

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Faculdade de Medicina

**PERFIL DE CITOCINAS PLASMÁTICAS
E DOSAGEM DA CARGA PROVIRAL EM INDIVÍDUOS
INFECTADOS PELO HTLV-1: ESTUDO COMPARATIVO
ENTRE PORTADORES ASSINTOMÁTICOS E PACIENTES
COM HAM/TSP**

Ana Lúcia Borges Starling

Belo Horizonte
2010
ANA LÚCIA BORGES STARLING

**PERFIL DE CITOCINAS PLASMÁTICAS
E DOSAGEM DA CARGA PROVIRAL EM INDIVÍDUOS
INFECTADOS PELO HTLV-1: ESTUDO COMPARATIVO
ENTRE PORTADORES ASSINTOMÁTICOS E PACIENTES
COM HAM/TSP**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do título de Mestre em Medicina.

Área de concentração: Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical.

Orientador: Prof^ª. Denise Utsch Gonçalves.

Coorientador: Prof. José Roberto Lambertucci.

Belo Horizonte
Faculdade de Medicina da UFMG
2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

REITOR: Prof. Ronaldo Tadêu Pena

VICE-REITORA: Prof^a. Heloisa Maria Murgel Starling

Pró-Reitoria de Pós-graduação

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO: Prof^a. Elisabeth Ribeiro da Silva

Pró-Reitoria de Pesquisa

PRÓ-REITOR DE PESQUISA: Prof. Carlos Alberto Pereira Tavares

FACULDADE DE MEDICINA

DIRETOR: Prof. Francisco José Penna

VICE-DIRETOR: Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Centro de Pós-graduação

COORDENADOR: Prof. Carlos Faria Santos Amaral

SUBCOORDENADOR: Prof. Joel Alves Lamounier

Departamento de Clínica Médica

CHEFE: Prof. José Carlos Bruno da Silveira

Programa de Pós-graduação em Infectologia e Medicina Tropical

COORDENADOR: Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha

SUBCOORDENADOR: Prof. Vandack Alencar Nobre Júnior

COLEGIADO:

Prof. Antônio Luiz Pinho Ribeiro

Prof. José Roberto Lambertucci

Prof. Ricardo de Amorim Corrêa

Jader Bernardo Camponizzi (Disc.Titular)

José Adalberto Leal (Disc.Suplente)

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Denise Ustch Gonçalves, pela confiança, apoio, segurança, orientação e exemplo de dedicação ao ensino e à pesquisa.

Ao Prof. José Roberto Lambertucci, pelos questionamentos e desafios propostos.

Ao Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha, pela compreensão e total apoio nos momentos difíceis atravessados.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo recurso financeiro que permitiu o início deste projeto.

Ao Grupo Interdisciplinar de Pesquisa em HTLV-1 (GIPH), pelo apoio técnico, logístico e financeiro, imprescindíveis para a finalização deste estudo.

Ao Prof. Olindo Assis Martins-Filho e Dr^a. Andréa Teixeira Carvalho, pela atenção, apoio técnico e logístico - René Rachou - Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz).

Ao doutorando Sílvio Roberto de Sousa Pereira, pela parceria e discussões realizadas.

À acadêmica da Iniciação Científica Ludimila Labanca, pelo esforço e dedicação.

À minha família, pelo carinho e compreensão, na superação desta etapa.

Ao meu pai (*in memoriam*), pelo exemplo que norteia minha vida.

RESUMO

A evolução para mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP) parece estar relacionada ao perfil imunológico do paciente, sendo o aumento das citocinas pro-inflamatórias INF- γ , TNF- α e IL-2 alteração estabelecida naqueles com HAM/TSP. Nestes pacientes, a carga proviral tem sido considerada como um possível marcador de evolução da doença. Por outro lado, em indivíduos portadores assintomáticos do HTLV-1, observa-se um aumento de IL-10, uma citocina antiinflamatória, que tem sido vista como possível imunorregulador. O presente estudo teve o objetivo de comparar o perfil de citocinas plasmáticas e o nível da carga proviral de pacientes infectados pelo HTLV-1 portadores ou não da mielopatia associada ao HTLV-1 (HAM/TSP). Os participantes foram selecionados a partir da coorte aberta de ex-candidatos à doação de sangue infectados pelo HTLV-1 e pacientes com HAM/TSP acompanhados pelo Grupo Inter-disciplinar de Pesquisa em HTLV (GIPH). Os participantes foram divididos em quatro grupos: 21(19,4%) doadores de sangue soronegativos para o HTLV-1 (controles), 27(25,0%) assintomáticos; 32(29,6%) com poucos sintomas (possíveis HAM/TSP), e 28(25,9%) com HAM/TSP. As citocinas testadas de todos os participantes foram: IL-4, IL-10, IL-2, IL-6, TNF- α e IFN- γ . A carga proviral foi testada nos infectados pelo HTLV-1. Os grupos foram comparados a fim de se identificar quais citocinas estariam associadas à HAM/TSP e quais se correlacionariam a carga proviral elevada. Na análise comparativa, observou-se no grupo HAM/TSP aumento significativo das citocinas INF- γ ($p=0,030$, OR=7,6, IC=0,57-101,79), IL-6 ($p=0,002$), IL-4 ($p=0,034$, OR=0,83 IC=0,07-10,55) e uma tendência para o aumento de TNF- α ($p=0,058$, OR=2,8, IC=0,06-8,82). A carga proviral associou-se com HAM/TSP ($p<0,001$). Os pacientes do grupo HAM/TSP apresentaram maiores valores de INF- γ e tendência para menores valores de IL-2 e TNF- α . Este estudo confirmou a correlação entre maior carga proviral e uma resposta inflamatória aumentada para os indivíduos com HAM/TSP, corroborando a hipótese de que as lesões neurológicas associadas à HAM/TSP seriam decorrentes da resposta imunológica do hospedeiro contra o vírus que não estaria sendo imunomodulada, como acontece nos portadores assintomáticos do HTLV-1.

Palavras-chave: Vírus linfotrópico humano de células T (HTLV-1). Mielopatia associada ao HTLV-1 (HAM). Paraparesia espástica tropical (TSP). Citocinas. Carga proviral.

ABSTRACT

The occurrence of HTLV-1 associated myelopathy / tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) seems to be related to the patient's immunologic profile with an increase of proinflammatory cytokines INF- γ , TNF- α and IL-2. These alterations are well established in individuals with HAM/TSP. In such patients, proviral load has been considered as a potential marker of disease activity. Conversely, asymptomatic individuals with HTLV-1 show an increase of IL-10, an anti-inflammatory cytokine considered as a potential immune regulator. The objective of the present study was to compare the plasma cytokine profile and the proviral load of individuals with HAM/TSP. The participants were selected from the open cohort of referred blood donors infected with HTLV-1 and patients with HAM/TSP followed up by the Interdisciplinary Group of Research on HTLV-1 (GIPH). The participants were divided into four groups: 21(19, 4%) blood donors (controls), 27(25, 0%) HTLV-1-asymptomatic carriers; 32(29,6%) with few HAM/TSP symptoms (potential HAM/TSP); and 28(25, 9%) with HAM/TSP. The cytokine tested for all participants were: IL-4, IL-10, IL-2, IL-6, TNF- α and IFN- γ . The proviral load was tested in the individuals with HTLV-1. The groups were compared in order to identify which cytokines were associated with HAM/TSP and which ones were correlated with the high proviral load. In the comparative analysis, it was observed in the HAM/TSP group a significant increase of cytokines INF- γ ($p=0.030$, OR=7.6, IC=0.57-101.79), IL-6 ($p=0.002$) and IL-4 ($p=0.034$, OR=0.83 IC=0.07-10.55), as well as a tendency to the increase of TNF- α ($p=0.058$, OR=2.8, IC=0.06-8.82). The proviral load correlated with HAM/TSP ($p<0,001$). These patients presented higher values of INF- γ and a tendency to lower values of IL-2 and TNF- α . The present study confirmed the correlation between higher proviral load and greater inflammatory response for HAM/TSP patients, which corroborates the hypothesis that the neurological lesions associated with HAM/TSP are due to the host immunological response against the virus. This response would not be modulated as occurs in the HTLV-1-asymptomatic carrier

Keywords: Human T-Cell Lymphotropic Virus (HTLV-1). HTLV-1 associated myelopathy (HAM). Tropical spastic paraparesis (TSP), Cytokine, Proviral load.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ATL	Leucemia de células T do adulto
BD	<i>Becton Dickinson</i>
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CTL	Células T CD8+ citotóxicas
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
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
LASER	<i>Light amplification by stimulated emission of radiation</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
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
WB	<i>Western Blot</i>

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figuras

FIGURA 1 Critérios para os níveis de definição diagnóstica da Mielopatia associada ao HTLV-1/ Paraparesia espástica tropical (HAM/TSP).....	19
FIGURA 2 Citocinas, fonte e atividades.....	22
FIGURA 3 Fluxograma dos passos seguidos no estudo.....	31
FIGURA 4 Valores da carga proviral conforme percentual de PBMC infectados pelo HTLV-1 em indivíduos assintomáticos e com HAM/TSP, de acordo com diversos estudos.....	25

Gráficos

GRÁFICO 1 Distribuição de 108 pacientes por grupo de estudo classificados entre controle, assintomático, possível HAM/TSP e HAM/TSP.....	39
GRÁFICO 2 Distribuição comparativa por faixa etária de 108 indivíduos, divididos nos grupos controle, HTLV-1 assintomático, HTLV-1 possível HAM/TSP e HAM/TSP.....	42
GRÁFICO 3 Distribuição comparativa da carga proviral por grupo.....	48
GRÁFICO 4 Distribuição comparativa do TNF- α por grupo.....	49
GRÁFICO 5 Distribuição comparativa da IL-6 por grupo.....	49
GRÁFICO 6 Distribuição comparativa da IL-2 por grupo.....	49
GRÁFICO 7 Distribuição comparativa da INF- γ por grupo.....	49
GRÁFICO 8 Distribuição comparativa da IL-4 por grupo.....	49
GRÁFICO 9 Distribuição comparativa do IL-10 por grupo.....	49
GRÁFICO 10 Correlação de Spearman entre a carga proviral e a citocina INF γ	50
GRÁFICO 11 Correlação de Spearman entre a carga proviral e a citocina IL-2	50
GRÁFICO 12 Correlação de Spearman entre a carga proviral e a citocina TNF α	50
GRAFICO 13 Distribuição comparativa quanto aos valores das razões entre as citocinas através do teste de Kruskal-Wallis - Valor-p.....	51
GRAFICO 14 Distribuição comparativa quanto aos valores das razões entre as citocinas através do teste de Kruskal-Wallis - Valor-p.....	51
GRAFICO 15 Distribuição comparativa quanto aos valores das razões entre as citocinas através do teste de Kruskal-Wallis - Valor-p.....	51

LISTA DE TABELAS

TABELA -1 Descrição dos motivos de exclusão e perdas dos indivíduos do estudo.....	37
TABELA 2 Cálculo do poder amostral considerando os parâmetros de cada uma das citocinas analisadas no estudo.....	39
TABELA 3 Distribuição de 108 indivíduos subdivididos entre os grupos controle, assintomático, possível HAM/TSP e HAM/TSP em relação às variáveis sociodemográficas gênero e idade.....	40
TABELA 4 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.....	40
TABELA 5 Análise comparativa dois a dois de 108 indivíduos subdivididos entre os grupos controle, assintomático, possível HAM/TSP e HAM/TSP em relação aos principais sintomas avaliados.....	42
TABELA 6 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.....	43
TABELA 7 Análise comparativa de 108 indivíduos subdivididos entre os grupos controle, assintomático, possível HAM/TSP e HAM/TSP quanto às alterações encontradas na avaliação neurológica.....	43
TABELA 8 Correlação entre os valores das citocinas e gênero de 108 indivíduos subdivididos entre os grupos controle, assintomático, possível HAM/TSP e HAM/TSP.....	44
TABELA 9 Avaliação comparativa da associação entre os valores das citocinas e idade distribuída em faixa etária de 108 indivíduos subdivididos entre os grupos controle, assintomático, possível HAM/TSP e HAM/TSP.....	45

SUMÁRIO¹

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	14
2.1 Infecção pelo HTLV-1.....	14
2.1.1 Histórico e dados epidemiológicos.....	14
2.1.2 Evolução natural da infecção por HTLV-1.....	15
2.1.3 Mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP).....	17
2.1.3.1 Evolução e patogênese da HAM/TSP.....	17
2.1.3.2 Ação das citocinas.....	19
2.1.3.3 Citocinas e HTLV-1	22
2.1.3.4 Carga Proviral e HAM/TSP.....	24
3 OBJETIVOS.....	26
3.1 Geral.....	26
3.2 Específicos.....	26
4 PACIENTES E MÉTODOS.....	27
4.1 Delineamento.....	27
4.1.1 Hipótese nula a ser testada.....	27
4.2 Seleção dos pacientes.....	27
4.2.1 Critérios de inclusão.....	28
4.2.2 Critérios de exclusão.....	29
4.3 Estimativa do tamanho da amostra.....	29
4.4 Fluxograma.....	30
4.5 Procedimentos, local da pesquisa.....	31
4.5.1 Amostras de sangue.....	31
4.5.1.1 Riscos.....	31
4.5.2 Detecção do nível de citocinas plasmáticas por citometria de fluxo.....	32

¹ Este trabalho foi revisado de acordo com as novas regras ortográficas.

4.5.3 Quantificação da carga proviral: local, procedimento e equipamentos	33
4.6 Parâmetros avaliados.....	34
4.6.1 Avaliação de inclusão.....	34
4.7 Análise estatística.....	35
4.7.1 Estatísticas descritivas.....	35
4.7.1.1 Comparação dos grupos.....	36
4.8 Considerações éticas.....	36
5 RESULTADOS.....	37
5.1 Estatísticas descritivas gerais.....	37
5.2 Cálculo poder amostral.....	38
5.3 Dados epidemiológicos.....	39
5.4 Dados clínicos.....	42
5.5 Citocinas e carga proviral.....	44
6 DISCUSSÃO.....	51
6.1 Amostra populacional.....	51
6.2 Características epidemiológicas.....	51
6.3 Características clínicas.....	52
6.4 Características relacionadas às citocinas e carga proviral.....	52
7 CONCLUSÃO.....	56
8 PROPOSIÇÕES.....	57
REFERÊNCIAS.....	58
ANEXOS E APÊNDICES.....	63

1 INTRODUÇÃO

Estudos têm demonstrado que o risco de desenvolver mielopatia associada ao HTLV-1 (HAM/TSP) e sua progressão estão diretamente relacionados com a carga proviral e com a resposta imune aumentada (MANNNS *et al.*, 1999; YAMANO *et al.*, 2002).

A carga proviral em indivíduos com HAM/TSP tem sido referida como 10 a 100 vezes mais alta que em indivíduos HTLV-1 soropositivos assintomáticos (JEFFERY *et al.*, 1999) e aumenta logo antes ou durante a piora clínica dos pacientes com HAM/TSP (MATSUZAKI *et al.*, 2001; TAKENOUCI *et al.*, 2003).

Elevada linfoproliferação espontânea *in vitro* (SAKAI *et al.*, 2001), níveis elevados de linfócitos T-CD8+-vírus específicos e altos títulos de anticorpos para HTLV-1, tanto no soro quanto no fluido cérebro-espinal (OSAME *et al.*, 1987), parecem estar associados à evolução para HAM/TSP (AKIZUKI *et al.*, 1987; IZUMO *et al.*, 1988). Clones de células T-citotóxicas secretam citocinas, quimiocinas e metaloproteínas potencialmente inflamatórias e lesivas em altas concentrações no sistema nervoso central (BIDDISON *et al.*, 1997).

A análise das características imunológicas da HAM/TSP sugere que fatores distintos possam estar envolvidos em seu estabelecimento. Estudos propõem a existência de atividade inflamatória constante (resposta linfócito T *helper* tipo 1 - Th1), com aumento da produção de INF- γ , TNF- α e IL-2 pelos linfócitos infectados, contribuindo para a manutenção do processo inflamatório crônico em pacientes com HAM/TSP (HANON *et al.*, 2001; MUNIZ *et al.*, 2006).

A evolução para HAM/TSP está intimamente relacionada ao perfil imunológico do paciente. Entretanto, a natureza desses fatores e os mecanismos pelos quais eles se manifestam ainda estão por ser esclarecidos. Os resultados do presente estudo poderão contribuir com o conhecimento existente sobre o padrão de resposta inflamatória ajudando a melhor compreensão dos fatores envolvidos na sua progressão.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Infecção pelo HTLV-1

2.1.1 Histórico e dados epidemiológicos

Conforme Gallo (2005), no ano de 1979, nos Estados Unidos, foi descrito o primeiro retrovírus humano, o HTLV-1, tendo sido isolado da linhagem de células T de um paciente portador de linfoma nessas células. No ano seguinte, Poiesz *et al.* (1980) relataram, pela primeira vez, a correlação desse vírus com o linfoma cutâneo de células T e, posteriormente, descobriram que o retrovírus ATLIV identificado pelos japoneses como agente etiológico da leucemia de células T do adulto (ATL) era idêntico ao HTLV-1 (POIESZ *et al.*, 1980, *apud* GALLO, 2005, p. 5928).

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), horizontal (relação sexual) e parenteral (transusão de sangue e hemoderivados contaminados e uso de drogas injetáveis) (SANTOS; LIMA, 2005).

Estima-se que 15 a 20 milhões de pessoas no mundo estejam infectadas pelo HTLV-1 (YOSHIDA; JEANG, 2005, p. 5925). Estudos preconizam que a África é 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 *et al.*, 1987, *apud* SANTOS; LIMA, 2005).

No Brasil, estudos de prevalência confirmam a presença do HTLV-1 e HTLV-2 em todo o país. O HTLV-1 foi 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 (2006) 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-1/2 entre todos os países endêmicos. Sem dúvida, tem-se na infecção pelo HTLV-1/2 um problema de saúde pública (PROIETTI *et al.*, 2006).

2.1.2 Evolução natural da infecção por HTLV-1

A história natural da infecção pelo HTLV-1/2 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 Santos e Lima (2005), aproximadamente 98% 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).

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.*, 2006).

Acredita-se que fatores próprios do hospedeiro, incluindo o sistema HLA, devem ser importantes para determinar as manifestações da infecção (JEFFERY *et al.*, 1999).

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).

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 TCD8+ 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 por via mucosa ou sangue periférico, além de fatores genéticos individuais, como polimorfismos de genes HLA e genes envolvidos na resposta imune (JEFFERY *et al.*, 1999; KODAMA *et al.*, 1999; PROIETTI *et al.*, 2006).

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

2.1.3.1 Evolução e patogênese da HAM/TSP

A HAM/TSP 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 a 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.*, 2006).

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). 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 FIG 1.

FIGURA 1

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

<p><u>Definido:</u></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><u>Provável:</u></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><u>Possível:</u></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.

Verifica-se predominância em indivíduos do sexo feminino de aproximadamente três vezes mais do que no sexo masculino, na faixa etária de 40 a 50 anos (LEVIN; JACOBSON, 1997).

Segundo Taylor *et al.* (2006), a patogênese da HAM/TSP ainda não está completamente esclarecida, mas achados histopatológicos mostram infiltração linfocitária perivascular na medula espinhal composta principalmente de linfócitos T-CD4+ na doença inicial e linfócitos T-CD8+ na doença avançada, seguida por uma fase atrófica com menos celularidade.

2.1.3.2 Ação das citocinas

A resposta imune pode ser dividida em inata e adaptativa. A primeira pressupõe mecanismos moleculares e celulares preexistentes à ocorrência de qualquer infecção (JANEWAY *et al.*, 2007). A imunidade adaptativa desenvolve-se em resposta a uma infecção, podendo levar a reconhecimento e eliminação de um patógeno invasor e ao desenvolvimento de memória imunológica. Os sistemas de imunidade inata e adaptativa são interativos e cooperativos, produzindo uma resposta combinada mais efetiva do que cada resposta isolada (KINDT; GOLDSBY; OSBORNE, 2008).

A resposta inata coopera com a adaptativa especialmente através da interação entre os receptores dos macrófagos e os componentes dos microorganismos levando a produção de citocinas como IL-1, IL-6, TNF- α que são proteínas regulatórias de baixo peso molecular, solúveis, responsáveis por alterar o comportamento ou as propriedades de outras células, em resposta a inúmeros estímulos (JANEWAY *et al.*, 2007; KINDT; GOLDSBY; OSBORNE, 2008). Estas além de induzirem e manterem a resposta inflamatória, estimulam e direcionam a resposta adaptativa (*cyto*-“célula, do grego *kinein*, “mover-se”) (KINDT; GOLDSBY; OSBORNE, 2008).

Entre os mecanismos envolvidos na resposta adaptativa, encontram-se a imunidade humoral, desenvolvida por meio dos linfócitos B com produção de anticorpos, e a imunidade mediada por células; esta tem como principal responsável pelo seu desenvolvimento as células T-efetoras (células T-CD4+ auxiliares e T-CD8+ citotóxicas) (JANEWAY *et al.*, 2007).

As células T-CD8+ citotóxicas (CTLs) têm capacidade lítica e são críticas no reconhecimento e eliminação das células próprias infectadas, a partir da secreção de citotoxinas (perforinas e grazimas) e citocinas, como INF- γ e TNF- β (KINDT; GOLDSBY; OSBORNE, 2008).

As células T-CD4+ auxiliares produzem e liberam diversas citocinas, exercendo papel de comunicação célula a célula para mediar às complexas interações entre as células que levam ao desenvolvimento de uma resposta imune efetiva (KINDT; GOLDSBY; OSBORNE, 2008).

Testes biológicos demonstraram que a maioria das citocinas possui múltiplos efeitos biológicos diferentes. Ressalta-se a regulação do tipo, linfócito T *helper* tipo 1 e tipo 2 (Th1 e Th2), da intensidade e da duração de uma resposta imune, por estimular ou inibir a ativação, proliferação e/ou diferenciação de várias células e por regular a secreção de anticorpos e outras citocinas (JANEWAY *et al.*, 2007; KINDT; GOLDSBY; OSBORNE, 2008).

Estudos mostram que os tipos de antígenos a que o organismo é exposto determinam o perfil de citocinas produzidas e a diferenciação das células T-CD4+ auxiliares nos subtipos TH1 e TH2, durante a resposta imune inicial (JANEWAY *et al.*, 2007; KINDT; GOLDSBY; OSBORNE, 2008).

A exposição a helmintos e bactérias extracelulares induz principalmente o desenvolvimento de resposta TH2, levando especialmente à produção das citocinas IL-4, IL-5, e IL-10, que atuam na ativação das células B, promovendo a produção de anticorpos. Em contrapartida, a exposição a protozoários, bactérias intracelulares e vírus induz, a princípio, a resposta TH1 que, inicialmente, produz IL-2, INF- γ , TNF- α e estas estimulam a ativação dos linfócitos T-citotóxicos. Essas respostas são antagônicas, pois o INF- γ modula negativamente a resposta Th2. Enquanto a IL-4 a IL-10 e a IL-6 modulam negativamente a resposta Th1, o que permite homeostasia no sistema imune e resposta imunológica balanceada (MACHADO *et al.*, 2004).

Alguns microorganismos são capazes de evadir da eliminação pelo sistema imune frequentemente induzindo uma resposta inflamatória crônica, na qual as citocinas INF- γ e TNF- α possuem papel central, resultando em um significativo dano tecidual (KINDT; GOLDSBY; OSBORNE, 2008).

As funções das principais citocinas estão descritas no FIGURA 2.

FIGURA 2
Citocinas, fonte 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 lipogênico.
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).

2.1.3.3 Citocinas e HTLV-1

A imunidade adquirida depende diretamente da resposta específica das células T-CD4+ auxiliares ao vírus HTLV -1. As células T-CD4+ auxiliares 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 efectoras das CTLs (Th1), e IL-4, IL-5, e IL-10, que promovem a respostas das células B (Th2) 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: a) são principal subtipo celular infectado pelo HTLV-1 *in vivo* (HANON *et al.*, 2000, RICHARDSON *et al.*, 1990); b) secretam citocinas pró-inflamatória neurotóxica 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).

A TNF- α é uma citocina pró-inflamatória envolvida em diversas doenças inflamatórias (DINARELLO, 2003, *apud* GOON *et al.*, 2003), desempenhando função central na coordenação da resposta inflamatória (FONG *et al.*, 1989).

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 TCD4+ 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 positivas para INF- γ (GOON *et al.*, 2003, 2004), verificou-se que os Infócitos T-CD4+INF- 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.

Goon *et al.* (2003) observaram correlação positiva entre a frequência total estimada de células T-CD4+ TH1 (e o total de células positivas para IL2) e a carga proviral em indivíduos com HTLV-1 assintomáticos, mas não para aqueles com HAM/TSP. A frequência da resposta Th1 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. 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 expressão de TNF- α e IL-12 (TH1). 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-4, IL-2 IL-1 β e IFN- γ .

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 Th1/Th2, enquanto aqueles que não apresentam um padrão equilibrado de resposta Th1/Th2 desenvolveriam HAM/TSP.

2.1.3.4 Carga proviral e HAM/TSP

A infecção pelo HTLV-1 não produz carga viral detectável, sendo mantida devido à proliferação de linfócitos que apresentam o genoma viral integrado ao cromossomo da célula hospedeira; estas expressam a proteína viral *Tax*, que promove a expansão seletiva do linfócito T infectado. (GONÇALVES, *et al.*, 2008). Logo, o HTLV-1 se integra ao genoma do hospedeiro na forma de provírus.

Estudo desenvolvido por Manns *et al.* (1999) demonstra que a avaliação da carga proviral pode ser útil como preditor de progressão da HAM/TSP. Yamano et al. (2002) corroboram a hipótese, ao mostrarem que a carga proviral é significativamente menor em indivíduos assintomáticos quando comparados com aqueles que desenvolveram HAM/TSP.

A carga proviral tem se mostrado mais alta no líquido do que no sangue de indivíduos com HAM/TSP (Lezin *et al.*, 2005) Em indivíduos assintomáticos, esta diferença não foi observada.

Diverso estudo tem buscado definir o ponto de corte para os valores da carga proviral através da comparação entre indivíduos assintomáticos e com HAM/TSP. O QUADRO 3 apresenta um sumário das publicações sobre este assunto (GONÇALVES *et al.*, 2008).

FIGURA-4

Valores da carga proviral conforme percentual de PBMC infectados pelo HTLV-1 em indivíduos assintomáticos e com HAM/TSP, de acordo com diversos estudos

Assintomáticos	HAM/TSP	Referências
0-24.9% (media 0.3%) ¹ 0-20.8% (media 3.3%) ²	1-29.4% (media 5.4%)	Nagai et al, 1998
0-0.9% (media 0.8%)	0.1-5.1% (media 8.13%) 1.2-37.5%(media 12.9%) ³ 0.1-46.1% (media 6.8%) ⁴	Olindo et al, 2005
0-13.8% (media 1.0%)	0-44.6% (media 6.3%)	Silva et al, 2007
0.8-3.8% (media 1.1%)	3.1-8.5% (media 5.6%)	Hashimoto et al, 1998
0.05-47.6% (media 2.7%)	0.05-53.6% (media 6.79%)	Montanheiro et al, 2005
2.5-16.2% (media 5.6%)	13-9-29.1% (media 17.8%)	Adaui et al, 2006

1. Assintomáticos sem parentesco com indivíduos HAM/TSP

2 Assintomáticos com parentesco com indivíduos HAM/TSP

3 HAM/TSP progressão rápida

4 Pacientes com HAM/TSP progressão lenta

Fonte: Adaptado de Gonçalves *et al.* (2008)

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Avaliar e comparar o perfil das citocinas plasmáticas e da carga proviral no sangue periférico, de pacientes infectados pelo HTLV-1 portadores ou não da mielopatia associada ao HTLV-1 (HAM/TSP).

3.2 Específicos

- Comparar os níveis das citocinas plasmáticas IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 dos pacientes com HAM/TSP em relação ao nível em pacientes com possível HAM/TSP, soropositivos assintomáticos e controles sadios.
- Comparar os níveis da carga proviral dos pacientes infectados pelo HTLV-1 com HAM/TSP em relação ao nível da carga nos indivíduos soropositivos assintomáticos e com possível HAM/TSP.

4 PACIENTES E MÉTODOS

4.1 Delineamento

Realizou-se estudo transversal comparativo no período de julho de 2008 a agosto de 2009, no qual foram avaliados 108 indivíduos subdivididos em quatro grupos: grupo-controle, composto de doadores soronegativos saudáveis da Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais (Hemominas), e outros três grupos compostos de indivíduos infectados pelo HTLV-1. Estes foram subdivididos em 27(25%) infectados assintomáticos, 32(29,6%) possível HAM/TSP e 28(25,9%) com HAM/TSP, selecionados inicialmente de forma aleatória da coorte aberta do Grupo Interdisciplinar de Pesquisa em HTLV (GIPH). Os pacientes foram submetidos a entrevista, avaliação clínica geral e neurológica e coleta de sangue total para determinação do nível de citocinas plasmáticas, por citometria de fluxo, e para dosagem da carga proviral utilizando-se PCR em tempo real pelo sistema SYBR Green.

4.1.1 Hipótese nula a ser testada

O perfil de citocinas e a carga proviral na HAM/TSP é semelhante ao perfil do paciente soropositivo para HTLV-1 assintomático.

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). Os indivíduos do grupo controle eram doadores da Fundação Hemominas selecionados aleatoriamente para participar como grupo controle da coorte do GIPH e os do grupo de estudo eram os participantes da coorte do GIPH, divididos em três subgrupos em diferentes fases da infecção pelo HTLV-1. Desse modo, os grupos avaliados foram:

1) Grupo controle:

Realizou-se seleção aleatória dos indivíduos que fariam parte do grupo controle. Estes deveriam preencher as seguintes características: doadores soronegativos saudáveis (conforme critérios do Hemominas, ou seja, que não possuem diagnóstico positivo de hepatite B e C, que não estão

expostos 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 corticosteróides);

2) Grupos de estudo: infectados pelo HTLV-1

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

4.2.1 Critérios de inclusão

Grupo 1 - Doadores saudáveis (grupo-controle)

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

Grupo 2 – Assintomáticos

- Sorologia positiva para o HTLV-1 tanto no teste de *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) quanto *western blot* (WB);
- encontrar-se 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 C).

Grupo 3- 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 4 - Diagnóstico definido de HAM/TSP

- Sorologia positiva para o HTLV-1 tanto no teste de ELISA quanto WB;

- portadores de HAM/TSP definidos 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.

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
- Uso de corticosteróides e outros imunossupressores no período de um ano antecedente a pesquisa.

4.3 Estimativa do tamanho da amostra

A estimativa do tamanho da amostra usou como referência estudos publicados por Brito-Melo *et al.* (2006) contando com 47 indivíduos e por Muniz *et al.* (2006) contando com 237 indivíduos.

4.4 FLUXOGRAMA

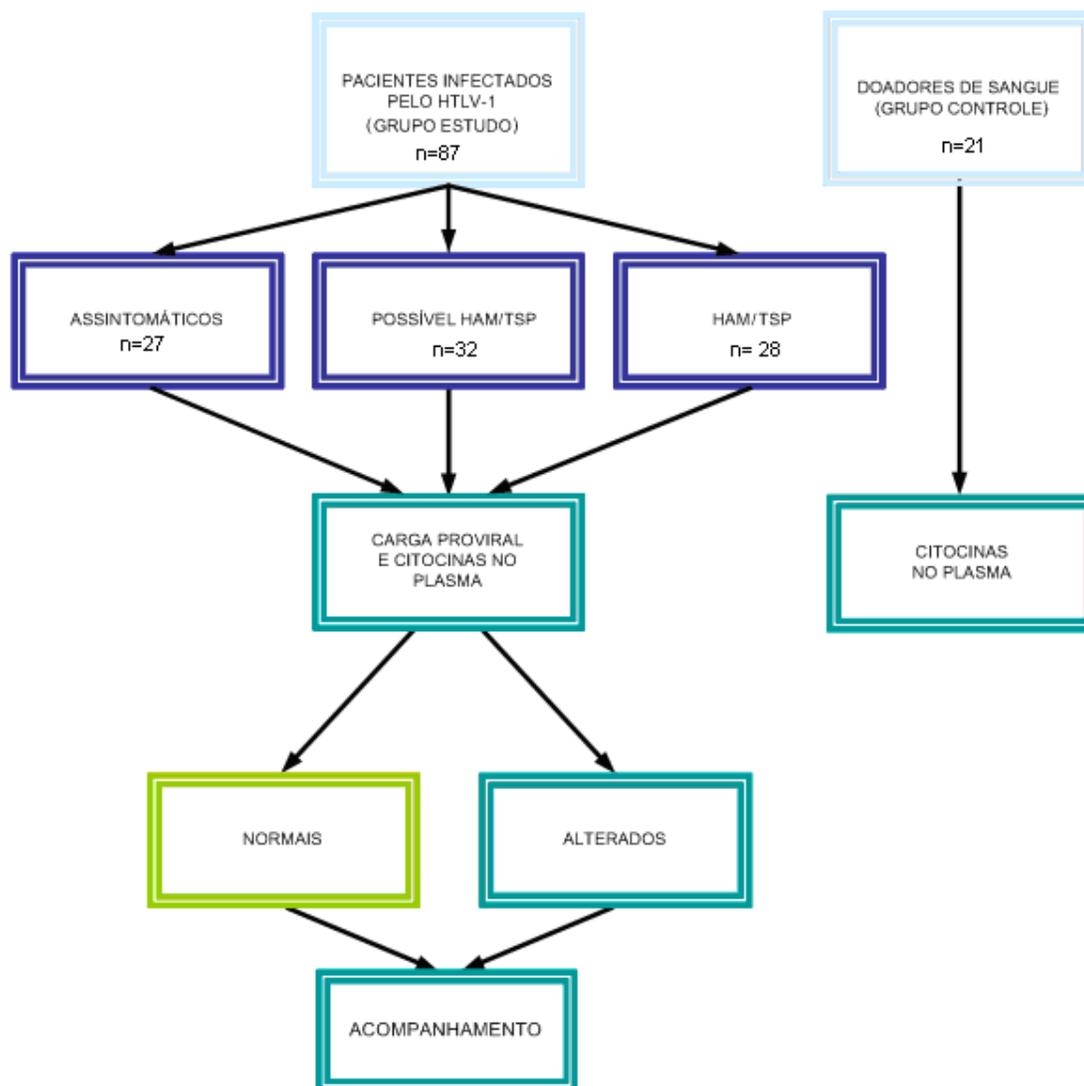


FIGURA 3 – Delineamento do estudo

4.5 Procedimentos, local da pesquisa

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 clínicos definidos no projeto foram convidados a participar do estudo verbalmente, 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.

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 plasmáticas, por citometria de fluxo, e para dosagem da carga proviral.

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, aliquotadas 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 seis esferas de poliestireno de intensidades de fluorescência discretas e distintas, recobertas com anticorpos específicos para as citocinas humanas e são detectadas no canal FL-3. 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 (FL-3), 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 (FL-2).

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 Quantificação da carga proviral: local, procedimento e equipamentos

A coleta do material sangue foi realizada no Setor de Neurologia do Hospital das Clínicas e a quantificação da carga proviral feita na Fundação Hemominas, conforme protocolo a seguir. Para a quantificação da carga proviral do HTLV-1 dos indivíduos soropositivos para HTLV-1, utilizou-se o seguinte protocolo: o DNA de sangue periférico foi extraído e purificado em colunas (QIAamp DNA Blood kit, QIAGEN GmbH, Hilden, Germany), de acordo com as recomendações do fabricante. Para a quantificação da carga proviral do HTLV-1, foi utilizada PCR em tempo real usando o sistema SYBR Green. Foi feita a amplificação da sequência pol do HTLV (SK110: 5'- CCC TAC AAT CCA ACC AGC TCA G -3' e SK111: 5'- GTG GTG

AAG CTG CCA TCG GGT TTT –3’), para medida do número de cópias provirais e da sequência do gene albumina humano (ALB-S: 5’- GCT GTC ATC TCT TGT GGG CTG T – 3’ e ALB-AS: 5’- AAA CTC ATG GGA GCT GCT GGT T – 3’) para medida do número de células na amostra. Cada reação, feita separadamente, consistiu de 308 ng de DNA (o equivalente à 50.000 células), 1X SYBR de Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA) e 200 nM dos iniciadores para pol ou para albumina, com um volume final de 25 µl. A PCR foi realizada no aparelho de PCR em tempo real da Applied Biosystems (modelo 7300), com os seguintes ciclos de temperatura: uma fase inicial à 50⁰C por 2 min e 95⁰C por 10 min, seguida por 40 ciclos à 95⁰C por 15 seg e 65⁰C por 1 min. Curva de *melting* de 60⁰C a 95⁰C, com aumento de 0,5⁰C a cada ciclo (total 80 ciclos) foi realizada após cada PCR para avaliação da especificidade dos produtos amplificados. As curvas de calibração para determinação do n° de cópias provirais e do n° de células foram obtidas através da diluição seriada de DNA de células MT2, uma linhagem celular produtora de partículas virais de HTLV-1, a qual possui três cópias do gene pol. Considerou-se que cada célula somática humana tem 6,16 pg de DNA. A diluição foi equivalente a 10.000, 1.000, 100 e 10 células, para a curva de amplificação de pol, e de uma diluição seriada equivalente a 50.000, 10.000, 1.000 e 100 células, para a curva de amplificação de albumina. As PCRs para pol e albumina de uma mesma amostra foram realizadas numa mesma placa, em duplicata, e cada placa continha as curvas de calibração. A carga proviral em cada amostra foi determinada como n° de cópias pol / (n° de cópias de albumina/2) X 10000, e seu valor dado em n° de cópias provirais por 10.000 células.

4.6 Parâmetros avaliados

Foram avaliadas comparativamente a existência de diferenças significativas entre os níveis médios de citocinas plasmáticas (níveis de referência – grupo-controle), a correlação com a carga proviral e a forma de evolução da doença nos três grupos estudados.

4.6.1 Avaliação de inclusão

Visita de inclusão (V1)

Nessa visita, o paciente recebeu inicialmente orientações verbais e escritas sobre a pesquisa, questões éticas e jurídicas, que fizeram parte do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

(APÊNDICE A).

Essa visita avaliou se o indivíduo preenchia os critérios para a inclusão na pesquisa. E os seguintes procedimentos foram realizados:

- Anamnese;
- exame físico geral;
- exame neurológico completo. Após o mesmo, caso o paciente preenchesse os critérios clínicos do estudo, ele era incluído em um dos grupos e encaminhado para realização dos exames laboratoriais;
- exames laboratoriais: coleta de sangue para quantificação da carga proviral e dosagem das citocinas plasmáticas (conforme item 5.4.1).

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 quatro grupos. Foram feitos gráficos de barras e *box-plot* para ilustrar as análises.

4.7.1.1 Comparação dos grupos

Para comparação dos quatro 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 quatro 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.

4.8 Considerações éticas

Este estudo foi submetido à apreciação e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP), Universidade Federal de Minas Gerais, conforme parecer n° ETIC 090/07 - 23 de maio de 2007 (ANEXO A) e ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) Hemominas - Ofício n° 83/2007- 06 novembro 2007 de acordo com as resoluções nos 196/96 e 347/05 do Conselho Nacional de Saúde (ANEXO B).

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 21 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 com sorologia negativa para o HTLV-1 que relataram, durante a avaliação clínica, quadros de doenças inflamatórias/infecciosas no último ano.	13
TOTAL	35
<i>Motivo de perdas</i>	<i>Número de pacientes</i>
Pacientes que não participaram da etapa de Avaliação Neurológica e/ou Avaliação Clínica.	3
Pacientes com problemas de leitura da amostra de plasma para a dosagem de citocinas.	2
TOTAL	5

Durante o período do estudo, 108 pacientes participaram do projeto, sendo que 21 (19,4%) pertenciam ao grupo-controle e 87 (80,6%) ao grupo 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 (GRÁF. 1).

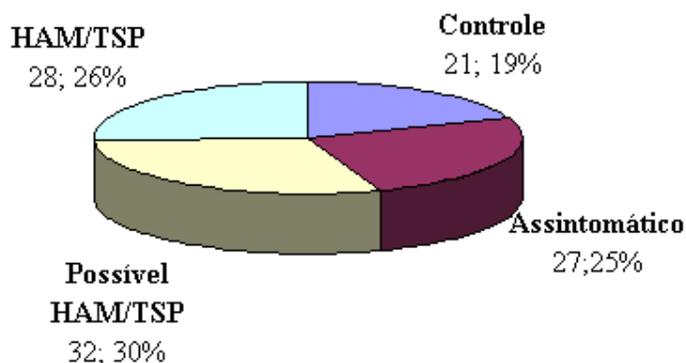


GRÁFICO 1 - Distribuição de 108 pacientes por grupo de estudo (n=108) classificados entre controle, assintomático, possível HAM/TSP e HAM/TSP definido. Belo Horizonte, 2008 - 2010

5.2 Cálculo do poder amostral

O cálculo do poder de detecção da amostra do estudo foi baseado na diferença das médias estimadas para cada uma das citocinas nos dois grupos extremos de HTLV-1: assintomático e HAM/TSP.

Considerou-se nível de significância de 5% e tamanho de amostra total de 108 pessoas.

O poder estimado para cada uma das citocinas segue apresentado na TAB. 2.

TABELA 2 –
Cálculo do poder amostral considerando os parâmetros de cada uma das citocinas analisadas
no estudo e carga proviral. Belo Horizonte, 2008 - 2010

Medida	Média assintomático	Média HAM/TSP	Desvio- padrão geral	Diferença médias	$z_{1-\alpha}$	N	$z_{1-\beta}$	Poder
INF-y	12,7	23,5	23,0	10,8	1,96	108	1,49	93,2%
TNF-α	46,1	153,6	180,5	107,5	1,96	108	2,42	98,7%
IL10	1,7	2,3	2,0	0,6	1,96	108	0,27	60,6%
IL6	7,7	16,9	27,6	9,2	1,96	108	0,49	68,8%
IL4	2,9	4,6	3,9	1,7	1,96	108	1,26	89,6%
IL2	4,2	5,3	5,1	1,1	1,96	108	0,37	64,4%
CARGA	1,6	6,1	10,6	4,5	1,96	108	1,16	87,7%

De acordo com a TAB.2, o poder variou de 60,6%, quando se consideraram as médias estimadas para a IL10, a 98,7%, quando se considerou o TNF- α .

5.3 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 mais baixas.

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 3

- 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

	CONTROLE (n=21)	Assintomático (n=27)	Possível HAM/TSP (n=32)	HAM/TSP (n=28)	Valor-p
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	<0,001** *
Mediana	42	52	51	58	
Desvio-padrão	10	12	12	9	
Mínimo	28	19	31	34	
Máximo	60	69	72	72	
*Teste Qui-quadrado		***Teste Kruskal-Wallis			

TABELA 4-

Distribuição 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 Belo Horizonte, 2008 – 2010.

	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 possível HAM/TSP	*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 possível HAM/TSP	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
possível HAM/TSP 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)

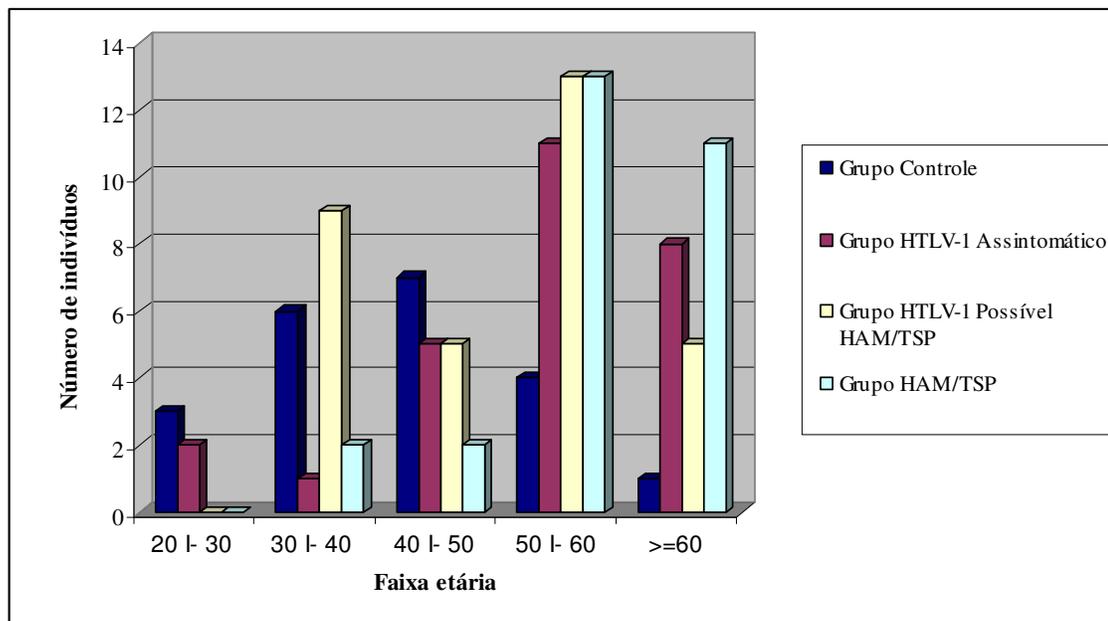


GRÁFICO 2 - Distribuição comparativa por faixa etária de 108 indivíduos, divididos nos grupos-controle (21), assintomático (27), possível HAM/TSP (32) e HAM/TSP (28). Belo Horizonte, 2008 – 2010.

5.4 Dados clínicos

A TAB. 5 realça que somente não houve diferença para os sintomas entre os grupos controle e assintomático. Para o restantes das comparações, existiu pelo menos uma comparação com diferença estatisticamente significativa.

TABELA 5

Análise comparativa dois a dois de 108 indivíduos subdivididos entre os grupos controle, assintomático, possível HAM/TSP e HAM/TSP em relação aos principais sintomas avaliados Belo Horizonte, 2008 – 2010.

CORRELAÇÕES ENTRE OS GRUPOS	Sintomas	
	Auditivos**	Intestinais***
CONTROLE x assintomático	0,084	0,838
CONTROLE x possível HAM/TSP	0,001	0,016
CONTROLE x HAM/TSP	0,036	<0,001*
assintomático x possível HAM/TSP	0,109	0,005
assintomático x HAM/TSP	0,688	<0,001*
possível HAM/TSP x HAM/TSP	0,228	0,017

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

**Sintomas de tontura, zumbido e/ou perda auditiva

***Sintoma de constipação intestinal

Constatou-se diferença entre os grupos para todas as dificuldades listadas, que foram mais frequentes no grupo HAM/TSP (TAB. 6).

TABELA 6

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

	Dificuldades				
	Deambular	Correr	Pular	Subir escadas	Descer escadas
CONTROLE x assintomático	0,186	0,186	**	0,574	0,574
CONTROLE x possível HAM/TSP	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 possível HAM/TSP	*<0,001	*<0,001	*0,001	*0,002	*0,002
assintomático x HAM/TSP	*<0,001	*<0,001	*<0,001	*<0,001	*<0,001
Possível HAM/TSP 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. 7 que o grupo HAM/TSP é o que apresenta mais alterações com diferenças estatisticamente significativas nas comparações dois a dois ao exame neurológico

TABELA 7

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.

	Alteração			Romberg
	Reflexo	Força	Marcha	
CONTROLE x assintomático	0,771	0,999	0,999	0,999
CONTROLE x possível HAM/TSP	0,037	0,070	0,999	0,118
CONTROLE x HAM/TSP	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*
assintomático x possível HAM/TSP	0,007*	0,112	0,999	0,152
assintomático x HAM/TSP	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*
possível HAM/TSP x HAM/TSP	0,057	<0,001*	<0,001*	<0,001*

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

5.5 Citocinas e carga proviral do HTLV-1

As comparações dos valores de citocinas em relação aos grupos estudados foram avaliadas quanto à diferença na distribuição por gênero. Os valores estão descritos na TAB 8.

TABELA 8

Correlação entre os valores das citocinas e gênero de 108 indivíduos subdivididos entre os grupos controle, assintomático, possível HAM/TSP e HAM/TSP. Belo Horizonte, 2008-2010.

		INF- γ pg/mL		TNF- α pg/mL		IL-10 pg/mL		IL-6 pg/mL		IL-4 pg/mL		IL-2 pg/mL		Carga proviral (Cópias provirais/10.000 célis.)	
		Mas	Fem	Mas	Fem	Mas	Fem	Mas	Fem	Mas	Fem	Mas	Fem	Mas	Fem
Controle	n	12	9	12	9	12	9	12	9	12	9	12	9		
	P25	0,0	0,0	2,7	1,4	0,0	0,0	2,5	0,8	0,0	0,8	0,0	0,0		
	P50	0,0	0,0	7,7	6,3	1,9	0,0	3,9	2,2	3,2	2,2	5,1	0,0		
	P75	28,8	35,5	53,8	12,5	3,5	3,0	4,5	5,3	4,9	5,3	9,4	7,3		
	Valor-p*	1,000		0,568		0,523		0,301		0,167		0,354			
Assinto- máticos	n	13	14	13	14	13	14	13	14	13	14	13	14	13	14
	P25	0,0	0,0	2,2	1,4	0,0	0,0	2,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2
	P50	0,0	0,0	4,1	5,3	0,0	1,0	4,4	3,0	0,0	1,1	0,0	0,0	1,0	1,0
	P75	32,3	0,0	24,4	16,9	2,7	2,8	6,8	5,3	4,5	5,1	10,9	8,7	3,3	2,0
	Valor-p*	0,284		0,961		0,734		0,176		0,631		0,567		0,449	
Possível HAM/TSP	n	8	24	8	24	8	24	8	24	8	24	8	24	8	24
	P25	0,0	0,0	0,0	0,8	0,0	0,0	3,0	2,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,1
	P50	0,0	0,0	3,8	5,1	0,8	1,8	3,7	3,4	2,8	2,6	6,0	4,5	0,3	0,8
	P75	0,0	30,9	24,6	29,7	3,3	3,1	4,9	5,1	5,9	5,0	9,6	8,6	0,5	1,8
	Valor-p*	0,177		0,468		0,563		0,500		0,858		0,585		0,199	
HAM/TSP	n	3	25	3	25	3	25	3	25	3	25	3	25	3	25
	P25	0,0	0,0	6,3	3,6	0,0	1,2	4,6	4,2	0,0	3,0	3,7	0,0	0,2	1,7
	P50	44,7	24,7	204,3	13,5	1,9	2,7	12,4	5,1	3,4	4,5	5,6	5,4	2,6	2,8
	P75	50,7	36,9	382,3	356,5	2,8	3,7	24,2	14,1	6,1	6,1	7,3	9,0	3,4	5,8
	Valor-p*	0,433		0,524		0,391		0,351		0,524		0,944		0,572	
Total	n	36	72	36	72	36	72	36	72	36	72	36	72	24	63
	P25	0,0	0,0	2,6	3,3	0,0	0,0	3,0	2,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,3
	P50	0,0	0,0	5,2	5,9	1,6	2,0	4,1	4,1	2,7	3,1	5,5	4,3	0,5	1,6
	P75	28,8	33,6	32,9	35,3	3,0	3,2	5,8	6,2	5,0	5,6	9,4	8,6	2,8	2,8
	Valor-p*	0,407		0,673		0,303		0,691		0,445		0,418		0,132	

*Teste Mann-Whitney

As comparações dos valores de citocinas em relação aos grupos estudados foram avaliadas quanto à diferença na distribuição por faixa etária. Os valores estão descritos na TAB 9.

TABELA 9

Avaliação comparativa da associação entre os valores das citocinas e idade distribuída em faixa etária de 108 indivíduos subdivididos entre os grupos controle, assintomático, possível HAM/TSP e HAM/TSP. Belo Horizonte, 2008 – 2010.

Nova classificação	Faixa etária		INF- γ pg/mL	TNF- α pg/mL	IL-10 pg/mL	IL-6 pg/mL	IL-4 pg/mL	IL-2 pg/mL	Carga proviral (Cópias provirais/10.000 cél.)
Controle	20 l- 30	n	3	3	3	3	3	3	
		P25	0	3,4	3	3,3	0	6,4	
		P50	93,1	6,2	3,7	8,2	4,5	8,6	
		P75	193,8	9,9	4,2	37,5	37	13,6	
	30 l- 40	n	6	6	6	6	6	6	
		P25	0	1,875	0	1,575	0	0	
		P50	0	8,35	0	3,15	0	0	
		P75	7,25	33,8	1,625	4,15	2,2	1,475	
	40 l- 50	n	7	7	7	7	7	7	
		P25	0	0	0	2,2	0	0	
		P50	0	5,4	1,8	3,5	1,9	4,3	
		P75	28	21,5	3,3	4	5	9,8	
	50 l- 60	n	4	4	4	4	4	4	
		P25	0	7,45	0	0,4	0	0	
		P50	12,35	29,25	0	2	0	2,55	
		P75	40,825	69,725	3,3	5,4	5,25	5,7	
	>= 60	n	1	1	1	1	1	1	
		P25	0	5	3,5	4,5	4,3	9,6	
		P50	0	5	3,5	4,5	4,3	9,6	
		P75	0	5	3,5	4,5	4,3	9,6	
		Valor-p	0,334	0,516	0,128	0,307	0,463	0,052	
Assintomático	20 l- 30	n	2	2	2	2	2	2	2
		P25	0	10,5	2,6	5,7	4,8	0	1,16
		P50	43	16,15	5,9	6,95	10,6	6,6	1,56
		P75	86	21,8	9,2	8,2	16,4	13,2	1,96
	30 l- 40	n	1	1	1	1	1	1	1
		P25	0	27,6	2,6	4,5	4,5	0	0,49
		P50	0	27,6	2,6	4,5	4,5	0	0,49
		P75	0	27,6	2,6	4,5	4,5	0	0,49
	40 l- 50	n	5	5	5	5	5	5	5
		P25	0	0	0	0	0	0	0
		P50	0	4,8	0	0	0	0	0
		P75	0	10,1	2,6	4,45	4,05	9,2	0,145
	50 l- 60	n	11	11	11	11	11	11	11
		P25	0	2,9	0	1,5	0	0	0,9
		P50	0	4	1,6	4,4	0	0	2,02
		P75	39,8	33,7	2,8	7,2	5,4	11,1	2,83
	>= 60	n	8	8	8	8	8	8	8
		P25	0	1,6	0	0	0	0	0,305
		P50	0	5,15	0	3,3	0	0	1
		P75	0	13,45	1,2	4,95	2,4	6,175	2,4875
		Valor-p	0,278	0,504	0,202	0,213	0,208	0,815	0,052

Continua TAB. 9

Nova classificação	Faixa etária		INF- γ pg/mL	TNF- α pg/mL	IL-10 pg/mL	IL-6 pg/mL	IL-4 pg/mL	IL-2 pg/mL	Carga proviral (Cópias provirais/10.000 cél.)
possível HAM/TSP	30 l- 40	n	9	9	9	9	9	9	9
		P25	0	0	0,65	2,55	2	0	0,105
		P50	0	3,8	1,9	3,4	3,1	4,3	0,3
	40 l- 50	P75	28,05	150,9	2,7	5,4	3,85	7,7	1,125
		n	5	5	5	5	5	5	5
		P25	0	0	0	2,15	0	0	0,23
	50 l- 60	P50	0	3,4	1,6	3,4	2,3	4,6	0,82
		P75	39,5	11,5	2,45	4,35	5,25	7,75	1,895
		n	13	13	13	13	13	13	13
	>= 60	P25	0	3,6	0	3,05	0	0	0,15
		P50	0	7,1	2	4,1	2,6	5,9	0,78
		P75	21,35	49,85	3,7	5,5	8,25	9,6	2,85
	Valor-p	n	5	5	5	5	5	5	5
		P25	0	1,9	0	2,75	0	0	0,02
		P50	0	5,1	0	2,9	0	0	0,26
HAM/TSP	30 l- 40	P75	31,05	37,5	10,6	5,75	5	13,55	1,855
		Valor-p	0,970	0,519	0,729	0,839	0,861	0,850	0,748
		n	2	2	2	2	2	2	2
	40 l- 50	P25	32,9	1,9	2,8	4,6	0	6,4	4,26
		P50	33,8	7,7	3,4	10,6	4,35	7,5	9,69
		P75	34,7	13,5	4	16,6	8,7	8,6	15,12
	50 l- 60	n	2	2	2	2	2	2	2
		P25	0	5,2	0	7,9	0	3,7	0,24
		P50	25,35	193,75	1,05	16,05	3	6,45	3,375
	>= 60	P75	50,7	382,3	2,1	24,2	6	9,2	6,51
		n	13	13	13	13	13	13	13
		P25	0	3,6	1,2	3,7	3	0	1,685
	Valor-p	P50	21	16,2	2,7	4,5	4,5	2,9	3,44
		P75	32,1	243,35	3,3	7,4	6,15	8,15	6,07
		n	11	11	11	11	11	11	11
Valor-p	P25	0	3,8	0	4,7	3,4	0	1,6	
	P50	24,7	78,3	2,6	7,6	4,5	5,6	2,3	
	P75	50,7	423,2	4	16,1	6	9,8	3,33	
Valor-p	Valor-p	0,751	0,536	0,442	0,365	0,964	0,532	0,220	

*Teste Kruskal-Wallis P=percentil

De acordo com o Gráfico 3, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação a carga proviral ($p < 0,001$). Esta diferença foi significativa para o cruzamento dos grupos: assintomático e HAM/TSP; possível HAM/TSP e HAM/TSP. (Teste Kruskal-Wallis).

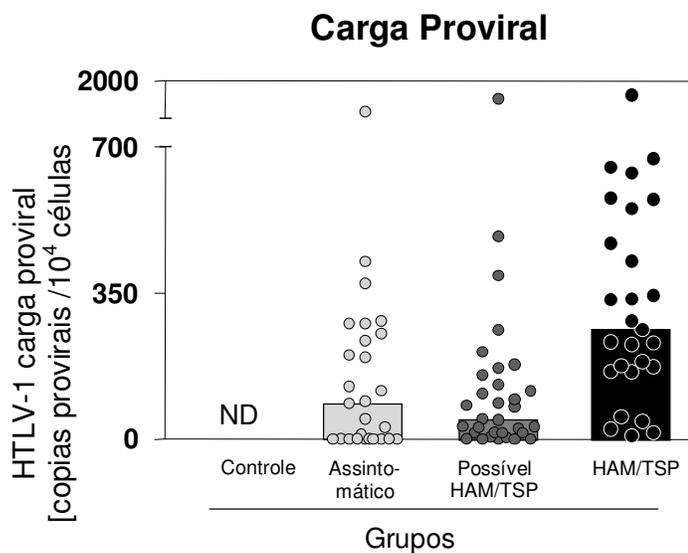
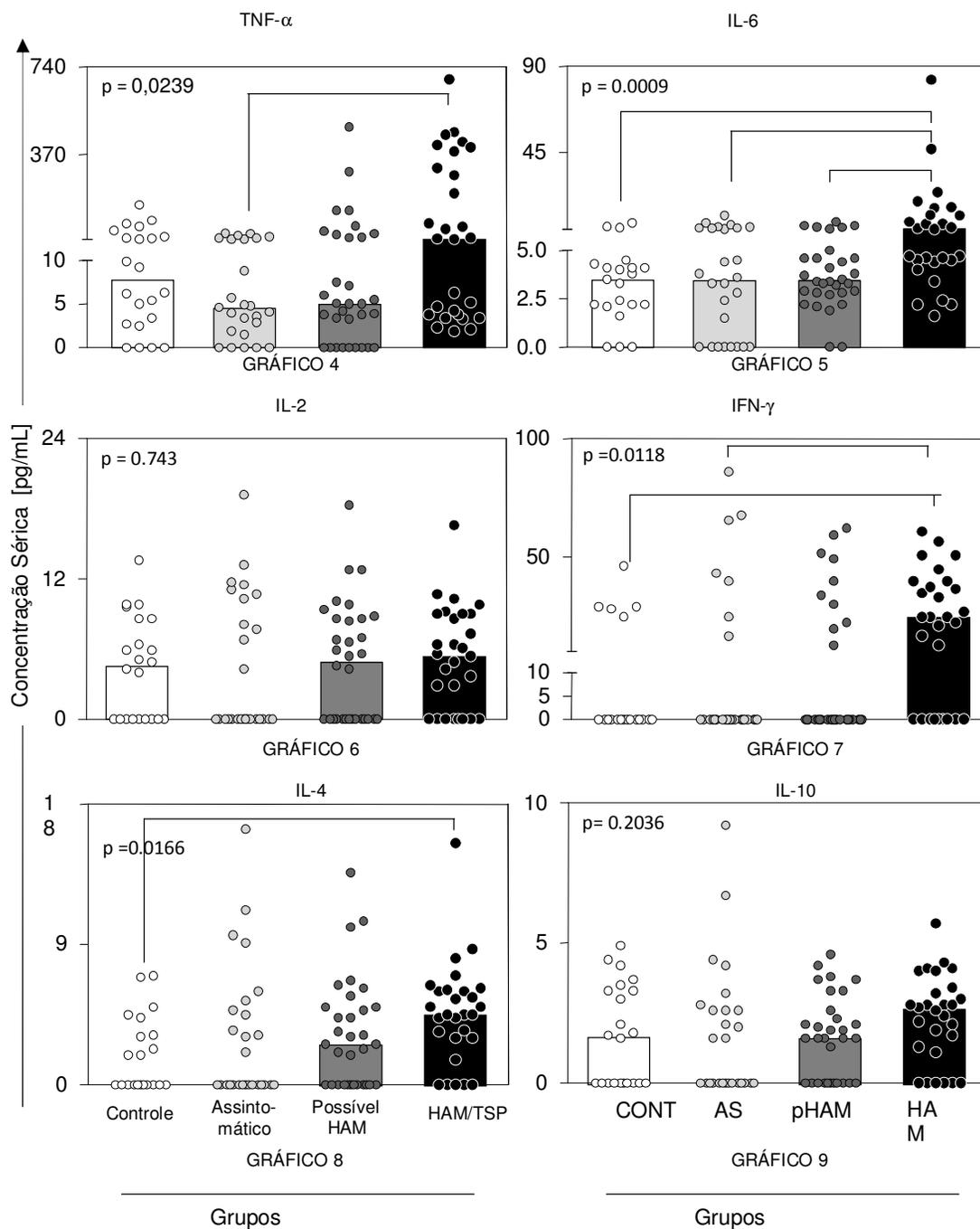


GRÁFICO 3 - Distribuição comparativa da carga proviral por grupo

A existência de diferença e quais grupos apresentaram diferenças significativa para os valores das citocinas é mostrado nos gráficos 4 a 9.

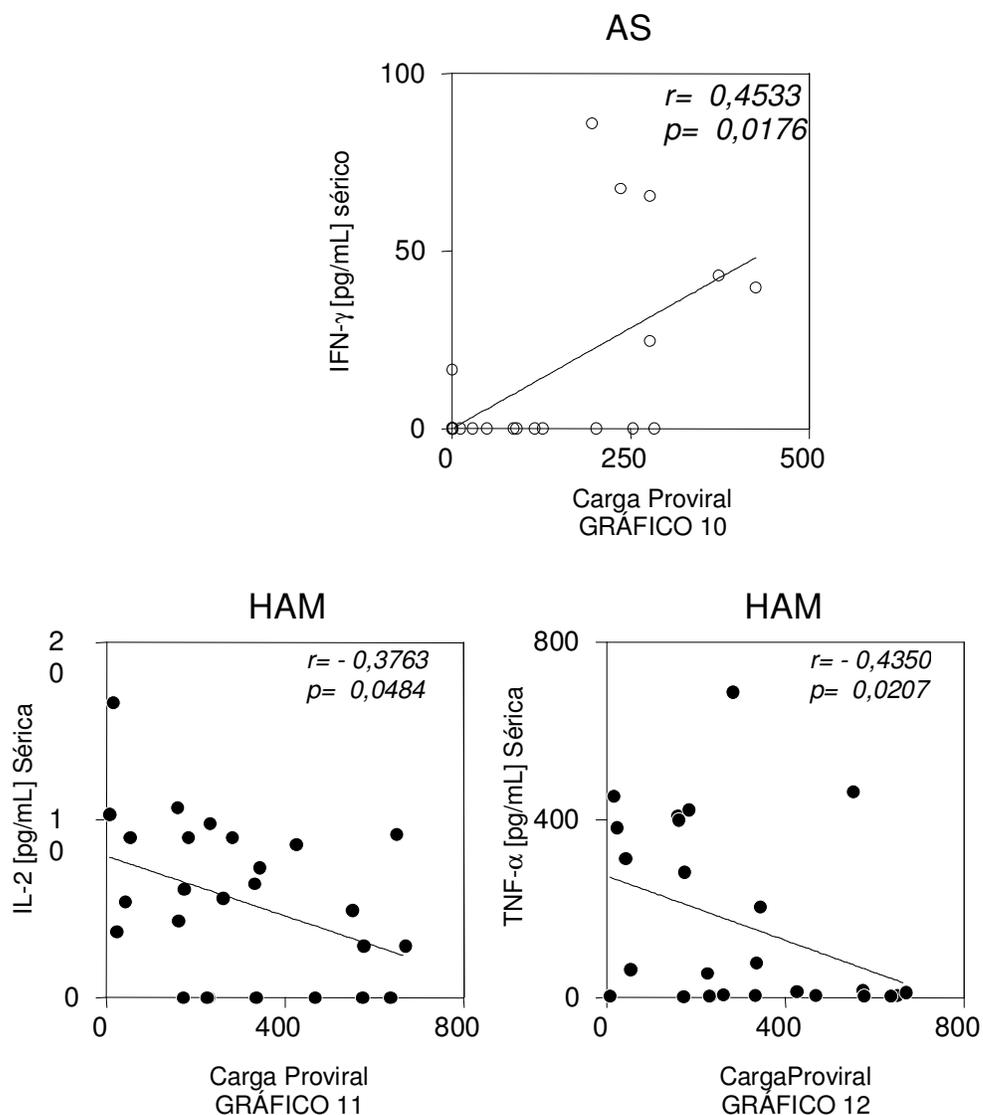
De acordo com o GRAF. 4, para a variável TNF- α houve diferença significativa apenas entre os grupos assintomático x HTLV HAM/TSP.

No GRAF.5, para a variável IL-6, observa-se diferença significativa entre os grupos, controle x HAM/TSP, assintomático x HAM/TSP e possível HAM/TSP x HAM/TSP. Para a variável IFN- γ houve diferença significativa entre os grupos controle e HAM/TSP; assintomático e HAM/TSP; possível HAM/TSP e HAM/TSP. Para a variável IL-4, houve diferença significativa entre os grupos controle e HAM/TSP. Quanto as citocinas IL-2 e IL-10 não houve diferença significativa entre os grupos.



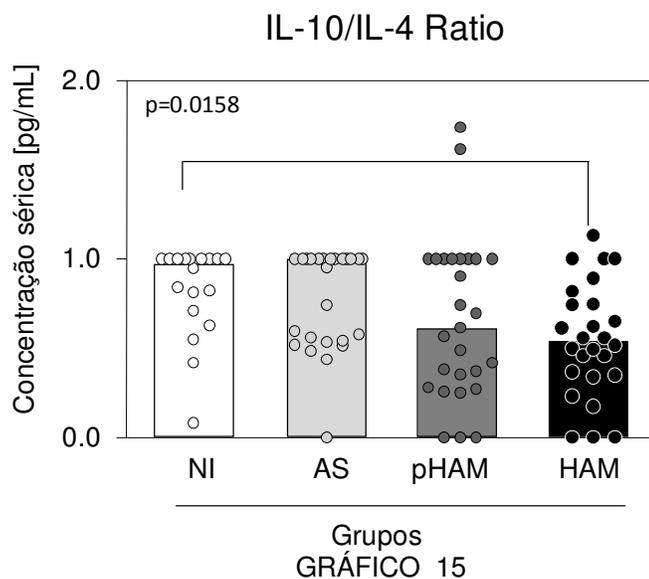
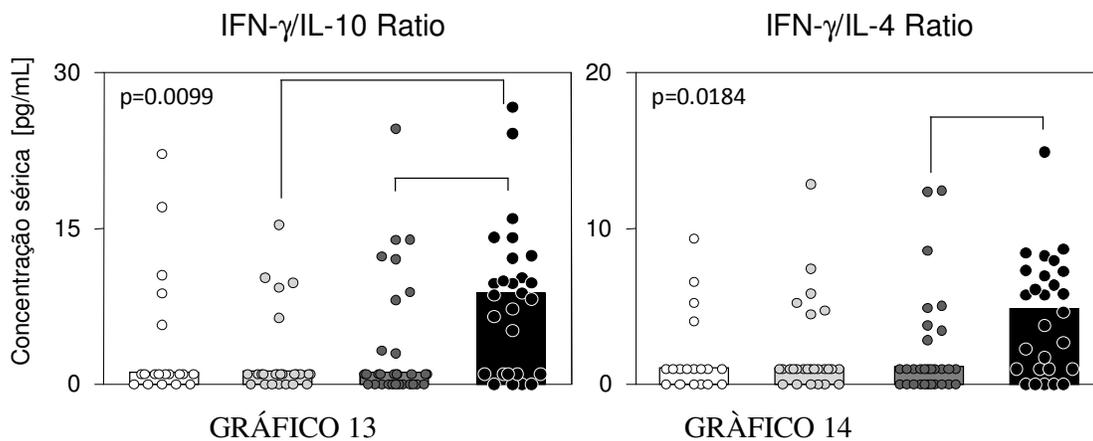
Gráficos 4 ao 9 - Distribuição comparativa quanto aos valores das citocinas através do teste de Kruskal-Wallis - Valor-p

Para avaliar a associação entre os valores da carga proviral e as demais citocinas, avaliados de forma contínua, foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman e sua significância. De acordo com os gráficos 10 a 12, houve correlação significativa e direta entre carga proviral e INF- γ para os pacientes assintomáticos para o HTLV-1. Entre os pacientes com HAM/TSP houve correlação significativa e inversa entre a carga proviral, TNF- α e IL-2 .



GRÁFICOS 10 -11 e 12: Correlação de Spearman entre a carga proviral e as citocinas INF- γ , IL-2 e TNF- α

A determinação da razão entre as citocinas e sua comparação inter grupos demonstrou diferença significativa da razão IFN- γ /IL-10 entre os grupos assintomático x HAM/TSP e possível HAM x HAM/TSP, diferença da razão IFN- γ /IL-4 entre os grupos possível HAM x HAM/TSP e diferença entre a razão IL-10/IL-4 entre os grupos controle x HAM/TSP.



Gráficos 10 ao 15 - Distribuição comparativa quanto aos valores das razões entre as citocinas através do teste de Kruskal-Wallis - Valor-p

6 DISCUSSÃO

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. Presume-se que o tamanho da amostra foi adequado para avaliar as diferenças entre os grupos

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 paciente, 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 verificaca-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 (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.

6.4 Características relacionadas às citocinas e carga proviral

Na TAB. 6 verificou-se que não houve correlação significativa entre as citocinas, a carga proviral e o gênero, demonstrando que o gênero não interferiu nos resultados. Da mesma forma, correlação entre faixa etária e valores das citocinas não apresentou significância estatística (TAB. 7). Logo, faixa etária não se caracterizou como possível fator de confusão.

A carga proviral significativamente aumentada, identificada nos indivíduos do grupo HAM/TSP, quando comparada aos outros grupos, (GRAF. 3) confirma o descrito na literatura por diversos autores como Manns *et al.* (1999) e Yamano *et al.* (2002). Estes autores ainda correlacionaram o aumento da carga com a progressão da doença.

Em estudo recente, Brito-Melo *et al.* (2006) sugeriram que o número aumentado dos linfócitos T-CD-4+ e TCD-8+ positivos para IL-10 observados em indivíduos infectados pelo HTLV-1 assintomáticos indicava um mecanismo de imunomodulação que definia o *status* desses indivíduos. No presente estudo, a análise estatística não evidenciou diferença significativa para os valores de IL-10. A diferença entre os resultados pode se justificar pelo

uso de métodos distintos empregados para a avaliação das interleucinas e pelo tamanho amostral diferenciado.

Os valores de IL-2 não apresentaram alteração significativa quando avaliados através de análise estatística comparativa entre os grupos. A análise de alguns estudos mostram resultados aparentemente contraditórios, Goon *et al.* (2003) verificaram o aumento de linfócitos T-CD-4+ para IL-2 em indivíduos com HAM/TSP após o cultivo dos mesmos por um período de seis horas. Em contrapartida Hanon *et al.* (2001) somente conseguiram detectar IL-2 nos PBMCs de indivíduos infectados pelo HTLV-1 (assintomáticos e HAM/TSP) após ativação e cultivo por seis horas e MACCHI *et al.* detectaram a perda da capacidade de expressão do gene para IL-2 em linfócitos infectados pelo HTLV-1. Sabe-se que a IL-2 é uma das interleucinas relacionadas à resposta TH-1 e que esta é a resposta predominante na infecção pelo HTLV-1. O motivo para estas aparentes diferenças ainda não está esclarecido. Lal e Rudolph (1991) sugeriram que o sequestro do mesmo pelo seu receptor poderia explicar esta diferença.

A análise dos valores de TNF- α no GRAF.4 demonstrou diferença significativa entre os grupos assintomático x HAM/TSP. Por ser uma citocina com atividade pró-inflamatória significativa, desempenhando papel central na coordenação da resposta inflamatória, vários trabalhos mostram o aumento na produção de TNF- α pelas células T de pacientes com HAM/TSP (GOON *et al.*, 2003; NISHIMURA *et al.*, 1996). O presente estudo veio confirmar este achado.

O INF- γ aparece significativamente alterado na comparação entre os grupos HAM/TSP x controle e HAM/TSP x assintomático, conforme GRAF. 7 Diversos estudos realizados em indivíduos infectados pelo HTLV-1 demonstram significativo aumento na produção do INF- γ pelos linfócitos T-CD-4+ e T-CD-8+, realçando a maior concentração no líquido e plasma desses indivíduos e uma possível correlação entre o aumento desta linfocina e o processo inflamatório observado na HAM/TSP (GOON *et al.*, 2004; MACCHI *et al.*, 1998; NISHIURA *et al.*, 1996; UMEHARA *et al.*, 1994).

Verifica-se no GRAF. 5, ao se analisar comparativamente as citocinas entre os grupos, que os valores de IL-6 encontram-se significativamente aumentados no grupo de pacientes com HAM/TSP quando comparados aos grupos controle, assintomático e possível HAM/TSP.

Analisando-se os dados da literatura sobre a produção dessa interleucina por células infectadas pelo HTLV-1, esses mostram mudança no perfil de produção desta, que ocorre tanto pelos linfócitos Th1 quanto Th2. Ambos passam a produzi-la com aumento significativo em seus níveis plasmáticos (LAL; RUDOLPH, 1991; MACCHI *et al.*, 1998; UMEHARA *et al.*, 1993).

Avaliando-se as publicações em relação à correlação significativa encontrada entre a IL-4 no cruzamento de dados dos grupos controle e HAM/TSP e assintomático e HAM/TSP, registraram-se diferentes achados. Nishiura *et al.* (1996), em estudo *in vitro*, detectaram a produção de IL-4 apenas em alguns indivíduos com HAM/TSP. Lal e Rudolph (1991), em outro estudo *in vitro*, não verificaram aumento significativo de IL-4 em PBMC. Essa interleucina faz parte da resposta TH-2 e a infecção pelo HTLV-1 pode mudar o perfil de produção da mesma (NISHIURA *et al.*, 1996).

Confirmou-se a diferença entre o perfil inflamatório dos pacientes do grupo HAM/TSP e os demais grupos, com a caracterização de uma resposta Th1, predominando INF- γ e TNF- α . Verificou-se sinais de imunomodulação, com resposta Th-2 através do aumento da IL-4 e IL6.

A análise da correlação entre as citocinas e a carga proviral dentro dos grupos mostrou uma relação direta entre o TNF- α e carga proviral no grupo assintomático e inversa no grupo HAM/TSP. Para TNF- α e IL-2, este tipo de diferença também foi observado por Goon *et al.* (2003, 2004) ao verificar que nos indivíduos infectados assintomáticos a resposta Th1 cresce na medida em que a carga proviral aumenta, mas não nos indivíduos com HAM/TSP. As cargas provirais foram semelhantes nos dois grupos, sugerindo a existência de diferenças qualitativas e quantitativas na resposta das células T-CD4+ ao HTLV-1.

Em síntese, o presente estudo confirmou os achados de BRITO-MELO (2006) em que o balanço entre a resposta Th1/Th2 encontra-se diretamente relacionada com a forma de evolução da infecção pelo HTLV-1. O indivíduo assintomático estaria controlando o dano viral a partir de uma resposta inflamatória ativada. O seu sistema imunológico estaria equilibrado a partir de uma resposta imunomoduladora da via Th2 que evitaria o dano neural, característica da HAM/TSP. Nesta doença, a resposta inflamatória estaria também aumentada

como ocorre no infectado assintomático. Contudo, a imunomodulação não estaria acontecendo.

7 CONCLUSÕES

- Os níveis de citocinas plasmáticas quando realizado a comparação entre os grupos, revelou-se significativamente alterado no grupo HAM/TSP em comparação com os demais grupos para o INF- γ , IL-6 e IL-4 e para o TNF- α .
- A comparação dos níveis da carga proviral entre os grupos mostrou-se significativamente alterado no grupo HAM/TSP em relação aos outros grupos.

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 a redução da carga proviral e a mudança do perfil das citocinas.

REFERÊNCIAS

1. AKIZUKI, S. *et al.* Necropsy findings in HTLV-I associated myelopathy. **Lancet**, v. 1, p. 156, 1987.
2. ALLAIN, J.P. *et al.* Transfusion-transmitted infectious diseases. **Biologicals**, v. 37, p. 71-77, 2009.
3. BANGHAM, C.R.M.; OSAME, M. Cellular immune response to HTLV-1. **Oncogene**, v. 24, p. 6035–6046, 2005.
4. 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. **J Immunol**, v. 159, p. 2018–25, 1997.
5. BORDUCCHI, D.M.M.; KERBAUY, J.; OLIVEIRA, J.S.R. Linfoma/leucemia de células T do adulto. **Rev Ass Med Br**, v. 45, n. 1, p. 63-70, 1999.
6. 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. **Clin Exp Immunol**, v. 147, n. 1, p. 35-44, Jan. 2006.
7. CASTRO-COSTA, C.M. *et al.* Proposal for diagnostic criteria of tropical spastic paraparesis/htlv-i-associated myelopathy (TSP/HAM); **AIDS. Res Hum Retroviruses**, v. 22, n. 10, pp. 931–935, 2006.
8. CATALAN-SOARES, B.C. PROIETTI, F.A.; CARNEIRO-PROIETTI, A.B.F. Os vírus linfotrópicos de células T-humanos (HTLV) na última década (1990-2000): aspectos epidemiológicos. **Rev Bras Epidemiol**, São Paulo, v. 4, n. 2, Aug. 2001.
9. 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-T help via APC activation. **J Experiment Med**, v. 184, p. 747-752, 1996.
10. CHEN, R. *et al.* Simultaneous quantification of six cytokines in a single sample using microparticle-based flow cytometric technology. **Clin Chem**, v. 9, p. 1693-1694, 1999.
11. DAENKE, S.; BANGHAM, C.R. Do T-cells cause HTLV-1-associated disease?: a taxing problem. **Clin Exp Immunol**, v. 96, p. 179–181, 1994.
12. DINARELLO, C.A. Cytokines: interleukin-1 and tumour necrosis factor in inflammation, p. 108–111. *In*: WARRELL, D.A. (ed.). **Oxford textbook of medicine**. 4. ed., v. 1. Oxford University Press, Oxford, England, 2003.

13. 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,p. 1180-1184, 2008.
14. FONG, Y. *et al.* Antibodies to cachectin/tumor necrosis factor reduce interleukin 1beta and interleukin 6 appearance during lethal bacteremia. **J Exp Med**, v. 170, p. 627–1633, 1989.
15. GALLO, R.C. History of the discoveries of the first human retroviruses: HTLV-1 and HTLV-2. **Oncogene**, v. 24, p. 5926–5930, 2005.
16. GONÇALVES, D.U. *et al.* HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP) Inflammatory Network. **Inflammation & Allergy**, v.7, n.2, p.98-107, 2008.
17. GOON, P.K.C. *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, p. 3335–3341, 2002.
18. GOON, P.K.C. *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. **J Virol**, v. 77, n. 17, p. 9716-9722, Sep. 2003.
19. GOON, P.K.C. *et al.* Human T Cell Lymphotropic Virus Type I (HTLV-I)- Specific CD4+T Cells: Immunodominance Hierarchy and Preferential Infection with HTLV-I. **J Immunol**, n.172, p.1735-1743, 2004.
20. 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, p. 1386–1392, 2000.
21. HANON E. *et al.* High production of interferon but not interleukin-2 by human T-lymphotropic virus type I-infected peripheral blood mononuclear cells. **Blood**, v. 98, n. 3, pp. 721-726, Aug. 2001.
22. HIGUCHI, M. *et al.* Membrane tumor necrosis factor-alpha (TNF-) expressed on HTLV-I-infected T-cells mediates a costimulatory signal for B cell activation - characterization of membrane TNF- α . **Clin Immunol Immunopathol**, v. 82, p. 133–140, 1997.
23. IJICHI, S. *et al.* An autoaggressive process against bystander tissues in HTLV-I-infected individuals: a possible pathomechanism of HAM/TSP. **Med Hypotheses**, v. 41, p. 542–547, 1993.
24. IZUMO, S. *et al.* The neuropathology of HTLV-I-associated myelopathy in Japan: report of na autopsy case and review of the literature. *In*: ROMAN, G.C. *et al.* (ed.). **HTLV-I and the nervous system**. Liss, New York, p.261, 1988.
25. IZUMO, S.; UMEHARA, F.; OSAME, M. Neuropathology of human T-lymphotropic virus type I – associated myelopathy. **Neuropathology**, v. 17, p. 49-51, 1997.

26. IWASAKI, Y. *et al.* Infiltration of helper/inducer T-lymphocytes heralds central nervous system damage in human T-cell leukemia virus infection. **Am J Pathol**, v. 140, p. 1003–1008, 1992.
27. JANEWAY, C.A. **Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença.** Porto Alegre: Artes Médicas, 6. ed., 2006.
28. JANSSEN, E.M. *et al.* CD4 T-cells are required for secondary expansion and memory in CD8 T-lymphocytes. **Nature**, v. 421, p. 852–856, 2003.
29. JEFFERY, K.J.M. *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. **J Exp Med**, v. 184, n. 4, p. 741-6, Oct. 1996.
30. JEFFERY, K.J.M. *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 p. 3848–3853, Mar. 1999
31. KINDT, T.J.; GOLDSBY, R.A.; OSBORNE, B.A. **Imunologia de Kuby.** 6. ed., Porto Alegre: Editora Artmed, 2008. 704 p.
32. KOBAYASHI, N. *et al.*, Genomic structure of HTLV (human T-cell leukemia virus): detection of defective genome and its amplification in MT-2 cells. **Embo J**, v.3, n.6. p. 1339–1343, Jun. 1984.
33. 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. Downloaded from jem.rupress.org on September 8, 2009
34. KODAMA, D. *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, p. 3848–3853, 1999.
35. 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, p. 571-574, 1991.
36. LEVIN, M.C.; JACOBSON, S.J. HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP): A chronic progressive neurologic disease associated with immunologically mediated damage to the central nervous system. **J Neurovirol**, v. 3, n. 2, p. 126-138, 1997.
37. LEZIN, A. *et al.* Human T Lymphotropic Virus Type I (HTLV-I) Proviral Load in Cerebrospinal Fluid: A New Criterion for the Diagnosis of HTLV-I-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis? **The Journal of Infectious Diseases**; v.191, n. 4, p.1830–1834, 2005.
38. MACCHI, B. *et al.* Human Th1 and Th2 T-cell clones are equally susceptible to infection and immortalization by human T-lymphotropic virus type I. **J Gen Virology**, v. 79, p. 2469–2474, 1998.

39. MACHADO, P.R.L. *et al.* Immune response mechanisms to infections. **An Bras Dermatol**, Rio de Janeiro, v. 79, n. 6, Dec. 2004 .
40. MANNS, A. *et al.* Quantitative proviral DNA and antibody levels in the natural history of HTLV-I infection. **J Infect Dis**, v. 180, p. 1487–1493, 1999.
41. MANNS, A.; HISADA, M.; GRENADE, L.L. Human T-lymphotropic virus type I infection. **Lancet**, v. 353, p. 1951-1958, 1999.
42. 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. **J NeuroVirology**, v. 7, n. 3, p. 228–234, 2001.
43. MOE, 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 Neuropathol**, v.100, p. 245–252, 2000.
44. MUNIZ, A.L. *et al.* Association of cytokines, neurological disability, and disease duration in HAM/TSP patients. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 64, n. 2a, p. 217-221, jun. 2006.
45. NAKAMURA, S. *et al.* Detection of tumor necrosis factor-alpha-positive cells in cerebrospinal fluid of patients with HTLV-I-associated myelopathy. **J Neuroimmunol**, v. 42, p. 127–130, 1993.
46. NISHIMOTO, N. *et al.* Elevated levels of interleukin-6 in serum and cerebrospinal fluid of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **J Neurol Sci**, v. 97, n. 2-3, p. 183-93, Jul. 1999.
47. NISHIURA, Y. *et al.* Increased production of inflammatory cytokines in cultured CD4 cells from patients with HTLV-I-associated myelopathy. **Tohoku J Exp Med**, v. 179, p. 227–233, 1996.
48. OSAME, M. *et al.* Chronic progressive myelopathy associated with elevated antibodies to human T-lymphotropic virus type I and T-cell leukemia-like cells. **Ann Neurol**, v. 21, p. 117, 1987.
49. POIESZ, B.J. *et al.* Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. **Proc Natl Acad Sci, USA**, v. 77, n. 12, pp. 7415-7419, Dec. 1980.
50. PORTO, A.F. *et al.* Implicações clínicas e imunológicas da associação entre HTLV-1 e estrogênio. **Rev Soc Br Med Trop**, v. 35, n. 6, p. 641-649, 2002.
51. PROIETTI, A.B.F.C. *et al.* **Cadernos Hemominas**. 4. ed. Belo Horizonte: Fundação Hemominas, 2006. 304 p.
52. RICHARDSON, J.H. *et al.* In vivo cellular tropism of human T-cell leukemia virus type 1. **J Virol**, v. 64, p. 5682–5687, 1990.

54. SAKAI, I. *et al.* Expression of the Gfi-1 gene in HTLV-I-transformed T-cells. **Int J Hematol**, v. 73, n. 4, pp. 507-516, 2001.
55. 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. **J Experiment Med**, v. 179, p. 1109-1118, Copyright©, Rockefeller University Press, 1994.
56. SANTOS, F.L.N.; LIMA, F.W.M. Epidemiologia, fisiopatogenia e diagnóstico laboratorial da infecção pelo HTLV-I. **J Bras Patol Med Lab**, v. 41, n. 2, p. 105-16, 2005.
57. TAKENOUCI, N. *et al.* Usefulness of proviral load measurement for monitoring of disease activity in individual patients with human T-lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical paraparesis. **J Neurovirol**, p. 929-35, 2003.
58. TAYLOR, G.P.; MATSUOKA, M. Natural history of adult T-cell leukemia/lymphoma and approaches to therapy. **Oncogene**, v. 24, p. 6047-6057, 2005.
59. TAYLOR, G.P. *et al.* Zidovudine plus lamivudine in Human T-lymphotropic virus type-I-associated myelopathy: a randomised trial. **Retrovirology**, v. 3, p. 63, 2006.
60. UMEHARA, F. *et al.* Immunocytochemical analysis of the cellular infiltrate in the spinal cord lesions in HTLV-I-associated myelopathy. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 52, p. 424-430, 1993.
61. UMEHARA, F. *et al.* Cytokine expression in the spinal cord lesions in HTLV-I-associated myelopathy. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 53, p. 72-77, 1994.
62. VERDONCK, K. Human T-lymphotropic virus 1: recent knowledge about an ancient infection. **Lancet Infect Dis**, v. 7, Issue 4, p. 266-281, Apr. 2007.
63. 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.
64. 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. **J Clin Investig**, v. 77: p. 1466-1473, 1986

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

UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP
------	--

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 Eleza 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 (OES) 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: Geral: Avaliação do perfil das citocinas e quimiocinas plasmáticas e carga proviral, em sangue periférico, como indicadores de progressão da infecção pelo HTLV1. Específicos: 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 ()
Data: 05/11/2007	Data:
17. Cronograma de execução: 17 meses	
Início: Fim:	18. Enviar relatórios em:
19. Encaminhamento à CONEP:	após 12 meses e término da execução do projeto
Os dados acima para registro () O projeto para apreciação () Data:	20. Coordenador
	 Assinatura <small>da Enq. em Pesquisa</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

linfo nodos:

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}: /__/
 esquerdo {V209}: /__/

MI Distal

direito {V210}: /__/
 esquerdo {V211}: /__/

atrofia {V212} muscular /__/

marcha {V213}: /__/
 coordenação:
 MS
 direito {V214}: /__/
 esquerdo {V215}: /__/
 MI
 direito {V216}: /__/
 esquerdo {V217}: /__/

Romberg {V218}: /__/
 Movimentos anormais {V219}: /__/

Conclusao{V220} /__/

{Class}ificação {HTLV} /__/

EXAMES COMPLEMENTARES

{Hb}: /__/_
 {Leuc}ócitos: /_/_/_/_
 {Linfo}citos: /_/_/_/_/_
 {Plaquetas}: /_/_/_/_/_
 {antiHCV}: /__/
 {HbsAg}: /__/
 {FAN}: /__/
 {VDRL}: /__/

{HIV}: /__/
 {HIVELISA}: /__/
 {HIVWEST} BLOT: /__/
 {PCR}: /__/
 Se positivo/__/
 {Genótipo}: /__/
 {CargaViral}: /_/_/_/_/_/_
 Dosagem de {CD4+1}: /_/_/_/_/_/_
 Dosagem de {CD4+2}: /_/_/_/_/_/_

{HTLV1}/__/
 {HTLVELISA}: /__/
 {HTLVWEST} BLOT: /__/
 Carga {Proviral}: /_/_/_/_/_/_

{Ressonan}cia magnética: /__/

Descrição das {alt}erações da {RM}_____

Citocinas

{INF}gama: /_/_/_/_/_/_
 {TNF}alfa: /_/_/_/_/_/_
 {IL2}: /_/_/_/_/_
 {IL12}: /_/_/_/_/_/

Quimiocinas

{CCL2}: /_/_/_/_/_/_
 {CCL3}: /_/_/_/_/_/_
 {CCL5}: /_/_/_/_/_/_
 {CCL11}: /_/_/_/_/_/_
 {CCL24}: /_/_/_/_/_/_
 {CXCL8}: /_/_/_/_/_/_
 {CXCL9}: /_/_/_/_/_/_
 {CXCL10}: /_/_/_/_/_/