /

O que você sente ou percebe {V061}: / __ /

Há quanto tempo {V062}: / __ /

Melhorou, piorou ou igual {V063}: / __ /

Consultou médico {V064}: / __ /

Diagnóstico {V065}: _____

sintomas genital masculino {V066}: / __ /

O que você sente ou percebe {V067}: / __ /

Há quanto tempo {V068}: / __ /

Melhorou, piorou ou igual {V069}: / __ /
 Consultou médico {V070}: / __ /
 Diagnóstico {V071}: _____

sintomas no corpo {V084}: / __ /
 O que você sente ou percebe {V085}: / __ /
 Há quanto tempo {V086}: / __ /
 Melhorou, piorou ou igual {V087}: / __ /
 Consultou médico {V088}: / __ /
 Diagnóstico {V089}: _____

sintomas no braços {V090}: / __ /
 O que você sente ou percebe {V091}: / __ /
 Local {V092}: / __ /
 Igual a direita e a esquerda {V093}: / __ /
 Qual lado é pior {V094}: / __ /
 Há quanto tempo {V095}: / __ /
 Melhorou, piorou ou igual {V096}: / __ /
 Como está a progressão {V097}: / __ /
 Consultou médico {V098}: / __ /
 Diagnóstico {V099}: _____

sintomas no dorso e pernas {V100}: / __ /
 O que você sente ou percebe {V101}: / __ /
 Local {V102}: / __ /
 Igual a direita e a esquerda {V103}: / __ /
 Qual lado é pior {V104}: / __ /
 Há quanto tempo {V105}: / __ /
 Melhorou, piorou ou igual {V106}: / __ /
 Como está a progressão {V107}: / __ /
 Dificuldade para deambular {V108}: / __ /
 Desde quando {V109}: / __ /
 Dificuldade para correr {V110}: / __ /
 Desde quando {V111}: / __ /
 Dificuldade para pular {V112}: / __ /
 Desde quando {V113}: / __ /
 Dificuldade para subir escadas {V114}: / __ /
 Desde quando {V115}: / __ /
 Dificuldade para descer escadas {V116}: / __ /
 Desde quando {V117}: / __ /

uso nos últimos seis meses de medicamentos {V125}: / __ /
 Qual {V126} / __ /

teve vermes/lumbrigas nas fezes {V129}: / __ /
 Qual {V130}: / __ /

HIV

{SIDA} / __ /
 Uso regular de {medic}amentos {ARV}: / __ /
 Se sim, especificar:
 {ARV1} _____
 {ARV2} _____
 {ARV3} _____
 {ARV4} _____
 {ARV5} _____

Outras {comorbid}ades: / __ /
 Se sim, especificar:
 {comorbid1} _____
 {comorbid2} _____
 {comorbid3} _____

Fatores de risco para infecção por HIV e/ou HTLV:

{Transfusão}: / __ /
 Se sim, há {anostx} / __ /

{Ativ}idade {sexual}: /__/
 {Parceiros} nos últimos 12 meses : /__/
 Se sim, {num}ero de {parc}eiros: /__/
 {Op}ção {sexual}: /__/
 Uso de {drog}as {ilicit}as: /__/
 Se sim, {injetavel}: /__/
 {Amament}ação: /__/
 {Tatuagem}/Piercing: /__/
 {Detencao}: /__/
 {Contato} com material contaminado: /__/

EXAME FÍSICO:

Dados vitais

linfonodos:

palpaveis {V143}: /__/
 quais {V144}: /__/
 características {V145}: /__/
 PA {V132}: _____ / _____ mmHg
 Pulso {V133}: _____ bpm
 Peso {V131}: _____

Abdome:

{V157} /__/
 {V158} /__/

Ex Neurológico:

Fala {V160}: /__/

Pares {V161} cranianos: /__/ Qual está alterado e qual lado? _____

Comprometimento da sensibilidade {V186}: /__/

Superficial ou profunda {V187}: /__/

Se **superficial**, qual alteração {V188}: /__/

{top}ografia {sens}ibilidade {sup}erficial _____

Se **profunda**, qual alteração {V189}: /__/

{top}ografia {sens}ibilidade {pro}funda _____

Reflexo cutaneo-abdominal

Direito {V190}: /__/

Esquerdo {V191}: /__/

Reflexo cutaneo-plantar:

Direito {V192}: /__/

Esquerdo {V193}: /__/

Reflexo tendíneos:

bicipital direito {V194}: /__/

bicipital esquerdo {V195}: /__/

tricipital direito {V196}: /__/

tricipital esquerdo {V197}: /__/

radial direito {V198}: /__/

radial esquerdo {V199}: /__/

patelar direito {V200}: /__/

patelar esquerdo {V201}: /__/

aquileu direito {V202}: /__/

aquileu esquerdo {V203}: /__/

Força muscular

MS Proximal

direito {V204}: /__/

esquerdo {V205}: /__/

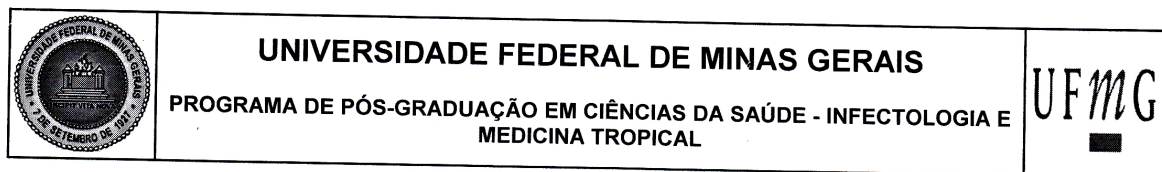
MS Distal

direito {V206}: /__/

esquerdo {V207}: /__/

MI Proximal

direito {V208}: /__/



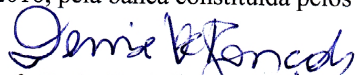
FOLHA DE APROVAÇÃO

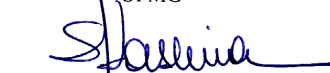
**Perfil dos biomarcadores plasmáticos de morbidade na mielopatia associada
ao HTLV-1/Paraparesia Espástica Tropical (HAM/TSP)**

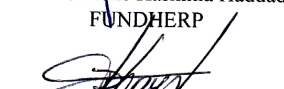
ANA LÚCIA BORGES STARLING


Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Medicina pelo Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS DA SAÚDE - INFECTOLOGIA E MEDICINA TROPICAL.

Aprovada em 06 de junho de 2016, pela banca constituída pelos membros:


 Profa. Denise Utsch Gonçalves - Orientador
 UFMG


 Profa. Simone Kashima Haddad
 FUNDHERP


 Prof. Daniel Gonçalves Chaves
 HEMOMINAS


 Profa. Silvana Maria Elói Santos
 UFMG


 Profa. Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau
 UFMG

Belo Horizonte, 6 de junho de 2016.