

PATRICIA APARECIDA MONTANHEIRO

QUANTIFICAÇÃO DE CARGA PROVIRAL DO VÍRUS
LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T HUMANAS TIPO 1 (HTLV-1)
E MARCADORES IMUNOLÓGICOS EM INDIVÍDUOS
PORTADORES E PACIENTES COM TSP/HAM

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para obtenção do Título de Doutor
em Microbiologia

São Paulo

2007

QUANTIFICAÇÃO DE CARGA PROVIRAL DO VÍRUS
LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T HUMANAS TIPO 1 (HTLV-1) E
MARCADORES IMUNOLÓGICOS EM INDIVÍDUOS PORTADORES E
PACIENTES COM TSP/HAM

PATRICIA APARECIDA MONTANHEIRO

Dissertação de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de Doutor em
Microbiologia

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador: Dr. Jorge Simão do Rosário Casseb

São Paulo

2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Patrícia Aparecida Montanheiro.

Título da Tese: Quantificação da carga proviral do vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1 (HTLV-1) e marcadores imunológicos em indivíduos portadores e pacientes com paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1 (TSP/HAM) .

Orientador(a): Jorge Simão do Rosário Casseb.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a):Assinatura:.....

Nome:

Instituição:

Examinador(a) Assinatura:.....

Nome:

Instituição:

Examinador(a):

Assinatura:.....

Nome:

Instituição:

Examinador Assinatura:.....

Nome:

Instituição:

Presidente: Assinatura:.....

Nome:

Instituição:

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Montanheiro, Patrícia Aparecida.
Quantificação da carga proviral do vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1 (HTLV-1) e marcadores imunológicos em indivíduos portadores e pacientes com paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1 (TSP/HAM) / Patrícia Aparecida Montanheiro. -- São Paulo, 2007.

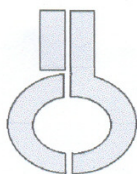
Orientador: Jorge Simão do Rosário Casseb.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Virologia.

Versão do título para o inglês: Human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) DNA proviral load quantification and immunological markers among healthy carriers HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (TSP/HAM) patients.

Descritores: 1. HTLV-1 2. TSP/HAM 3. Carga pro viral 4. Citocinas 5. Quimiocinas 6. PCR real time I. Casseb, Jorge Simão do Rosário II. Universidade São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

ICB/SBIB072/2007



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 20 de junho de 2006.

PARECER 716/CEP

Prezada Senhora,

Atendendo sua solicitação, a *Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB*, em sua 66^a reunião realizada em 19.06.06, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: *"Quantificação de carga proviral (DNA e RNA) de HTLV-I por PCR em tempo real e padronização de marcadores de citocinas e quimiocinas do HTVL-I e da HAM/TSP pelos métodos de Elisa e PCR em tempo real"*.

Informo a V.Sa. que, após análise e discussão, o referido projeto foi **aprovado por esta Comissão.**

Esclareço a V.Sa. que dentro de 12 meses, relatório do referido projeto deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP.

Atenciosamente,

Prof. Dr. LUIZ VICENTE RIZZO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Ilma. Sra.
PATRICIA APARECIDA MONTANHEIRO
Departamento de Microbiologia
Instituto de Ciências Biomédicas -USP

Dedicatória

Mensagem de Paulo

“Ainda que eu fale a língua dos homens e dos anjos, se não tiver amor/caridade, sou como um bronze que soa, ou como um címbalo que tine. E ainda que eu tivesse o dom da profecia e conhecesse todos os mistérios q toda a ciência, e tivesse toda a fé, até o ponto de transportar montes, se não tivesse amor/caridade, não seria nada. E ainda que distribuísse todos os meus bens no sustento dos pobres e entregasse o meu corpo para ser queimado, se não tivesse amor/caridade, nada disto me aproveitaria”.

O amor/caridade é paciente, é benéfico; o amor/caridade não é invejoso, não é temerário; não se ensoberbece, não é ambicioso, não busca os seus próprios interesses, não se irrita, não suspeita mal, não folga com a injustiça, mas folga com a verdade; tudo desculpa, tudo crê, tudo espera, tudo sofre.

O amor/caridade nunca há de acabar, mas as profecias passaram, as línguas cessarão e a ciência será abolida. Com efeito, imperfeitamente conhecemos e imperfeitamente profetizamos. Mas, quando vier o que é perfeito, será abolido o que é imperfeito.

Quando eu era menino, falava como menino, apreciava como menino, discorria como menino. Mas, quando me tornei homem feito, dei de mão às coisas que eram de menino.

Nós agora vemos como por um espelho, sem enigma; mas então veremos face a face. Agora conheço, em parte; mas, então, ei de conhecer perfeitamente, como eu mesmo sou conhecido.

Agora, pois, permanecem estas três coisas: a fé, a esperança e o amor/caridade; porém o maior deles é o amor/caridade.” (1 Coríntios 13)

A Deus, a força mais esplendorosa que existe, que me dá forças todos os dias, me ensina a amar e aprender com os meus próprios erros, por estar presente nas horas de tristes e alegres. E por permitir que estudos sejam realizados em prol da humanidade.

Obrigada pela nova chance de aprender e auxiliar, sem julgar nenhum irmão.

*“A gente pode morar numa casa mais ou menos,
Numa rua mais ou menos,
Numa cidade mais ou menos,
E até ter um governo mais ou menos,*

*A gente pode dormir numa casa mais ou menos,
Comer um feijão mais ou menos,
E ter um transporte mais ou menos,
E até ser obrigado a acreditar mais ou menos no futuro.*

*A gente pode olhar em volta
E sentir que tudo está mais ou menos.*

Tudo bem.

*O que a gente não pode,
Mesmo, nunca, de jeito nenhum.
É amar mais ou menos,
É sonhar mais ou menos,
É ser amigo mais ou menos,
É namorar mais ou menos,
É ter fé mais ou menos,
E acreditar mais ou menos.*

*Se não, agente corre o risco de se tornar
Uma pessoa mais ou menos.”*

(Chico Xavier)

Ao meu marido Marcos, pelos momentos de companheirismo, estímulo e amor.
A memória de meu pai, Oswaldo, e a minha mãe, Neide, que foram e são o pilar
de minha educação e do que sou.
Aos amigos, que materialmente e/ou espiritualmente fazem parte de minha vida, e
deste trabalho.

*“Deus nos concede, a cada dia, uma página de vida nova no livro do tempo.
Aquilo que colocamos nela corre por nossa conta.”*

Para nossos pacientes, no qual devemos toda
nossa atenção, amizade e carinho.

*“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar
agora e fazer um novo fim.” (Chico Xavier)*

“Nunca esquecer: não estamos sós, sempre há um amigo a zelar por nós”

A todos que lutam pelo mesmo ideal: fraternidade, felicidade e justiça.

E principalmente, ao meu querido Esmael/Samuel por jamais me esquecer, e estar
comigo em todos os momentos de minha vida, passando sempre confiança e
esperança de dias melhores.

Agradecimentos:

*“Se você realmente ama aqueles que lhe compartilham a estrada,
ajude-os a ser livres para encontrarem a si mesmos,
tal qual deseja você a independência própria para ser você,
em qualquer lugar.”*

(André Luiz - Chico Xavier)

A meu orientador, **Prof. Dr. Jorge Casseb**, médico responsável pelo ambulatório de HTLV I/II do Instituto de Infectologia “Emílio Ribas”, por toda ajuda e amizade que me ofertou nestes anos de convivência.

Ao Prof. Dr. Alberto J. S. Duarte, diretor do laboratório de imunogenética e transplante experimental - LIM56.

A todos professores dos cursos realizados durante este trabalho, considerados por mim, jóias valiosas e verdadeiros incentivadores da pesquisa.

A toda equipe dos grupos de citometria (Noemia e Rosângela), carga viral de HIV (Rosa e Valéria) e cultura celular (Soraia), pela disposição e auxílio.

A todos que participam do Ambulatório de HTLV-1, Dr Augusto Penalva de Oliveira, Dr. Jerusa, Dr. Paulina Posada, Dr Mariana, aos fisioterapeutas, etc.

Ao auxílio direto do grupo de retrovírus sob a orientação do Dr. Prof. Jorge Casseb, especialmente a Lígia e Ingrid, pela colaboração neste trabalho. Ao Fabio Cabral pelo auxílio constante neste trabalho.

A minha eterna amiga Paula Rigato, por sempre achar um tempo para estar ao meu lado, e ser a companheira de longos anos.

A Alice, secretária da pós-graduação, pela simpatia, amizade e ajuda imprescindível nos assuntos burocráticos. A Olivete, Edna, Lúcio, Adriana, Luiz, que sempre resolveram assuntos burocráticos e me auxiliaram nos dados dos pacientes.

Aos companheiros e colegas de trabalho que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Principalmente, a **FAPESP** que financiou este estudo (03/0841-3), e meu auxílio durante os anos de pesquisa.

SUMÁRIO

	Lista de Abreviações e siglas	
	Lista de símbolos	
	Lista de figuras	
	Lista de tabelas	
	Lista de anexos	
	Resumo	
	Abstract	
1	Introdução	21
2	Revisão da literatura	24
2.1	Histórico	25
2.2	Características biológicas do HTLV-1	26
2.2.1	Estrutura da partícula viral	26
2.2.2	Genoma do HTLV-1	28
2.3	Ciclo de replicação	32
2.4	Doenças relacionadas ao HTLV-1	35
2.5	Resposta imune na infecção HTLV-1	42
2.6	Marcador de risco: carga proviral	49
3	Objetivos	51
3.1	Objetivo geral	52
3.2	Objetivos específicos	52
4	Metodologia	53
4.1	Casuística	54
4.1.1	Critérios de avaliação dos pacientes	54
4.1.2	Aspectos éticos	55
4.2	Metodologia	55
4.2.1	Cultura celular	55
4.2.2	Dosagem de citocinas e quimiocinas	56
4.2.3	Quantificação de citocinas por PCR real time	57
4.2.4	Quantificação da carga proviral do HTLV-1	58

4.2.5	Análise estatística	60
5	Resultados	61
5.1	Descrição dos pacientes com infecção HTLV	62
5.2	Carga proviral do HTLV-1	63
5.3	Análise da carga proviral ao longo do tempo de infecção	66
5.4	Carga proviral no líquor	69
5.5	Dosagem de citocinas por ELISA	73
	Produção de IL-2 pela CMN	73
	Produção de IL-2R pela CMN	75
	Produção de INF- γ pela CMN	76
	Produção de TNF- α pela CMN	77
	Produção de IL-4 pela CMN	78
	Produção de IL-10 pela CMN	80
	<i>Produção de IL-12 p70 pela CMN</i>	81
5.6	Quantificação de citocinas pela PCR real time	82
	Expressão de TNF- α nas CMN	82
	Expressão de INF- γ nas CMN	83
5.7	Dosagem de Quimiocinas pelo ELISA	85
6	Discussão	88
7	Conclusão	101
8	Referencias bibliográfica	103
9	Anexos	132

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

°C	Graus Celsius
aa	Aminoácido
Aids	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
APC	<i>Antigen-presenting cells</i> - Células apresentadoras de antígenos
ARV	<i>Antiretroviral</i>
ART	<i>Anti-retroviral Therapy</i> – Terapia antiretroviral
ATL	Leucemia de células T no adulto
B7	Molécula co-estimulatória de células T
CC	Família de quimiocinas – CC (baseado na posição de cisteína)
CCR5	Receptor 5 de β -quimiocina
CXC	Família de quimiocinas – CX (baseado na posição de cisteína)
CXCR4	Receptor 4 de α -quimiocina
CD	Classe de diferenciação
CD3	Classe de diferenciação 3
CD4	Classe de diferenciação 4
CD8	Classe de diferenciação 8
CDC	<i>Centers for Diseases Control and Prevention</i> – Centro de Controle e Prevenção de Doenças
<i>c-myc</i>	Proteína codificada pelo gene <i>tax</i>
<i>c-sis</i>	Proteína codificada pelo gene <i>tax</i>
CTL	Linfócitos T citolíticos
CxCR-4	Receptor 4 de β -quimiocina
DI	Dermatite infecciosa
Cel	Célula
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
<i>c-fos</i>	Proteína codificada pelo gene <i>tax</i>
<i>c-myc</i>	Proteína codificada pelo gene <i>tax</i>
<i>c-sis</i>	Proteína codificada pelo gene <i>tax</i>
CMN	Células mononucleares
CTL	Linfócitos T citolíticos
CxCR-4	Receptor 4 de β -quimiocina
DI	Dermatite infecciosa
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Deoxinucleosídeo trifosfato
EIA	Ensaio imunoenzimático
ELISA	Ensaio imunoenzimático
Env	Gene do envelope viral
EUA	Estados Unidos da América
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i> – Isotiocianato de Fluoresceína
Gag	Gene do core viral
GM-CSF	Fator de crescimento de granulócitos

Gp	Glicoproteína
Gp41	Glicoproteína 41
Gp120	Glicoproteína 120
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HAM	Mielopatia associada ao HTLV-I
HC/FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HCV	Vírus da hepatite C
HIV-1	Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 1
HLA	Complexo principal de histocompatibilidade
HLA-A*02*	Antígeno leucocitário halótipo A*02*
HTLV	Vírus Linfotrópico de Células T Humana
HTLV-1	Vírus Linfotrópico de Células T Humana Tipo 1
HTLV-2	Vírus Linfotrópico de Células T Humana Tipo 2
HTLV-3	<i>Human T cell leukemia/lymfotropic virus type 3</i> - Vírus Linfotrópico de Células T Humana
ICAM-1	Molécula de adesão intracelular – 1
IDAV	<i>Immune deficiency-associated virus</i> - Associado à Deficiência Imune
IgG1	Imunoglobulina G de classe 1
IgG2a	Imunoglobulina G de classe 2a
IgM	Imunoglobulina M
IL- 4	Interleucina 4
IL-10	Interleucina 10
IIER	Instituto de Infectologia “Emílio Ribas”
IL-1	Interleucina tipo 1
IL-1β	Interleucina tipo 1 fração beta
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina tipo 13
IL-15	Interleucina 15
IL-15R	Receptor de interleucina tipo 15
IL-18	Interleucina 18
IL-2	Interleucina tipo 2
IL-2R	Receptor de Interleucina tipo 2
IL-2Rα	Receptor alfa de Interleucina tipo 2
IL-2Rha	Receptor de Interleucina tipo 2 humanizado
IL-3	Interleucina 3
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-9	Interleucina 9
INF-γ	Interferon-gama
LCR	Líquor cefaloraquidiano
LFA-1	Linfócitos de antígeno 1
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i> – Longas repetições terminais
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MIP-1α	Proteína inflamatória de macrófago tipo 1α

MIP-1 β	Proteína inflamatória de macrófago tipo 1 β
M-Trópico	Macrófago trópico
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
NIAD	<i>National Institute of Infectious Diseases</i> – Instituto Nacional de Doenças infecciosas
NIH	Instituto Nacional de Saúde
NK	Natural <i>Killer</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
P27	Proteína 27
P40	Proteína 40
P70	Proteína 70
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PHA	<i>Phytohemagglutinin</i> - Fitohemaglutinina
Pol	Gene da polimerase
pX	Região pX do HTLV-1
RANTES	“Regulated on activation, normal T expressed and secreted” regulação e ativação da expressão e secreção das célula T normal
Rev	Proteína rev do HTLV
RNA	Ácido ribonucléico
RNAse	Livre (sem) de RNA
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Transcriptase reversa
SDF-1	<i>Stromal derived factor-1</i> - Fator derivado de estroma-1
SIV	Vírus da imunodeficiência símia
SNC	Sistema Nervoso Central
STAT	Transdutores de sinal e ativadores de transcrição
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
T-Trópico	Linfócito T trópico
Th1	Linfócito T <i>helper</i> 1 - Linfócito T auxiliar 1
Th2	Linfócito T <i>helper</i> 2 - Linfócito T auxiliar 2
Tac	Receptor de IL-2
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TGF- β	Fator beta de crescimento
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF	Fator de necrose tumoral
TNF- α	Fator necrose tumoral – alfa
TRNAP _{ro}	Primer iniciador
TSP/HAM	Paraparesia espástica tropical /mielopatia associada ao HTLV-I
UDI	Usuário de drogas intravenosas
USP	Universidade de São Paulo
VCAM-1	Molécula de adesão das células vasculares – 1
WB	"Western-blot"

Lista de símbolos

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
κ	Kilo
μ	Micro
μg	Microgramas
μL	Microlitro
mL	Mililitro
MM	Milimolar
nm	Nanômetro
pb	Pares de bases
Pg	Picogramas
rpm	rotações por minuto
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura das partículas virais infectando linfócito T	27
Figura 2 -	Estrutura da partícula viral do HTLV.	28
Figura 3 -	Esquematização do genoma do HTLV-1/2.	29
Figura 4 -	Replicação viral	34
Figura 5 -	Replicação viral célula a célula	34
Figura 6 -	Desmielinização medular pelo vírus HTLV-1	37
Figura 7 -	Hipóteses imunológicas para o desenvolvimento da TSP/HAM	40
Figura 8 -	Resumo das hipóteses imunológicas	42
Figura 9 -	Células T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ na carga proviral	65
Figura 10 -	Carga proviral do HTLV-1	65
Figura 11 -	Carga proviral de TSP pelo tempo de doença	66
Figura 12 -	Carga proviral ao longo do tempo em indivíduos assintomáticos	67
Figura 13 -	Carga proviral ao longo do tempo na TSP/HAM	69
Figura 14 -	Carga proviral no líquor	71
Figura 15 -	Células T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ na dosagem de citocinas e quimiocinas	73
Figura 16 -	Produção de IL-2 em CMN	74
Figura 17 -	Produção de IL-2R em CMN	75
Figura 18 -	Produção de INF- γ em CMN	76
Figura 19 -	Produção de TNF- α em CMN	78
Figura 20 -	Produção de IL-4 em CMN	79
Figura 21 -	Produção de IL-10 em CMN	80
Figura 22 -	Produção de IL-12 p70 em CMN	81
Figura 23 -	Expressão de mRNA de TNF- α pela PCR em tempo real	81
Figura 24 -	Expressão de mRNA de INF- γ pela PCR em tempo real	84
Figura 25 -	Produção de RANTES em CMN	85
Figura 26 -	Produção de MIP-1 α em CMN	86
Figura 27 -	Produção de MIP-1 β em CMN	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Dados gerais na quantificação da carga proviral	64
Tabela 2 -	Dados gerais para análise longitudinal	68
Tabela 3 -	Carga proviral no líquido	70
Tabela 4 -	Dados gerais na dosagem de citocinas e quimiocinas	72

LISTA DE ANEXOS

- Anexo 1 Termo de consentimento
- Anexo 2 Artigo sobre carga proviral do HTLV-1
- Anexo 3 Artigo sobre quimiocinas na infecção pelo HTLV-1
- Anexo 4 Carga proviral do HTLV-1 (homens e mulheres)
- Anexo 5 Dosagem de citocinas e quimiocinas no líquido de pacientes com TSP/HAM
- Anexo 6 Expressão de mRNA de IL-2

MONTANHEIRO, P. Quantificação da Carga Proviral (DNA e RNA) do HTLV-1 pela PCR em Tempo Real e Comparação do Perfil de Citocinas entre ELISA e PCR em Tempo Real. 2007. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Na cidade de São Paulo, cerca de 50 mil pessoas são portadoras do HTLV-1. O HTLV-1 é o agente causador da paraparesia espástica tropical/mielopatia associada com o HTLV-1 (TSP/HAM) e os mecanismos desta patogênese são obscuros. A TSP/HAM é considerada uma doença imuno-mediada e algumas citocinas, podem estar associadas, com a desmielinização da membrana de mielina da coluna espinhal, provavelmente, estimuladas pela presença de antígenos virais. A PCR em tempo real é uma técnica utilizada para a detecção de citocinas e apresenta maior sensibilidade na expressão de mRNA e carga proviral do HTLV-1. Objetivos: Detecção de citocinas pelas técnicas sorológicas e de biologia molecular (PCR em tempo real) que auxiliaram no aconselhamento e avaliação de pacientes infectados pelo HTLV-1, além de uma avaliação da carga proviral dos pacientes com infecção pelo HTLV-1. Casuística: Grupo I: indivíduos soronegativos para HCV, HIV-1 e HTLV-1 (Controle); Grupo II: pacientes HTLV-1 assintomáticos; Grupo III: pacientes com TSP/HAM. Observamos que o INF-gama apresenta-se alterado na infecção HTLV-1, sendo um dos fatores mais importantes da evolução para TSP/HAM, ambos os ensaios apresentaram o mesmo resultado. A carga proviral pode ser um marcador de progressão para a TSP/HAM. A interação complexa existente entre o HTLV-1 e as células responsáveis pela liberação de citocinas e beta-quimiocinas pró-inflamatórias, assim como elementos de ativação celular, resultam na ativação imunológica. Isto, lentamente, pode levar ao processo inflamatório crônico que atua diretamente no micro ambiente neuronal e/ou membrana de mielina da coluna espinhal, em alguns portadores de HTLV-1. Com a persistente ativação do sistema imunológico, este processo provocará destruição das células gliais e dos neurônios, dando início ao processo de desmielinização.

Palavras Chave: Citocinas. Quimiocina. mRNA. carga proviral. HTLV-1. TSP/HAM. PCR real time

MONTANHEIRO, P. Human T lymphotropic vírus type 1 (HTLV-1) DNA proviral load quantification and immunological markers among healthy carriers and HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (TSP/HAM) patients. Doctorate (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

The HTLV-1 virus is the agent which causes the Tropical Spastic Paraparesis/HTLV-1 associated Myelopathy (TSP/HAM) and the mechanisms of this pathogenesis are still unclear. The TSP/HAM is considered to be an Immuno-mediated disease and some cytokines may be associated with the spine cord neural cells demyelination, probably, stimulated by the presence of some viral antigens. The Real time PCR is a method used to cytokines detection and shows a higher sensitivity in the mRNA and proviral load expression of this virus. Objectives: cytokines detection through serological and molecular biology techniques that helped in the advising and evaluation of HTLV-1 infected patients. casuistics: Group I: seronegative individuals for HCV, HIV-1 and HTLV-1 (control); group II: asymptomatic HTLV-1 patients; Group III: TSP/HAM patients. we have observed INF-gamma has different levels in HTLV-1 infection, being one of the most important factors to the TSP/HAM evolution, both essays showed the same result. The proviral load could be an important marker to the TSP/HAM progression. The complex interaction present between HTLV-1 and the responsible cells for cytokines and proinflammatory beta-chemokines releasing, as well as the cell activation elements, result on the immunological activation. This, through an ongoing and slowly way, may lead to a chronic inflammatory process which acts straightly at the neural micro environment and/or the spine cord myelin membrane, in some HTLV-1 carriers. With the persistent activation of the Immune system, this process will provoke neuronal and glial damage, starting the demyelination process.

key words: cytokines, chemokines, mRNA, proviral load, HTLV-1, TSP/HAM, real time PCR.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As retrovirose são importantes causas de morbidade e mortalidade humana, tornando-se pandemias nas últimas duas décadas. Entre essas retrovirose, o vírus linfotrópico de células T humana do tipo 1 (HTLV-1) e tipo 2 (HTLV-2) pode apresentar um caráter de persistência viral e existir, no hospedeiro, na forma silenciosa, durante várias décadas.

O HTLV apresenta características micro e macro epidemiológico. Calcula-se que 10 a 20 milhões de pessoas estejam contaminados no mundo (EDLICH et al., 2000), e o Brasil apresenta cerca de dois milhões de pessoas infectadas pelo HTLV-1, correspondendo em até 2% de infectados em banco de sangue em algumas regiões do país (PROETTI et al., 2002)

Na história natural nos indivíduos portadores do HTLV-1, o desenvolvimento da doença pode iniciar após, aproximadamente, 30 a 40 anos de infecção, em cerca de 5% dos portadores, levando às doenças crônicas e progressivas, como a paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1 (TSP/HAM) e a leucemia de células T do adulto (ATL) (POIESZ et al., 1980; HINUMA et al., 1981; BLATTNER et al., 1982; YOSHIDA et al., 1984).

Os fatores que contribuem no desenvolvimento das patogêneses envolvem a interação vírus/hospedeiro, especificamente sistema imunológico. Porém, os eventos imunológicos promovidos pelo HTLV-1 não estão bem esclarecidos, acreditam que a resposta celular desencadeada pelas células T CD8⁺ seja crucial para a progressão da doença. Fatores imunes e virais como: produção de citocinas e quimiocinas, citotoxicidade, reações cruzadas, carga viral e fatores genéticos (HLA A2*) são discutidos como iniciadores da patogênese TSP/HAM (OSAME, 2002; OLINDO et al., 2005). Várias hipóteses são sugeridas para explicar qual o papel da resposta imune, da carga viral e da carga genética no processo imunopatológico da TSP/HAM.

As células T CD4⁺ também são importantes no processo da patogênese. As citocinas e quimiocinas são potentes proteínas envolvidas em

processos inflamatórios, recrutamento de células e destruição tecidual. Com base nas hipóteses sobre o desenvolvimento da TSP/HAM, as células T CD4⁺ e CD8⁺ migrariam para o interior do sistema nervoso central (SNC), onde a interação promoveria a produção de citocinas e quimiocinas, provocando a inflamação e a constante destruição de uma região específica do SNC.

A carga proviral do HTLV-1 pode ser considerada um marcador de progressão para a TSP/HAM. Sabe-se que os indivíduos TSP/HAM apresentam carga proviral superior ao portador (MONTANHEIRO et al., 2005), porém observa-se que na maioria desses pacientes, após um tempo de doença, permanecem indetectável.

Para entender a resposta imune na infecção HTLV-1 e na patogênese da TSP/HAM, o presente estudo avaliou a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-2, IL-4, IL-10, IL-12 p70, TNF- α e INF- γ), β -quimiocinas (MIP-1 α , MIP-1 β e RANTES) e a quantificação da carga proviral do vírus, em pacientes infectados com HTLV-1 e com TSP/HAM.

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 HISTÓRICO

Em meados dos anos 70, no Japão, foram descritos alguns casos de leucemia de células T humanas (ATL) em indivíduos supostamente infectados por um retrovírus (TAKATSUMI et al., 1976; UCHIYAMA, 1977). Em 1980, o vírus linfotrópico de células T humana do tipo 1 (HTLV-1) foi caracterizado como o primeiro retrovírus humano (POIESZ et al., 1980). Hinuma et al, (1981) isolaram o HTLV a partir de linhagem celular contínua de linfócitos T periféricos e das células do linfonodo de um paciente portador do linfoma cutâneo de célula T. Posteriormente, o vírus foi associado a doenças neurológicas como a paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV (TSP/HAM). Subseqüentemente, testes soro-epidemiológicos e moleculares comprovaram que a ATL apresentava correlação com o HTLV-1 (POIESZ et al., 1980; HINUMA et al., 1981; BLATTNER et al., 1982; YOSHIDA et al., 1984).

O HTLV-1 pertence à família *Retroviridae*, subfamília *Oncovirinae* que é caracterizada por possuir duas fitas simples de RNA (COFFIN, 1996; CANN e CHEN, 1996), transcriptase reversa (enzima capaz de transcrever RNA em DNA viral) e inserção no genoma do hospedeiro, constituindo o provírus (TEICH, 1982).

Novos tipos de HTLV (HTLV-3 e HTLV-4) foram isolados recentemente em populações do sul de Camarões que apresentam contato com primatas não humanos (WOLFE et al., 2005; CALATTINI et al., 2005). O HTLV-3 apresenta origem recente a partir do vírus linfotrópico de células T em símios tipo 3 (STLV). O HTLV-4 não foi identificado como equivalente ao STLV, sendo distinto, filogeneticamente, dos HTLVs conhecidos. Não há relatos que os HTLV-3 e 4 podem ser transmitidos entre seres humanos e se são capazes de desencadear doenças em seus portadores (WOLFE et al., 2005).

Os HTLV-1 e 2 compartilham entre si cerca de 65% de homologia em suas seqüências de nucleotídeos (SODROSKI, 1992), dependendo da região analisada, o que determina a codificação e a síntese de diversos produtos gênicos semelhantes. A variabilidade genética observada entre essas linhagens tem levado à descrição de subtipos e a construção de árvores filogenéticas que representam relações evolutivas entre eles (CANN e CHEN, 1996). Este fato justifica a alta taxa de reações cruzadas, observadas com soros de pacientes infectados por um tipo de vírus linfotrópico de células T humanas, quando colocados a reagir com extratos virais de outro tipo viral (SODROSKI, 1992).

O HTLV-1 é classificado em quatro subtipos (A-D). O subtipo A, cosmopolita, é o mais disseminado e encontrado em muitas populações e áreas geográficas e compreende quatro grupos moleculares, o japonês, o transcontinental, o da África do Norte e do Leste (VIDAL et al., 1994; HEMOMIMAS., 2006). Parece que não existe relação entre o subtipo viral e a doença causada pelo vírus, sendo a variabilidade genômica do HTLV-1 é muito mais dependente da sua origem geográfica (CASSEB et al., 2006).

2.2 CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DO HTLV

2.2.1 ESTRUTURA DA PARTÍCULA VIRAL

O HTLV apresenta uma construção complexa, consistindo de um envelope, um nucleóide e um nucleocapsídeo e, é constituído de partículas virais esféricas a pleomórficas (vírions), cujo tamanho é de, aproximadamente, 80 a 100 nanômetros de diâmetro (Figura 1). Sua organização genômica é composta por um *core* central eletrodense, que contém duas cópias de ácido ribonucléico (RNA) de fita única com 8,8 e 9 quilobases de tamanho, com enzima transcriptase reversa (RT). O envelope é composto de uma proteína de superfície extracelular e uma

proteína transmembrana que atravessa esta estrutura e ancora na proteína de superfície (glicoproteínas). Junto com a membrana do envelope, existe uma matriz protéica. A proteína Gag está adicionada de um ácido graxo. O capsídeo, de simetria icosaédrica, é composto pelas proteínas codificadoras do gene *gag* e constitui o cerne da partícula viral (FRANCHINI, 1995, WYCUFF, 2001) (Figura 2). Pode-se observar que a glicoproteína viral externa (gp 46), projeta-se na superfície viral sob a forma de 72 espículas, que se ancoram nas demais estruturas virais por meio da glicoproteína transmembrânica (gp 21) (SCHUPBACH, 1989).

Caracteristicamente, como todos os retrovírus do tipo C, as partículas virais de HTLV-1 e HTLV-2 podem ser visibilizadas pela ultramicroscopia, sendo liberadas através de fenômenos de brotamento junto à membrana plasmática da célula infectada (Figura 1). Ao contrário da infecção pelo HIV-1, não são detectadas com facilidade partículas virais, livres, de HTLV-1/2 no sangue ou em outros fluídos biológicos de indivíduos infectados, acreditando-se, assim, que as partículas virais sejam, exclusivamente, associadas aos linfócitos infectados.

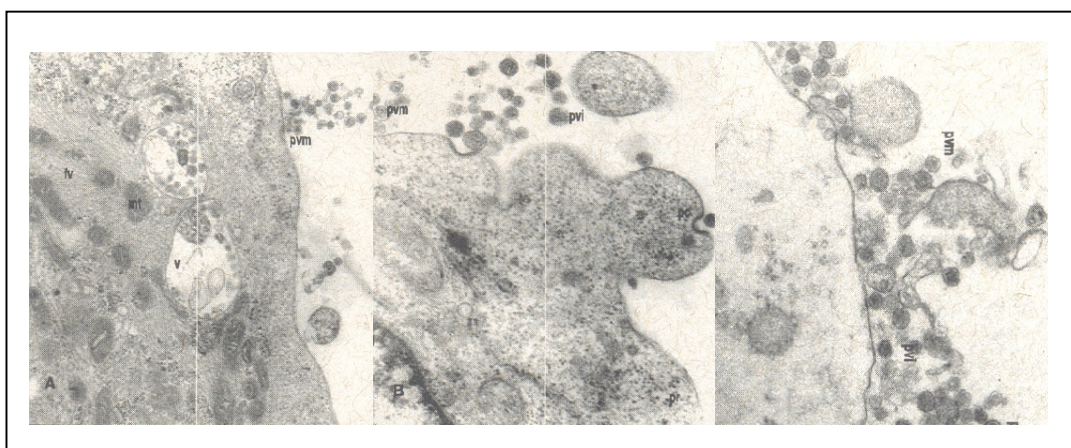


Figura 1. Estrutura das partículas virais infectando um linfócito T (*Microfotografia de autoria de Olga Pfeilsticker, ICB, UFMG*).

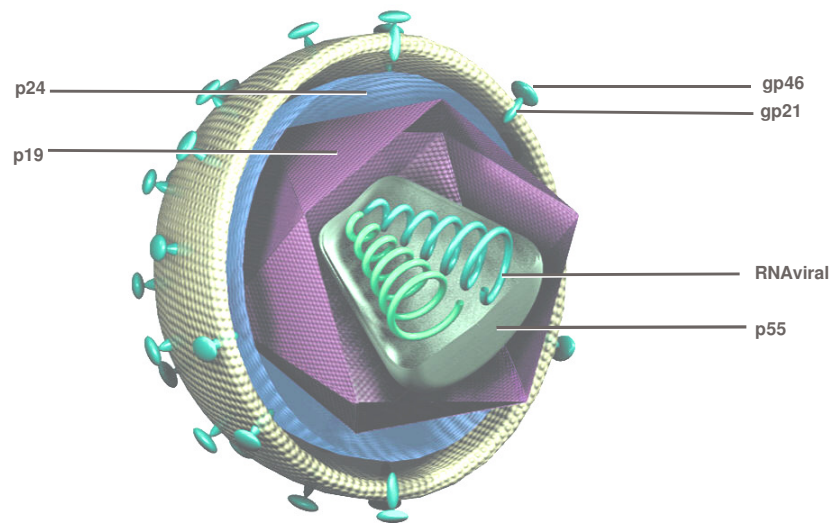


Figura 2 – Estrutura da partícula viral do HTLV. Onde: p19 = proteína 19; p24 = proteína 24; gp46 = glicoproteína 46; gp21 = glicoproteína 21 e p55 = proteína 55.

2.2.2 GENOMA DO HTLV

O provírus do HTLV-1 revela que o mesmo é constituído por 9032 nucleotídeos (SEIKI et al., 1983), tendo, nas porções finais, uma região chamada de longa repetição (LTR), cujas seqüências são fundamentais na integração do DNA proviral no DNA cromossômico do hospedeiro e também para sua regulação transcripcional do genoma do HTLV (Figura 3) (CANN E CHEN, 1996). Possui os genes gag, pol e env, uma seqüência próxima à extremidade 3' conhecida como região pX. Esta região pX apresenta os genes reguladores *tax* e *rex*, e estes contêm uma seqüência de 1585 nucleotídeos (GREENE et al., 1986).

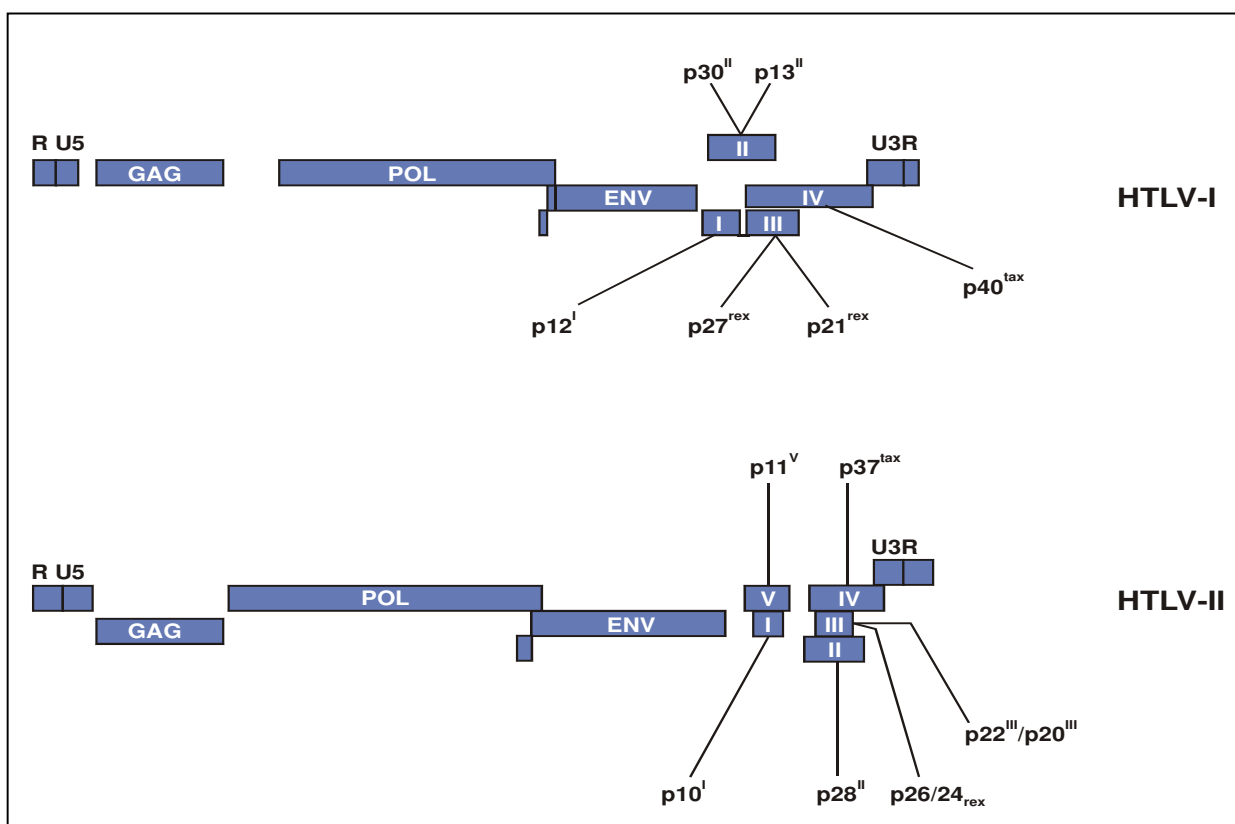


Figura 3 – Esquemática do genoma do HTLV-1 e HTLV-2.

As estruturas do envelope, do core e da transcriptase reversa do HTLV-1 são codificadas por genes denominados *env*, *gag* e *pol*, respectivamente. A região *gag* compreende os nucleotídeos 802 a 2019 do genoma viral. Esta região, quando codificada, dá origem à proteína da matriz de 19 kDa (p19), à proteína do capsídeo de 24 kDa (p24) e à proteína do nucleocapsídeo de 15 kDa (p15).

A região LTR se apresenta como duas regiões idênticas localizadas nas extremidades 5' e 3' do genoma proviral e contém seqüências regulatórias que atuam na integração e expressão proviral.

O gene *gag* está localizado entre os nucleotídeos 802 a 2019 do genoma HTLV-1. Esta região é inicialmente traduzida como precursor poliprotéico e a sua

clivagem origina as proteínas Gag maduras: a proteína da matriz de 19 kDa (p19), a proteína do capsídeo de 24 kDa (p24) e a proteína do nucleocapsídeo de 15 kDa (p15). Essas proteínas são rearranjadas para formar os componentes principais da estrutura do vírus maduro. A p24 tem alta similaridade, quanto à seqüência de aminoácidos do HTLV-1 e HTLV-2, o que resulta em considerável reatividade cruzada nos testes sorológicos. A p19 possui baixa similaridade na seqüência de aminoácidos, resultando em pouca reatividade cruzada entre os dois vírus (NAN et al., 1988).

O gene *pol*, localizado na posição 3' do gene *gag*, entre os nucleotídeos 2497 a 5187, codifica uma proteína de 296 nucleotídeos, a transcriptase reversa, fundamental para a transcrição do RNA viral em DNA e sua incorporação no genoma da célula hospedeira, além de codificar a RNase, a endonuclease e a protease. A protease é codificada por nucleotídeos localizados na parte 3' da região *gag* e na parte 5' da região *pol*. Assim, a síntese da protease é feita como parte do precursor poliprotéico *gag*, acompanhado por desvio de leitura ribossomal. A protease é responsável pelo processamento dos produtos *gag* e pela sua própria clivagem, para gerar a molécula de protease madura.

A p12 é uma proteína de 12 kDa, codificada pelo gene ORF I (Open Region Frame) do genoma do HTLV-1. Ela pode interagir com as cadeias β e γ do receptor para IL-2 (IL-2R) e é possível que esta ligação altere a sinalização deste receptor, ocasionando alterações na via de sinalização por IL-2R, sem a necessidade da presença desta citocina no meio extracelular. De fato, a contínua ativação da via de sinalização por IL-2R está correlacionada com a independência de IL-2 das células T, transformadas pelo HTLV-1 em cultura "in vitro" (FRANCHINI, 1995; JOHNSON et al., 2001).

A Tax e a Rex são proteínas com funções regulatórias do genoma viral, sendo que ambas são codificadas pela região pX do HTLV-1. O gene *rex*, responsável pela codificação da proteína p27^{rex} (que é reguladora pós-transcricional da síntese de proteínas estruturais do vírus e de outra proteína), não apresenta definida sua função principal (RIMSKY et al., 1988). A proteína *rex*, do HTLV-1, poder exercer as funções da proteína *rev* no HIV-1, até mesmo

substituindo-a. Porém, a rev do HIV-1 não consegue substituir a rex no sistema HTLV-1, dados estes que não foram detalhados (GREENNE et al., 1990; JOHNSON et al., 2001).

A Tax é uma fosfoproteína nuclear de 40 kDa com 353 resíduos de aminoácido, localizada entre a região U3 e a LTR (BEIMLING e MOELLING, 1992; PACA-UCCARALERTKUN et al., 1994) e regula, indiretamente, a transcrição do genoma proviral, ao interagir com fatores de transcrição celular e induz sua ligação a sítios específicos na LTR do HTLV-1, ativando sua transcrição. Ao interagir com proteínas regulatórias celulares, a Tax pode induzir, a expressão de genes celulares (FRANCHINI, 1995; FERREIRA et al., 1997). O gene *tax* codifica a proteína p40^{tax}, transativadora da região U3 do segmento LTR do genoma viral e também de genes da célula eucariótica infectada, tais como os que codificam a cadeia α do receptor da IL-2 (CD₂₅), a própria IL-2, a IL-1, a IL-3, a IL-6, a TGF- β , fator de crescimento de granulócitos (GM-CSF), a *c-fos*, a *c-sis*, a *c-myc*, a proteína relacionada ao paratormônio, entre outros (GREENE et al., 1986; BALLARD et al., 1988; GREENE et al., 1989).

A atividade transativadora de genes celulares, da proteína p40^{tax}, dá-se por vias intracelulares que envolvem fatores de transcrição como NF-kB e SRF (LANOIX et al., 1994; SUZUKI et al., 1993). O único gene, até então descrito como tendo a sua transcrição inibida pela Tax é o gene que codifica a cadeia da polimerase β , uma enzima envolvida no reparo do DNA (FRANCHINI, 1995; FERREIRA et al., 1997; JOHNSON et al., 2001). A Tax favorece a sinapse neurológica de célula a célula, e sua expressão proporciona um sinal intracelular sinérgico com a ICAM-1 causando polarização dos microtúbulos das células T, demonstrando que não está presente apenas no núcleo da célula infectada (NEJMEDDINE et al., 2005).

Recentemente, observaram similaridade nas variações das seqüências dos genes *rex* e *tax*, onde as variações de aminoácidos do gene *rex* são maiores que do gene *tax*. Há uma coincidência nas regiões da *tax* e *rex*, sendo o segundo códon da *Rex* corresponde ao terceiro códon da *Tax*. Isso leva a supor que a proteína *Rex* pode resistir a maiores mudanças de aminoácidos que a proteína

Tax, demonstrando que a proteína Tax apresenta uma estabilidade evolutiva e é mais conservada que a proteína Rex (McGIRR e BUEHURING, 2006).

O gene *env*, localizado na região 5180 a 6647, é responsável pela codificação das glicoproteínas externas do envelope (a precursora gp61/68 e sua derivada gp46) e da proteína transmembrana (gp21) (HALL et al., 1994). O *env* contém uma seqüência de nucleotídeos que é clivada no início do processo de maturação viral. Um domínio amino terminal corresponde a uma glicoproteína externa gp21, que é clivada na região carboxi-terminal, resultando em uma proteína transmembrana com 21 KDa e outra externa de 46 KDa.

As gp46 e gp21 têm importante papel na entrada do vírus HTLV na célula alvo e também na indução da produção de anticorpos neutralizantes contra este vírus. A LTR do HTLV-1 apresenta 754 nucleotídeos, responsáveis pelos sinais iniciais e terminais da transcrição, assim como pela integração do genoma retroviral ao DNA da célula hospedeira. As seqüências que, imediatamente, flanqueiam o LTR têm importante papel, no início da síntese do DNA proviral, a partir do RNA genômico (HASELTINE et al., 1985).

2.3 CICLO DE REPLICAÇÃO VIRAL

O HTLV-1 entra em contato com as células do sistema imune, preferencialmente, os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ (eventualmente monócitos). O receptor de membrana celular GLUT1, um transportador de glicose, inicia o ciclo de replicação viral (TAKENOUCI et al., 2007; OVERBAUGH, 2004; MANEL et al., 2004; MANEL, 2003; POEISZ, 2002). Após, ocorre à fusão da membrana do HTLV-1 com a proteína transmembrânica, e o cerne viral é introduzido no citoplasma da célula infectada. A transcrição do genoma viral de RNA para DNA ocorre pela enzima transcriptase reversa e o genoma viral é inserido no núcleo da

célula hospedeira (Figura 4). Este processo marca o início da fase tardia onde são sintetizadas proteínas virais.

Após a ligação com a célula alvo, ocorre a exposição do core viral, com a transcrição do genoma viral RNA em DNA, pela transcriptase reversa (RT). Quando a transcrição do DNA está completa, o core se rompe, permitindo a entrada do DNA viral no núcleo celular e sua integração ao DNA genômico humano.

O genoma viral integrado passa a ser denominado DNA proviral e foi passivo de replicação quando a célula sofrer mitose. A partir deste momento, começa a síntese do RNA viral pelos mecanismos de reprodução celular, tendo como molde o provírus integrado. Os RNAs transcritos são processados em mRNAs e no genoma viral.

Com este processo, as proteínas virais são sintetizadas e ocorre o início da montagem e brotamento dos vírions, levando parte da membrana celular para a formação de seus envelopes virais, compostos por duas camadas de lipídeos e uma de proteína.

Outro modo de transmissão ocorre pelo contato célula a célula, a partir de outras células infectadas (IGAKURA et al., 2003) (Figura 5). A proteína viral Tax favorece uma reprogramação na célula infectada, promovendo a expressão de proteínas de adesão celular e produção de moduladores imunes na célula infectada para a não infectada. Depois do encontro da molécula de adesão, as proteínas virais são transportadas por microtubos, e partículas do core viral, infecta a nova célula, passando a ser hospedeira do HTLV-1 (DERSE & HEIDECKER, 2003). Após a integração, a replicação pode ocorrer por mitose, havendo possibilidade de um erro em 10^9 cópias virais (NIEWIESK & BANGHAM, 1996).

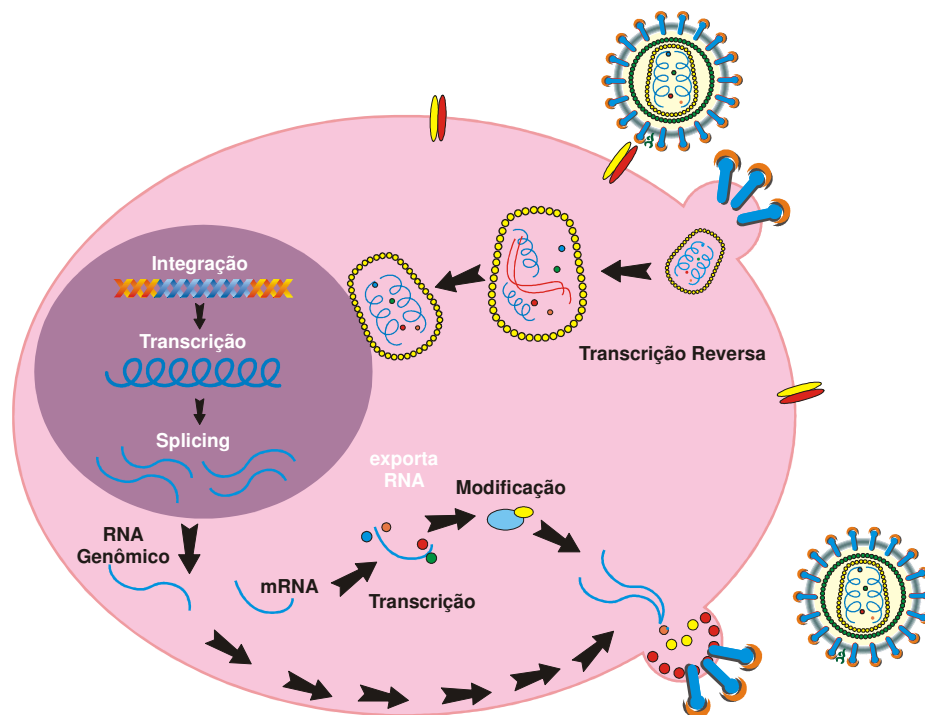


Figura 4. Esquemática da replicação do HTLV-1.

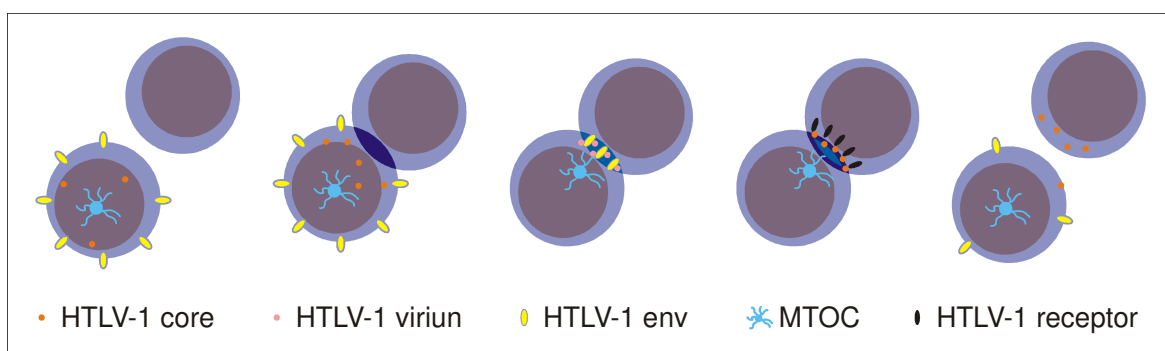


Figura 5. Esquemática do modo de replicação do HTLV-1, por célula a célula.

2.4 DOENÇA RELACIONADA AO HTLV-1

A TSP/HAM é definida como uma doença que provoca a desmielinização crônica progressiva na medula espinhal, usualmente de início insidioso, que acomete de 1 a 2% dos portadores de HTLV-1. Está associada a um grau variável de disfunções esfinterianas e sensitivas, que afeta mais mulheres do que homens, geralmente na quarta e na quinta década de vida (GESSAIN et al., 1985; OSAME et al., 1986). Estima-se que 10 (exatamente 0,96%) de 1000 pacientes podem desenvolver TSP/HAM, após décadas de infecção e com idade de, aproximadamente, 43 anos de idade (KAPLAN et al., 1990; OSAME et al., 1990; UCHIYAMA, 1997).

Em 1985 foi constatada a presença de anticorpos IgG contra o vírus HTLV-1 no soro de 65% dos pacientes com quadro de mielopatia na Martinica. Esse quadro neurológico foi denominado de paraparesia espástica tropical (TSP), sugerindo, que o HTLV-1 poderia ser o agente causador desta síndrome (GESSAIN et al., 1985). No mesmo ano, estes achados foram confirmados em pacientes na Jamaica e da Colômbia (RODGERS et al., 1985). Em 1986, Osame et al. (1986) relataram doença semelhante no sul do Japão, classificando como mielopatia associada ao HTLV-1 (HAM) (OSAME et al., 1986). Em seguida, verificou-se tratar da mesma doença (HAM e a TSP), e foi denominada de TSP/HAM (ROMÁN & OSAME, 1988).

Nas regiões tropicais e subtropicais apresenta cerca de 40% a 60% das mielopatia de origem indeterminada (GESSAIN e GOUT, 1992; OSAME et al., 1992). No Japão, o risco de desenvolver TSP/HAM nessas áreas endêmicas para ATL, é de um para cada 1000-2000 portadores do vírus, enquanto que no Caribe e na América do Sul varia de 1 a 5%. As mulheres são mais acometidas que os homens, numa relação de 2:1. No Japão, cerca de 25% dos casos tinham antecedentes de transfusão sanguínea, onde o risco de TSP/HAM, após receber

produtos celulares contaminados com HTLV-1, foi de 30% ao final de três anos (ROSENBLATT et al., 1988).

No Brasil, foram relatados casos suspeitos de TSP/HAM em Fortaleza-CE, sem a pesquisa de anticorpos anti-HTLV-1 (COSTA et al., 1989). Em São Paulo - SP, anticorpos contra HTLV-1 foram identificados em 37,5% dos pacientes atendidos com mielopatias crônicas, de origem obscura (MARTINS-CASTRO et al., 1989). Em Salvador, foi confirmado que 50% dos pacientes que com TSP/HAM apresentavam anticorpos anti-HTLV-1 (GOMES et al., 1999).

A TSP/HAM é caracterizada por paraparesia espástica nos membros inferiores, evoluindo com graus variáveis de disfunção vesical, além de distúrbios de sensações sensitivas (OSAME et al., 1990). Os principais sintomas observados são dificuldades na marcha, fraqueza e espasticidade nos membros inferiores, além de distúrbios esfinterianos (GESSAIN et al., 1985; OSAME et al., 1985).

Do ponto de vista histopatológico (Figura 6), existe o comprometimento da medula espinhal torácica, com espessamento leptomeníngeo e atrofia medular em diferentes graus. Os achados histopatológicos incluem infiltração linfocitária perivascular, desmielinização, degeneração axonal e das células gliais. A intensidade da reação inflamatória está relacionada com a duração da doença, ou seja, com o tempo da doença (GESSAIN et al., 1992; IWASAKI, 1993), e o processo de desmielinização pode ser mediado por mimetismo molecular (LEVIN et al., 2002; KALUME et al., 2004; GARCIA-VALLEJO et al., 2005).

A intensidade da reação inflamatória pode está relacionada com a duração da doença, ou seja, na fase inicial, ocorre um processo meningo-mielítico com proliferação capilar e infiltrado linfomonocitário acometendo, predominantemente, a região torácica da medula espinhal. Progressivamente, ocorre uma degeneração da substância branca, particularmente, do trato córtico-espinhal lateral, com pouco envolvimento da substância cinzenta (Iwasaki et al. 1993).

Segundo Iwasaki et al. (1993) e Yoshioka et al. (1993), os casos mais avançados da patogênese ocorreram em indivíduos com longo tempo de TSP/HAM (longa duração) e observaram que o processo de degeneração acaba

predominando sobre a inflamação. Relatos definem que há persistência de atividade inflamatória após longos períodos (CASTRO-COSTA et al., 2002; IWASAKI et al., 2004).

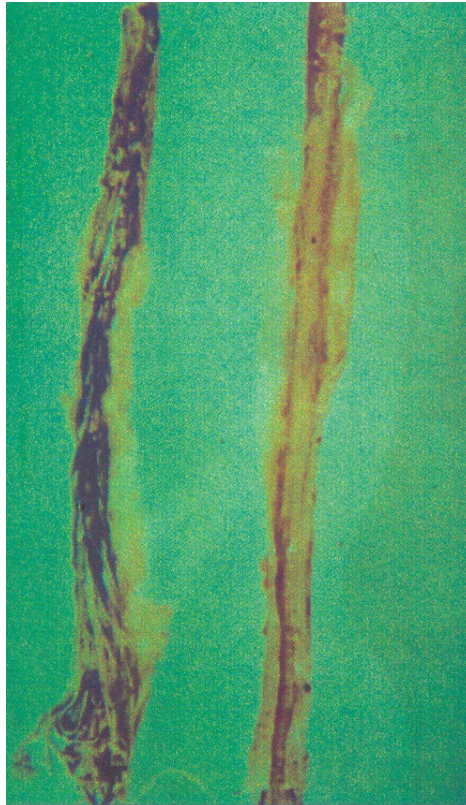


Figura 6. Desmielinização medular pelo vírus HTLV-1: indivíduo saudável (esquerda) e um paciente com TSP/HAM (direita).

As células T e monócitos são encontrados em alta porcentagem nesta região, acredita-se que a migração celular é devido à produção de diversas citocinas e quimiocinas pro-inflamatórias, mas não foi encontrada evidência de malignidade nas células migratórias (MURPHY et al., 1988; PICCARDO et al., 1988; WU et al., 1993; LEVIN e JACOBSON, 1997). Porém, as células

inflamatórias podem envolver a parede vascular acarretando vasculite e gliose perivascular (AKIZUKI et al., 2001; ROSENBLUM et al., 1992).

O predomínio de anormalidades na coluna lombar da medula torácica pode ser explicado pelo processo hemodinâmico do fluxo sanguíneo desta região (JOHNSON, 1998). No encéfalo de pessoas com TSP/HAM, observam-se áreas de inflamação perivascular na substância branca central e, menos comum, no cérebro e no tronco encefálico (ELLISON et al., 1998). Aye et al. (2000), sugeriram que as alterações inflamatórias se estendem em todo o sistema nervoso central.

Apesar da TSP/HAM ser uma doença de baixa letalidade, a possibilidade de levar à incapacidade permanente, a torna um sério problema de saúde pública. Outras características neurológicas encontradas na TSP/HAM são: contrações e fraqueza dos membros inferiores, distúrbios urinários e perturbações sensoriais torácicas (GESSAIN et al., 1985; OSAME et al., 1985).

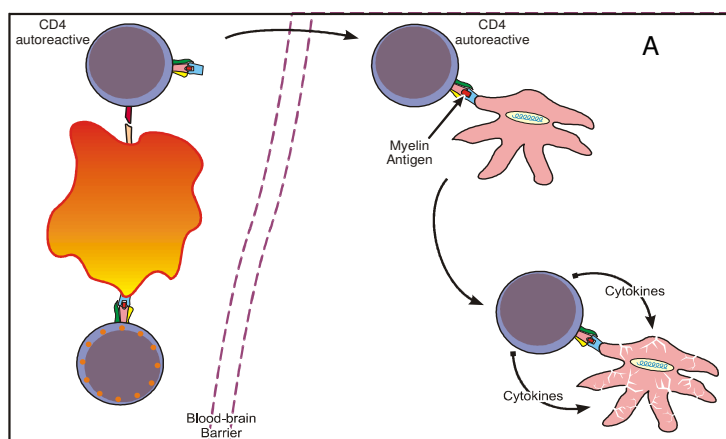
Nos aspectos clínicos várias estratégias terapêuticas estão sendo utilizadas, como o uso de corticóides, antivirais, INFs etc, porém, sem nenhuma melhora imunológica. O uso de corticóides no tratamento da TSP/HAM tem sido utilizado desde a descoberta da doença. Os corticóides reduzem a celularidade líquórica e diminuir a quantidade de vírus no sistema nervoso central (SNC) (MONTANHEIRO et al., 2005; LEZIN et al., 2005). O INF- α atua na ação antiviral e imunomoduladora da droga, podendo inibir a produção de citocinas inflamatórias (NAKAGAWA et al., 1996; FENG et al., 2003; IZUMO et al., 1996). Os antivirais têm sido aplicados na infecção pelo HTLV, sendo que os inibidores de nucleosídeos da transcriptase reversa foram os primeiros a serem estudados. A zidovudina e lamivudina, mostraram pequenos benefícios na sintomatologia e carga viral (TAYLOR et al., 2006), porém com efeitos colaterais. Todas as estratégias de tratamento, a diversidade dos métodos de avaliação, dos centros de estudos, não permitem uma conclusão precisa sobre o tratamento da TSP/HAM.

Vários fatores influenciam no desenvolvimento da patogênese. Entre eles encontramos os riscos relacionados a carga proviral (MONTANHEIRO et al., 2005; OLINDO et al., 2005, NAGAI et al., 1998), a proteção vinda de certos alelos HLA (DRB1*0101 versus HLA-A*02 e HLA-CW*08) e subgrupos da Tax HTLV-1

(SABOURI et al., 2005). Osame (2002), considera que fatores celulares e hormonais podem estar envolvidos na patogênese da TSP/HAM (OSAME, 2002). Além disso, polimorfismo no gene do receptor de vitamina D pode estar associado com o desenvolvimento da TSP/HAM (SAITO et al., 2005), enquanto que o polimorfismo no promotor da interleucina-10 afeta a carga proviral e o risco de desenvolver a patogênese (SABOURI et al., 2004).

Vine et al. (2002) estudando a população do Sul do Japão, verificaram que 58 sítios de polimorfismo em 39 HLA e identificaram três fatores genéticos que desenvolvem e influenciam o risco da TSP/HAM. O promotor do alelo 863 HLA desenvolvem a TSP/HAM, SDF + alelo 801 A3'UTR e IL-15 alelo 191 C protegem contra a TSP/HAM

Porém, o risco do desenvolvimento da TSP/HAM está envolvido com três hipóteses imunológicas que levam a desregulação do sistema imunológico, provocando uma constante inflamação: a citotoxicidade direta, auto-imunidade e dano celular circundante (Figura 7) (TAYLOR et al., 1998; OSAME et al., 1999; NAGAI et al., 2000; JACOBSON, 2002; OSAME et al., 2002; LEVIN et al., 2002).



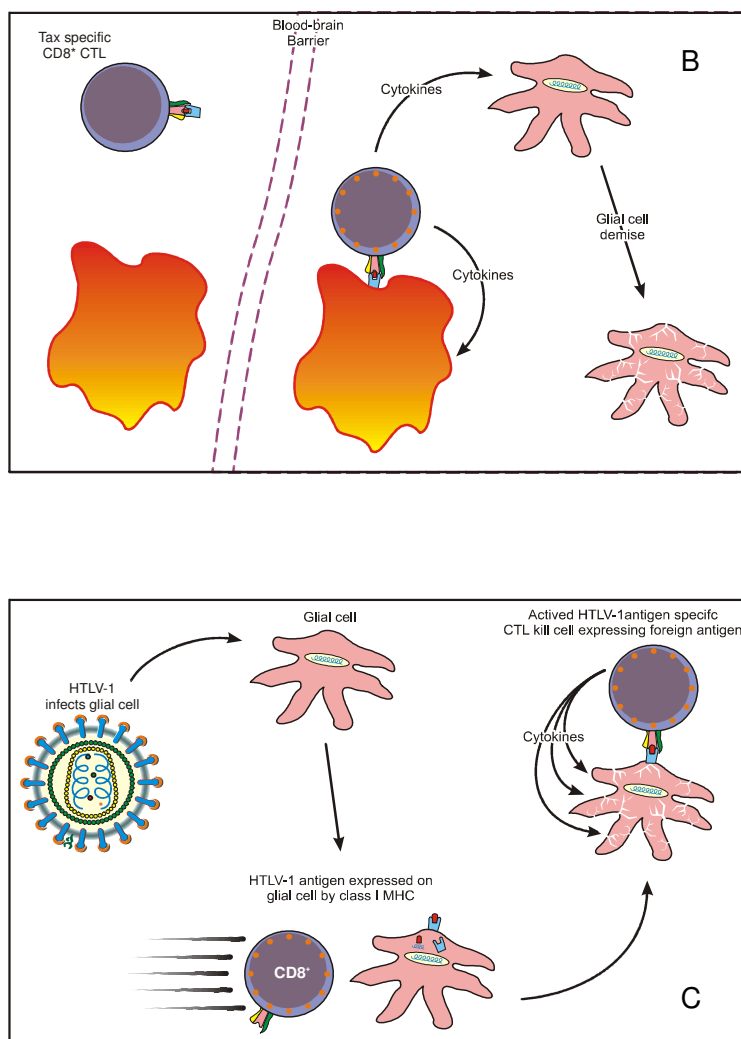


Figura 7 – Hipóteses imunológicas para o desenvolvimento da TSP/HAM. Sendo: A) auto imune – contra antígenos de células gliais; B) citotoxicidade colateral – citocinas sobre as células gliais; e C) citotoxicidade direta – células gliais infectadas pelo HTLV-1 (Taylor et al.,1998).

Na teoria da citotoxicidade direta, as células gliais infectadas pelo HTLV-1 expressariam antígenos virais de superfície e células T citotóxica CD8⁺ específicas cruzariam a barreira hematoencefálica e destruiriam as células gliais infectadas, através da atividade citotóxica direta ou por liberação de citocinas (IJICHI e OSAME, 1995; IJICHI et al., 1996; LEVIN e JACOBSON, 1997; JOHNSON, 1998; NAKAMURA, 2000; FURUKAWA et al., 2003). Além disso, linfócitos CD4⁺ infectados pelo HTLV-1 parecem resistir à apoptose, o que contribui para a

cronicidade do processo inflamatório (HAMASAKI et al., 2001). Numa variante da teoria citotóxica, a resposta inflamatória seria dirigida contra células nervosas infectadas pelo HTLV-1, em que existiria uma linhagem neurotrópica do vírus. Entretanto, parece não haver diferenças significantes entre o vírus recuperado de pacientes com ATL e TSP/HAM (GREENBERG et al., 1989, XU et al., 1996, WATANABE, 1997; WATANABE et al., 2004).

A teoria da auto-imunidade, um antígeno do hospedeiro seria confundido com algum antígeno do HTLV-1 acarretando no processo inflamatório auto-imune com lesão neural. Recentemente, foi identificada a proteína neuronal hnRNP-A1 que apresenta reação cruzada com a proteína viral Tax, configurando processo de mimetismo molecular. A teoria imunomediada pode justificar a associação de manifestações auto-ímmunes sistêmicas nos pacientes com TSP/HAM (RODGERS-JOHNSON et al., 1990; GESSAIN e GOUT, 1992; MELO et al., 1994; FURUYA et al., 1998; LEE et al., 2005; MOSLEY et al., 2005).

A terceira teoria, do dano circundante, envolve linfócitos T CD4⁺ infectados e linfócitos T citotóxicos CD8⁺ específicos anti-Tax que migrariam para o interior do SNC, onde a interação promoveria a produção de citocinas, inflamação e a destruição tecidual (HÖLLSBERG e HAFLER, 1995, NAGAI & OSAME, 2002; OSAME, 2002; ARAÚJO et al., 2005; SILVA, 2006; KUBOTA et al., 2003; GOON et al., 2003; NAGAI e OSAME, 2003; SAKAI et al., 2001; URETA-VIDAL, 2001) (Figura 8).

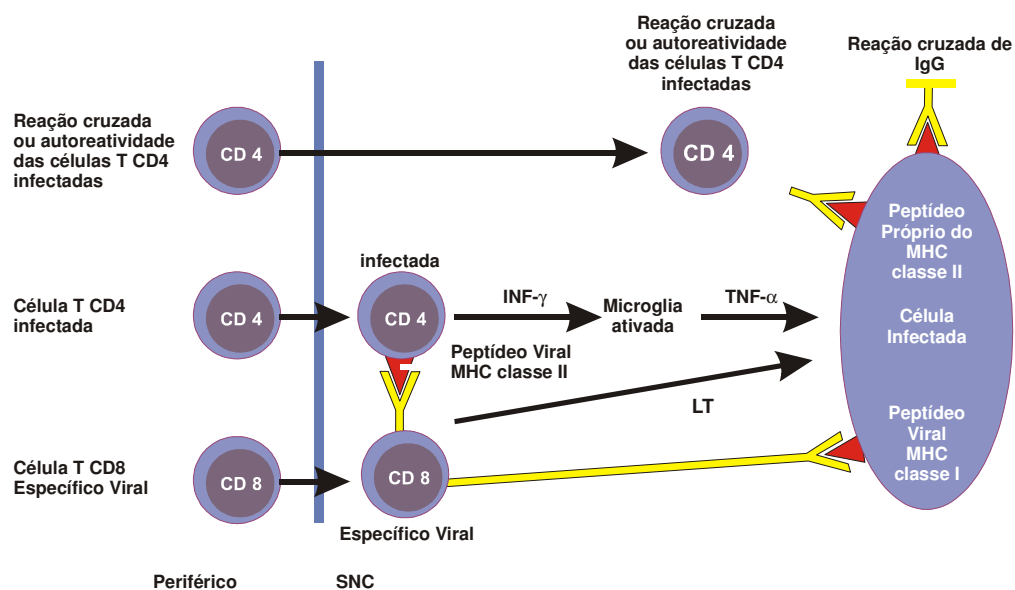


Figura 8 – Resumo das teorias sobre o surgimento da TSP/HAM.

2.5 RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA INFECÇÃO HTLV-1

Algumas citocinas liberadas em resposta à infecção viral pertencem à família de proteínas intimamente relacionadas, denominadas quimiocinas. As quimiocinas são uma família das citocinas, estruturalmente homólogas, que regulam a migração e estimulam o movimento dos leucócitos do sangue para os tecidos. Elas são polipeptídeo de 8 a 12 kD contendo duas alças dissulfeto internas e foram identificados, cerca de 50 quimiocinas diferentes. Existem quatro famílias de quimiocinas que se diferem pelos resíduos de cisteína (CC, CXC, C e Cx3C) (YOSHIE, 2006).

As duas principais famílias são: CC que apresenta resíduos de cisteínas adjacentes e a CXC com seus resíduos separados por um aminoácido (BACON et al., 2002). As quimiocinas envolvidas em reações inflamatórias são produzidas por

leucócitos em resposta a estímulos externos, e as quimiocinas que regulam o tráfego celular através dos tecidos são produzidas constitutivamente por várias células nesses tecidos.

Estas são sintetizadas por fagócitos e outros tipos celulares, como linfócitos T CD8⁺ e macrófagos. As quimiocinas estão relacionadas tendo por base sua seqüência de aminoácidos (70 a 130 aminoácidos), atuando como agentes químicos para as células fagocitárias, recrutando monócitos, neutrófilos e outras células efetoras do sangue periférico para os locais de infecção. Alguns tipos de quimiocinas também funcionam no desenvolvimento dos linfócitos, na migração e no crescimento de novos vasos sanguíneos (AHMED e BIRON, 1999).

As células que apresentam infecção pelo vírus HTLV-1 conseguem ser imortais e expressar, em seus clones, o receptor de quimiocina CXCR4 (YOSHIE et al., 2002). As quimiocinas MIP-1 α , MIP-1 β (macrófagos inflamatórios que liberam a proteína inibitória) e RANTES são ligantes naturais dos receptores CCR1, CCR3, CCR5. O receptor CCR5 é usado pelo HIV-1 na infecção da célula alvo e, por este motivo, as quimiocinas competem o HIV-1 pelo mesmo sítio de ligação (AHMED e BIRON, 1999). Assim, existem vários vírus que interferem na ação das quimiocinas e as utilizam, como utilizam seus receptores, para suprir suas próprias necessidades (AHMED e BIRON, 1999).

O HIV-1 possui capacidade de induzir a produção, em grandes quantidades, de quimiocinas, como RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β e outras, que são ligantes naturais de receptores CC-quimiocinas e CCR-5 (PORTER et al., 1998). Estas proteínas inflamatórias têm capacidade antivirais e são produzidas por monócitos, células T CD8⁺ e, também, por células matadoras naturais – “Natural Killer” (NK), durante a evolução da TSP/HAM (COPELAND et al., 1996; OLIVA et al., 1998; UMEHARA et al., 1996; ROSSI e ZLOTNIK, 2000).

A infecção pelo HTLV-1 tem um caráter latente e induz a ativação de células, as quais respondem por meios de múltiplos mecanismos da resposta imune. Diante disso, vários estudos têm sido desenvolvidos para compreender os fenômenos que levam os indivíduos assintomáticos a desenvolverem alguma patologia e outros permanecem assintomáticos ao longo da vida.

Várias estratégias estão sendo investigadas, para correlacionar os mecanismos imunopatológicos e imunoprotetores, com o desenvolvimento das diferentes formas clínicas da infecção. No entanto, a natureza e os mecanismos pelos quais se manifestam ainda são desconhecidos. Alguns parâmetros como alta carga proviral (NAGAI, 2001), a constante linfoproliferação espontânea *in vitro* (SAKAI et al., 2001), aumento das células T CD8⁺ específicos e altos títulos para HTLV-1, tanto no soro quanto no fluído cerebral (GRETEN et al., 1998) parecem estar associados com a presença da TSP/HAM (AKIZUKI et al., 1987; KITZE et al., 1998) e são utilizados por muitos pesquisadores para a avaliação da evolução clínica dos pacientes infectados. A princípio, acreditava-se que células T CD4⁺ do sangue periférico representavam o alvo primário para a infecção pelo HTLV-1. Atualmente, sabe-se que outras populações celulares também são susceptíveis à infecção pelo HTLV-1.

Neste contexto, estas células proliferam espontaneamente e expressam várias citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão que poderiam favorecer a migração direcionada dos linfócitos T CD4⁺ infectados, do sangue periférico para o sistema nervoso central (SNC) (GRANT et al., 2002). No SNC, os astrócitos e as células T CD4⁺ representam as células infectadas com produtos virais em seu citoplasma bem como o DNA proviral integrado ao genoma celular analisado por meio de técnicas de hibridização ou PCR *in situ*. A expressão gênica viral dentro do SNC promove a ativação de linfócitos T e migração de monócitos, e resulta na criação de um micro-ambiente favorável à ação citotóxica de células T CD8⁺ específicas para antígenos do HTLV-1 associado às moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe I (MHC-I).

Assim, a expressão da Tax pode causar uma produção exagerada de TNF- α resultando no aumento na expressão de MHC-I, redução no influxo de glutamato, destruição de oligodendrócitos, desmielinização e conseqüentemente neurotoxicidade. Outros fatores podem estar contribuindo com a desmielinização da TSP/HAM como a expressão viral, a desregulação da expressão de citocinas, a produção de anticorpos específicos anti-HTLV-1 e infiltração de linfócitos T CD8⁺ citotóxicos (CTL) e macrófagos ativados no SNC.

Alguns autores defendem a hipótese de que células T CD8⁺ citotóxica assumem um importante papel no desenvolvimento da TSP/HAM. Essas células, além de exercerem sua função citotóxica nas células infectadas, secretam citocinas essenciais para a manutenção da resposta inflamatória (JACOBSON et al., 1990; KOENING et al., 1993). O aumento da expressão de citocinas, tais como INF- γ e TNF- α , nos compartimentos afetados durante a infecção viral, acompanhado da manutenção do processo inflamatório, pode ser um controlador importante na ativação de linfócitos T CD8⁺ auto-reativos e/ou da perda da tolerância à auto-antígenos (BILLAU et al., 1990; HORWITZ et al., 1997).

Esses possíveis mecanismos auto-imunes poderiam ser desencadeados por meio de uma reação cruzada de antígenos virais derivados da fagocitose de partículas virais, ou células apoptóticas infectadas pelo HTLV-1 ou por infecção direta das células dendríticas com conseqüente processamento e apresentação dos antígenos virais no contexto das moléculas de MHC-I. A ativação celular que ocorre no sangue periférico quanto no líquido foi avaliada por meio de marcadores de ativação celular específicos para linfócitos, monócitos e neutrófilos em pacientes com TSP/HAM e mostrou aumento nas várias populações celulares (IJICHI et al., 1989; JACOBSAN, 1988; UMEHARA et al., 1993). Estudos prévios demonstraram uma correlação entre carga de DNA proviral e a frequência de linfócitos T CD8⁺ efetores e de memória específicos anti Tax em pacientes com TSP/HAM. Esses dados sugeriram que a resposta mediada por CTLs Tax específicas estaria ligada diretamente aos níveis de carga de DNA proviral (NAGAI et al, 2001).

As células T CD8⁺ apresentam reservatório celular adicional para o HTLV-1 "*in vivo*". Além disso, através da citometria de fluxo mostrou que os linfócitos T CD8⁺ são células que, predominantemente, se expandem durante a estimulação espontânea *in vitro* (HANON et al., 2000). Estas observações sugerem que a resposta mediada pelas CTLs específicas não seria o único evento responsável pela alta carga proviral, sendo a expansão celular um fator importante na contribuição da carga proviral total presente no sangue periférico e no SNC durante a doença neurológica.

Em um modelo proposto, o evento inicial da progressão da TSP/HAM teria a participação de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1b, IL-6, INF- γ , TNF- α , e IL-15. Essas citocinas produzidas por células T, macrófagos e micróglia ativas, seriam de grande importância na desmielinização neuronal (GRANT et al., 2002). Assim, embora a maioria dos trabalhos, sugere que o estabelecimento de um padrão de resposta imune citotóxica esteja associado ao desenvolvimento da TSP/HAM, outros autores sugerem que mecanismos inerentes à imunidade humoral também podem estar na patogênese TSP/HAM (CASSEB et al., 2007; CASTRO-COSTA et al., 2006).

Deste modo, a ativação persistente de elementos da resposta imune, tais como a estimulação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, a expressão de moléculas de adesão e receptores na superfície de linfócitos e monócitos e a produção de fatores solúveis como citocinas e quimiocinas, favorecem a migração direcionada de células infectadas ou não para o Sistema Nervoso (OSAME, 1999). No tecido nervoso, as células produzem fatores que amplificam a resposta antiviral contra células infectadas presentes no SNC. Algumas células infectadas são imortalizadas, o que aumenta sua permanência no local e amplifica os mecanismos efetores da resposta imune. Esse complexo sistema de interações celulares favorece o estabelecimento de um ambiente inflamatório por uma alta produção de citocinas do tipo 1. A produção de INF- γ pelos linfócitos T CD4⁺, ativa a produção de TNF- α pelos monócitos e macrófagos, tais como micróglia, o que produz um efeito neurotóxico e, conseqüentemente, a desmielinização.

Acredita-se que a integração do genoma HTLV-1 ocorra em 3% a 15% das células mononucleares (CMN) de pacientes com TSP/HAM. Uma elevada relação associada de CD4⁺/CD8⁺, com a presença de ativação nas células de T e com alto nível de expressão do haplótipo DR foram encontradas na maioria desses pacientes. Estes dados concordam com a idéia de que a carga proviral do HTLV-1 é importante para o aparecimento dos sintomas neurológicos (GESSAIN et al., 1990; NAGAI et al., 1998; MANNS et al., 1999).

A auto-imunidade pode contribuir, diretamente, para a patogênese da TSP/HAM, junto com a carga proviral do vírus. No modelo auto-imune, a infecção

pelo HTLV-1 provocaria a ativação de células T auto-reativas, que migrariam para o SNC, com secreção de citocinas, iniciando-se o processo inflamatório, com destruição tecidual (HÖLLSBERG e HAFLER, 1995). O DNA proviral do HTLV-1 foi detectado apenas no núcleo de linfócitos que se infiltraram na medula espinhal e está ausente nos neurônios e células da glia. Isto indica que a desmielinização na TSP/HAM não é resultado da infecção viral de oligodendrócitos ou células neuronais e sim ação do sistema imunológico (HARA, 1994).

Além destas respostas ao HTLV-1, observamos a resposta de citocinas e β -quimiocinas. Estas proteínas inflamatórias revelam capacidade antiviral durante a evolução da TSP/HAM (COPELAND et al., 1996; OLIVA et al., 1998; UMEHARA et al., 1996). Estudos mostraram que pacientes com TSP/HAM apresentaram elevado número de células T CD8⁺ no sangue periférico e que clones destas células secretam INF- γ e TNF- α . Além disso, as células T CD8⁺, específicas para o HTLV-1, são importantes fontes de mediadores solúveis pró-inflamatórios, que podem contribuir significativamente para a patogênese da TSP/HAM (SHIMAMOTO et al., 1996).

Outros estudos sugerem que há aumento de IL-2 nos indivíduos HTLV-1 assintomáticos. Os pacientes TSP/HAM apresentaram aumento em TGF- β , TNF- α e INF- γ . Por outro lado, nos pacientes com ATL, estas citocinas encontravam-se em níveis baixos (MURPHY et al., 1989; TENDLER et al., 1991; UMEHARA et al., 1998; HENRY, 1995).

Além de possuir características líticas, as CTL, ou outras células mononucleares, são fontes importantes de mediadores pós-inflamatórios solúveis, que podem contribuir, significativamente, para a patogênese da TSP/HAM (HOFFMAN et al., 1992). O HTLV-1 aumenta a secreção de IL-6 em cultura de células da microglia, em humanos, mas não apresentaram estímulo para a liberação de IL-1 em monócitos ou células da microglia. Assim, TNF- α e IL-6 têm sido implicados no processo inflamatório de desmielinização e gliose, sendo proposto, que células da microglia humana e monócitos infectados e ativados pelo HTLV-1 poderiam ter um papel na patogênese da TSP/HAM (NAGAI et al., 1995).

A ativação dos CTL e das células infectadas pelo HTLV-1 proporcionam uma migração para o SNC e infectam células neurais. Algumas células CD8⁺ citolíticas podem reconhecer antígenos virais nas células do SNC infectadas pelo HTLV-1, causando uma desmielinização. Entretanto, não há como ter uma ação específica contra as células do SNC. A presença de INF- γ , na infecção pelo HTLV-1, seu reconhecimento pelas células T CD8⁺, e as citocinas secretadas pela microglia, como o TNF- α e IL-6, são tóxicas para a membrana de mielina (JEFFERY et al., 1999; DAENKE et al., 1996).

Resumidamente, a interação do HTLV-1 com as células hospedeiras, resulta em ativação celular, gerando um processo inflamatório crônico na medula espinhal que após vários anos, leva a lesão e destruição da membrana de mielina. Após o início da agressão da membrana, aparece o primeiro sintoma da desmielinização provocada pela TSP/HAM. Acredita-se que um dos mecanismos pelo qual o HTLV-1 desenvolve a mielopatia seja, a alta produção de citocinas e diversos fatores envolvidos, como β -quimiocinas e aumento da expressão de moléculas de adesão, decorrentes da ativação celular. Com a migração de células inflamatórias para o SNC, começa a liberação, em alta quantidade de INF- γ , atuando nas células responsáveis pela produção do TNF- α . Desta forma, o TNF- α pode ser altamente tóxico para as células infectadas pelo HTLV-1 e para a membrana de mielina, levando a sua destruição. Lee et al. (2002), sugeriram que o INF- γ regula a produção de IL-10, IL-12 e IL-18 nos pacientes com doenças infecciosas.

Com a análise da expressão de citocinas inflamatórias, verifica-se aumento da população celular Th1 nos indivíduos HTLV-1 assintomáticos e com TSP/HAM. Assim, as moléculas de sinalização celular envolvendo a produção de citocinas são importantes na infecção pelo HTLV-1 diferenciando as células T “naives” em células T auxiliares efectoras (NISHIURA et al., 2004).

Os mecanismos auto-imunes podem existir como ocorrência de uma auto-ativação das células T com os antígenos do SNC, ou pela infecção das células T, resultando na auto-reativação destas células no SNC, onde encontram seus antígenos, com conseqüente resposta imune específica e desmielinização. A

existência de uma herança genética, como a presença de alguns haplótipos HLA, pode ter alguma implicação na suscetibilidade do hospedeiro (USUKU et al., 1988; GODOY et al., 1994; UCHIYAMA, 1997; MANNS et al., 1998; JEFFERY et al., 1999).

Apesar de existirem, até o presente momento, muitas informações relacionadas aos mecanismos fisiopatológicos envolvidos no desenvolvimento da TSP/HAM, os fatores envolvidos ainda permanecem obscuros. Outra possibilidade seria a desregulação do sistema imune causado pela presença do HTLV-1.

2.6 MARCADOR DE RISCO NA INFECÇÃO HTLV-1: CARGA PROVIRAL

Em muitas infecções virais, a carga viral pode indicar a taxa de replicação, infectividade e indicar a possibilidade de causar danos ao hospedeiro, nos diversos períodos da infecção. Isto tem sido demonstrado, com a carga plasmática do HIV-1, onde está correlacionada com a progressão para a Aids e a resposta ao tratamento retrovirais (MELLORS et al., 1997).

Com base na importância da carga proviral em algumas viroses, estudos estão sendo realizados sobre a importância da carga proviral na infecção pelo HTLV-1 e sua progressão para TSP/HAM (MONTANHEIRO et al., 2005; NAGAI et al., 1998). Porém a maior dificuldade ocorre pelo longo período de incubação do vírus e pela baixa incidência do desenvolvimento da doença (< 5%) (KAPLAN et al., 1990).

A ausência ou baixa formação de partículas virais no plasma torna-se difícil detectar a viremia plasmática. Deste modo, a carga proviral do HTLV-1 é detectada na célula mononuclear do sangue periférico (CMN). Normalmente, a carga proviral é baixa nos indivíduos assintomáticos do que nos pacientes com doenças relacionadas ao HTLV-1. Porém existem sobreposições de valores entre os grupos assintomáticos e sintomáticos. A carga proviral do HTLV-1 é importante

na transmissão sexual ou vertical do vírus, além do tempo de exposição ao fator de risco (relação sexual ou aleitamento materno) (NAGAI et al., 1998).

Na TSP/HAM, correlacionou a carga proviral com a progressão da doença especialmente com a fraqueza muscular. Embora a detecção da carga proviral no sangue periférico esteja associada com a TSP/HAM, essa não é a única condição de diagnosticar ou prognosticar a patologia (NAGAI et al., 1998, MATSUZAKI et al., 2001).

No líquido a carga proviral é um importante dado para definir a progressão da TSP/HAM. Pois, as células infectadas pelo HTLV-1 no sistema nervoso central (SNC) são importantes na patogênese da doença, acelerando o processo inflamatório local (LEZIN et al., 2005).

OBJETIVO

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a resposta imune ao vírus HTLV-1, através da dosagem de citocinas e quimiocinas. Além de quantificar a carga proviral do HTLV-1 nos indivíduos assintomáticos e com TSP/HAM.

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Avaliar a resposta imune específica do HTLV-1 e na patogênese TSP/HAM, quantificando as citocinas IL-2, IL-4, IL-10, IL-12 p70, INF- γ e TNF- α pela técnica ELISA;
- Quantificar a expressão de mRNA de INF- γ e TNF- α pela PCR em tempo real;
- Avaliar a resposta imune na produção de β quimiocinas RANTES, MIP-1 α e MIP-1 β , pela técnica ELISA ;
- Determinar a carga proviral (DNA) do HTLV-1 circulante no sangue periférico.

METODOLOGIA

4 METODOLOGIA

4.1 CASUÍSTICA

Nós últimos dez anos, uma coorte foi criada no Instituto de Infectologia "Emílio Ribas" (IIER) com finalidade estudar a história natural da infecção pelo HTLV-1 e HTLV-2 em São Paulo e a co-infecção com outros agentes virais como o HIV e vírus da hepatite C (HCV). Esse Serviço conta com especialista na área de infectologia, neurologia, nutrição e fisioterapia. Os vários projetos de pesquisa em andamento foram aprovados pelo CEP do IIER e os aspectos éticos foram adequadamente abordados. Durante esse período, cerca de 550 pacientes foram investigados e identificados para HTLV-1, HTLV-2, HIV-1 e HCV. Estes indivíduos servirão de base para o recrutamento desse estudo.

4.1.1 CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO DOS PACIENTES

Critérios de inclusão

Indivíduos adultos, acima de 18 anos de idade, diagnóstico de infecção retroviral por ELISA e confirmados por WB e/ou PCR. Nos casos de TSP/HAM o critério de classificação foi o de Osame (WHO), com diagnóstico confirmado por neurologista especializado em neuro-infectologia.

Critérios de exclusão

Mulheres grávidas, pacientes em uso de imunossupressores ou insuficiência renal ou hepática, neoplasias ou doenças autoimunes.

4.1.2 ASPECTOS ÉTICOS

Após aprovação do CEP, termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi obtido todos voluntários que aceitaram participar desta pesquisa (Anexo 1). Somente indivíduos que assinaram o TCLE poderão participar deste estudo.

4.2 METODOLOGIAS

4.2.1 CULTURA E ESTIMULAÇÃO DE CÉLULAS

Para análise específica de cada paciente, as células de cada indivíduo foram cultivadas com meio RPMI enriquecido com soro AB (basal) e adição do mitógeno fitohemaglutinina (PHA). Com a finalidade de avaliarmos a produção espontânea de citocinas, cada ensaio foi acompanhado de cultura sem mitógeno (estímulo espontâneo), recebendo apenas meio de cultura enriquecido.

As células mononucleares do sangue periférico foram obtidas através de punção venosa em tubo com ACD e/ou EDTA. Centrifuga-se o sangue por 10 minutos a 1000 rpm para se obter o “buff-coat” e foram diluídos em salina

isotônica (1/2), e depois, colocado sobre uma solução de “Ficoll-Hypaque” de densidade 1.076 e centrifugado por 20 minutos a 2000rpm. As células foram separadas por meio de aspiração, com pipeta Pasteur, e lavadas três vezes com RPMI, por 10 minutos a 1000 rpm. Após a última lavagem, as células foram ressuspensas em 1ml de RPMI, sendo depois coradas com azul tripan, para avaliação da viabilidade celular. As células foram contadas no aparelho Cell Dytin, e ajustada para uma concentração de 2×10^6 céls/ml. Após isso, as células foram plaqueadas em placa de microtitulação de 24 alvéolos, utilizando-se apenas meio de cultura (estímulo espontâneo) e estimuladas pela PHA a 2,5ug/ml por 24 horas, onde foram mantidas em estufa a 37 °C e 100% de umidade relativa, com atmosfera constante de 5% de CO₂, ao final de cada cultura foram colhidos os sobrenadantes e guardados em freezer -70 °C. Estes sobrenadantes foram descongelados antes da dosagem de citocinas pelo método de ELISA “in house”.

Após a retirada do sobrenadante, as células foram ressuspensas, lavadas e colocadas em eppendorf para obtenção do pellet celular e congelados a -70 °C até extração do mRNA celular para detecção da PCR em tempo real.

4.2.2 DOSAGEM DE INTERLEUCINAS E β -QUIMIOCIAS EM SOBRENADANTES DE CULTURA

As interleucinas IL-2, IL-12, IL-15, TNF- α e INF- γ foram quantificadas pelo método imunoenzimático (ELISA) de captura “in house” pelo kit DuoSet (R&D Systems, Minneapolis, EUA). O ensaio foi realizado conforme informações do fabricante.

4.2.3 QUANTIFICAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL PARA A DETECÇÃO DE CITOCINAS

Isolamento do RNA e transcrição reversa

O mRNA foi extraído das CMN e padronizado para alíquotas de 2×10^6 células. A extração foi realizada pelo uso de um conjunto de reagentes (RNase Mini Kit, Qiagen, Valencia, CA, EUA) seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante. Após extração do mRNA, foi realizada a retrotranscrição pelo *kit* comercial (SuperScript Qiagen, Valencia, CA, EUA).

“Primers”

Os *primers* convencionais para a detecção de citocinas IL-2, INF- γ e TNF- α , foram com base nas seguintes seqüências, publicadas anteriormente:

IL-2

F:5' CAACTCTTGTCTTGCATTGCAC;

R: 3'GTTTCAGATCCCTGTAGTTCCA;

TNF α

F 275: CCCAGGGACCTCTCTCTAATC;

R358: ATGGGCTACAGGCTTGTCAC;

INF- γ

F464: CTAATTATTCCGGTAACTGACTTGA;

R538: ACAGTTCAGCCATCACTTGGA;

β -actin

F976:GGATGCAGAAGGAGATCACTG;

R1065: CGATCCACACGGAGTACTTG;

Ensaio da PCR

Para uma reação de 50 μ l, utilizamos sondas marcadas “Syber Green” (Invitrogen,), as condições dos reagentes foram seguidas pelas instruções do fabricante. As condições do ciclo térmico foram às seguintes: 10 minutos em 94°C para incubação, 45 ciclos de amplificação a 94°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos. A fluorescência foi monitorada durante a temperatura de anelamento a 60°C. Para curva-padrão da PCR em tempo real, utilizamos o mRNA do gene da β -actina.

4.2.4 QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PROVIRAL (DNA) DO HTLV-1

Extração celular

O DNA genômico foi extraído das CMN e padronizado para alíquotas de 2×10^6 células. A extração do DNA foi realizada através de uma coluna de sílica

(Kit GFX Armesham Pharmacia, EUA). A concentração de DNA extraído foi quantificado através de corrida eletroforética e verificado com gel de agarose 2%.

Primers e sondas marcadas

Os *primers* convencionais e as sondas marcadas com a fluorescência FAM-5' e TAMRA-3' ("TaqMan"), foram com base nas seguintes seqüências, publicadas anteriormente:

HTLV-1 (*primers* foram baseados no gene *tax*):

HTLV-1 TaqMan *probe* 5' FAM-TCCTCCAGGCCATGCGAAATACTC-3'TAMRA.

F 5'-CAATCACTCATACAACCCCAA-3'

R 5'-TCTGGAAAAGACAGGGTTGGG-3'

Albumina

Alb-S (5'-GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGT-3')

Alb-AS (5'-AAACTCATGGGAGCTGCT GGTT-3')

Alb TaqMan *probe* (5'-FAM-CCTGTCATGCCACACAAATCTC TCC-TAMRA-3')

Ensaio da PCR

Para uma reação de 25µl, utilizamos 1,5µl da template de DNA, e adicionados 0,50 µM cada primer HTLV-1, 0,41 µM de TaqMan probe, 250 µM dATP, 250 µM dGTP, 250 µM dCTP, 500 µM dUTP, 4 mM MgCl₂, 2,5 U de Taq polimerase platinum, 50 mM KCL, e 10 mM Tris HCL (pH 8,3). A reação do ensaio de PCR em tempo real foi realizada em uma microplaca de 96 wells, onde utilizamos 16 alvéolos para curva-padrão e o restante para as amostras de

pacientes (ensaios realizados em duplicatas). As condições do ciclo térmico foram as seguintes: 10 minutos a 95°C para incubação, 45 ciclos de amplificação (95°C por 15 segundos e 60°C por 30 segundos). A fluorescência foi monitorada durante a temperatura de anelamento a 60°C.

Quantificação da carga proviral do HTLV-1

A quantidade de DNA proviral de HTLV-1 foi calculada seguindo a fórmula: número de cópias de HTLV-1 (Px) por 2×10^6 CMN = [(número de cópias de Px)/(número de cópias de Albumina / 2)] $\times 2 \times 10^6$.

4.2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para analisar os resultados obtidos pela densidade óptica (DO) do aparelho, transferimos os valores para o programa "Prisma 3.0". Utilizamos os testes "T test anoway" e Teste não-paramétrico de "Mann-Whitney". Quando o valor de "p" foi < que 0,05, a análise foi considerada estatisticamente significativa.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 DESCRIÇÃO DOS PACIENTES COM INFECÇÃO PELO HTLV

Entre julho de 1997 a março de 2007, 553 indivíduos foram atendidos no Ambulatório de HTLV e fazem parte dos indivíduos de estudo para avaliação da possibilidade de infecção pelo HTLV-1/2. Resumidamente, esses pacientes foram submetidos aos testes de triagem, ensaio imunoenzimático “in vitro” (ELISA) e “Western Blot” (WB), para HTLV-1/2, HIV-1, vírus da hepatite B (HBV) e vírus da hepatite C (HCV). Os indivíduos positivos para HTLV-1 foram confirmados pela Reação da Cadeia da Polimerase (PCR).

Um total de 305 portadores de HTLV-1 foi identificado. Setenta e três apresentaram TSP/HAM e 232 eram portadores HTLV-1 assintomáticos. Dos pacientes com TSP/HAM, 11 apresentavam co-infecção pelo HCV, quatro com HTLV-1/HIV-1/HCV. Dos pacientes assintomáticos, 17 com co-infecção pelo HCV, 12 pelo HIV-1 e 21 com tripla co-infecção (HTLV-1/HIV-1/HCV). Além disso, três indivíduos apresentam infecção pelo HTLV-1, HTLV-2 e HIV-1, destes dois apresentam, ainda, infecção pelo HCV.

Os indivíduos desta triagem que são negativos HTLV-1 e HIV-1 (incluindo também pessoas com HBV e/ou HCV), fizeram parte do grupo controle deste trabalho.

5.2 CARGA PROVIRAL DE HTLV-1

Para esta análise, os indivíduos foram separados em dois grupos: assintomático e com TSP/HAM (Anexo 2). A carga proviral do HTLV-1 nas CMNs foi quantificada em 273 indivíduos. Os assintomáticos constituíram um total de 200 indivíduos, sendo 117 mulheres com média de 43 anos ($\pm 13,4$), contagem celular de 1015 cells/mm³ CD4⁺ e 560 cel/mm³ de CD8⁺; 83 homens com aproximadamente 39 anos, 1040 cell/mm³ CD4⁺ e 652 cell/mm³ CD8⁺.

O grupo TSP/HAM composto por 73 indivíduos (50 mulheres com média de 47 anos de idade e 1416 cel/mm³ CD4⁺ e 674 cel/mm³ CD8⁺) e 23 homens com média de 48 anos e 916 cel/mm³ de CD4⁺ e 661 cel/mm³ de CD8⁺; nove indivíduos apresentavam co-infecção HIV-1, sendo de dois são mulheres e a média de 41 anos com 1140 células T CD4⁺ e 877 células T CD8⁺ (Tabela 1 e Figura 9). A idade que os pacientes desenvolveram TSP/HAM foi entre 30 a 37 anos, e o tempo para o desenvolvimento de TSP/HAM foi de 8,5 anos para as mulheres, 12 anos para os homens.

Grande parte dos indivíduos assintomáticos apresentou carga proviral indetectável (abaixo de 10 cópias/10⁴ CMN) (Figura 10). Por outro lado, os indivíduos com TSP/HAM revelaram carga viral aumentada em comparação ao grupo assintomático ($p < 0,0001$), e subdividindo o grupo pelo tempo de TSP/HAM, não houve diferença estatística na carga proviral (Figura 11).

	HTLV-1 assintomáticos		TSP/HAM	
	mulheres	homens	mulheres	homens
n.	117	83	50	23
Idade (ano) média / DP	43 (± 13,4)	39 (± 11,5)	47 (± 11,8)	48 (± 11,7)
Células T CD4⁺ média, cells/mm ³ (percentil 25 – 75%)	1015 (273 – 1165)	1040 (619 – 2315)	1416 (816 – 1915)	916 (644 – 1077)
Células T CD8⁺ média, cells/mm ³ (percentil 25 – 75%)	560 (374 – 738)	652 (452 – 1105)	674 (412 – 822)	661 (374 – 865)
Tempo de doença				
TSP/HAM média, ano (percentil 25 – 75%)	--	--	8,5 (4,6 – 13,3)	12 (5,9 - 23,1)
Carga proviral média, cópias/2x10 ⁶ cells (percentil 25 – 75%)	98 (0 – 121)	93 (0 – 95)	870 (130 – 998)	516 (262 – 745)

Tabela 1. Dados demográficos dos indivíduos assintomáticos e TSP/HAM (número de indivíduos, sexo, idade, células T CD4⁺ e células T CD8⁺), utilizados na quantificação da carga proviral de HTLV-1.

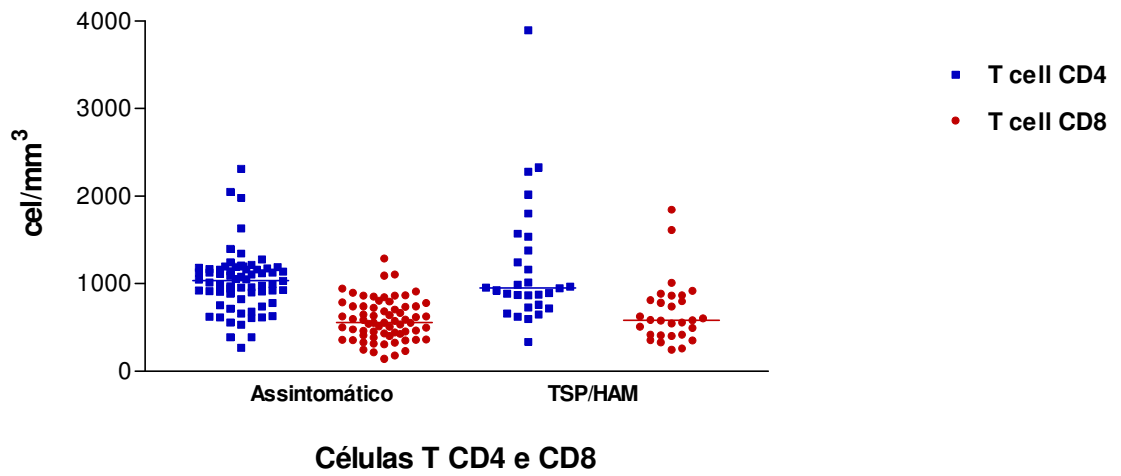


Figura 9. Contagem de células T CD4⁺ e CD8⁺ (cel/mm³), nos grupos: assintomáticos e TSP/HAM na quantificação da carga proviral de HTLV-1.

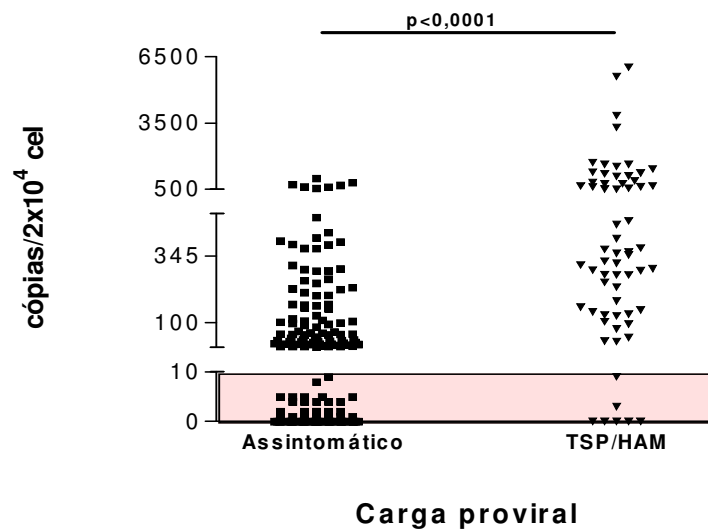


Figura 10. Carga proviral dos indivíduos HTLV-1 assintomáticos e com TSP/HAM.

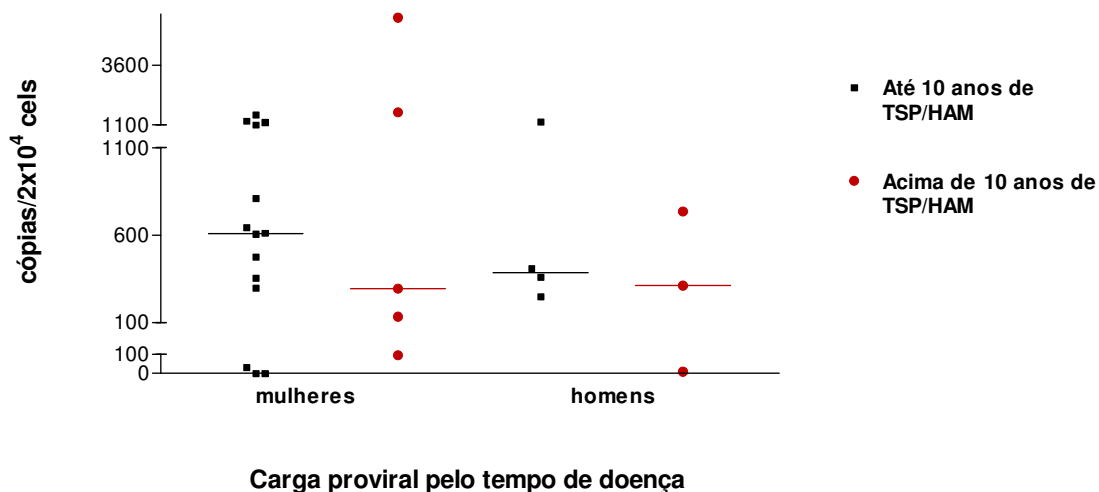


Figura 11. Análise da carga proviral dos pacientes com TSP/HAM pelo tempo de evolução da doença. Dados preliminares.

5.3 ANÁLISE DA CARGA PROVIRAL DE HTLV-1 AO LONGO DO TEMPO

Os pacientes retornam periodicamente (semestral e/ou anual) para consultas e exames de rotina. Com isso, foi possível realizar, em indivíduos a carga proviral ao longo dos nove anos de seguimento.

Para esta análise, foram selecionamos pacientes com, pelos menos, cinco coletas ao longo dos anos. Um total de 43 pacientes preencheu esse critério, sendo 17 indivíduos assintomáticos (cinco homens com co-infecção pelo HIV-1) e 12 mulheres. Dos pacientes com TSP/HAM, foram inclusos 26 indivíduos, sendo 12 homens (cinco infectados pelo HCV e três infectados pelo HIV-1) e 14 mulheres e entre elas uma possui HCV (Tabela 2).

Os indivíduos assintomáticos apresentaram carga proviral estável ao longo da infecção (Tabela 2). Os quatro indivíduos assintomáticos apresentaram queda na carga proviral (nº: 3, 4, 5 e 10) e cinco permaneceram indetectáveis (nº: 1, 9, 11, 12 e 15) (Figura 12). Já nos pacientes com TSP/HAM houve aumento na carga proviral, com exceção de um paciente que permaneceu indetectável (nº 42), e dois que apresentaram queda progressiva da carga proviral (nº: 28 e 32) (Figura 13).

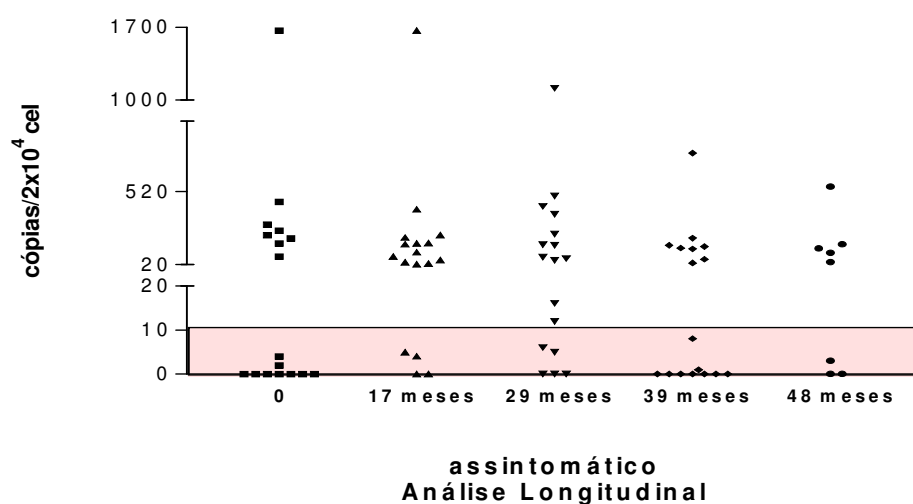


Figura 12. Análise da carga proviral do HTLV-1 longitudinal dos indivíduos assintomáticos.

	Sexo	TSP	HIV	HCV	Carga proviral				
					0	17 meses	29 meses	39 meses	48 meses
1	M	--	POS	POS	0	0	0	8	3
2	M	--	POS	--	0	207	63	32	554
3	F	--	--	POS	255	160	16	0	0
4	F	--	--	--	223	223	159	154	102
5	F	--	--	--	1672	1670	1113	782	132
6	M	--	POS	POS	297	106	418	0	160
7	F	--	--	--	0	168	52	135	39
8	M	--	POS	POS	77	24	6	144	0
9	F	--	--	--	0	0	12	0	
10	F	--	--	--	450	400	230	57	
11	F	--	--	--	0	29	0	0	
12	F	--	--	--	4	4	5	1	
13	M	--	POS	--	167	167	490	129	
14	F	--	--	--	202	38	365	202	
15	F	--	--	--	0	5	0	0	
16	F	--	--	--	0	53	152	0	
17	F	--	POS	POS	2	77	72	0	
18	M	TSP	--	--	656	926	185	495	292
19	F	TSP	--	--	369	458	282	549	0
20	M	TSP	--	--	291	414	450	2414	1450
21	F	TSP	--	--	77	77	0	22	39
22	M	TSP	--	POS	473	516	276	607	624
23	M	TSP	--	POS	65	192	819	451	914
24	M	TSP	POS	POS	973	1615	1522	910	1272
25	M	TSP	--	--	1792	1232	528	4456	3056
26	M	TSP	--	--	504	275	635	57	60
27	F	TSP	--	--	581	171	811	875	660
28	F	TSP	--	--	503	474	222	245	16
29	M	TSP	POS	POS	113	99	0	0	66
30	M	TSP	--	--	311	322	360	591	
31	F	TSP	--	POS	889	880	64	466	
32	M	TSP	--	--	125	110	116	0	
33	M	TSP	POS	--	1094	668	760	109	
34	F	TSP	--	--	0	231	125	299	
35	F	TSP	--	--	20	158	83	22	
36	F	TSP	--	--	3	140	318	78	
37	F	TSP	--	--	1533	2102	1939	710	
38	F	TSP	--	--	0	613	397	782	
39	F	TSP	--	--	293	60	119	173	
40	F	TSP	--	--	0	3	180	0	
41	M	TSP	--	--	262	409	220	161	
42	F	TSP	--	POS	0	0	0	0	
43	F	TSP	--	--	5203	3294	3261	1045	

Tabela 2. Dados gerais da análise longitudinal dos indivíduos assintomáticos e TSP/HAM.

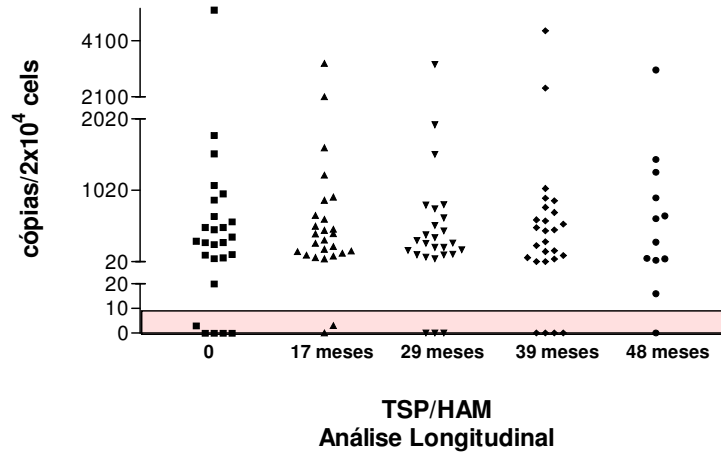


Figura 13. Análise da carga proviral longitudinal dos pacientes com TSP/HAM.

5.4 CARGA PROVIRAL NO LÍQUOR

Quatorze indivíduos com TSP/HAM (11 mulheres e três homens) acima de 50 anos (exceção de uma mulher com 26 anos) tiveram o LCR analisado em conjunto com as CMNs, porém, não houve amplificação do DNA em quatro pacientes (Tabela 3). Em geral, a carga proviral está aumentada no LCR, com exceção de dois pacientes (Figura 14).

Nº	HCV	CMN*	Líquor**
1	Negativo	349	0
2	Negativo	461	0
3	Negativo	648	263
4	Negativo	44	439
5	Negativo	0	464
6	Negativo	--	565
7	Negativo	296	848
8	Negativo	--	1576
9	Negativo	0	5079
10	Negativo	33	4777
11	Negativo	55	0
12	Negativo	115	0
13	Positivo	0	0
14	Negativo	1626	0

Tabela 3. Comparação entre a carga proviral do HTLV-1 nas células mononucleares do sangue periférico (CMN) e líquido (LCR) em pacientes com TSP/HAM. HCV – vírus da hepatite C; CMN – células mononucleares do sangue periférico; * CMN - valores em número de cópias/10000 células; ** número de cópias/mL.

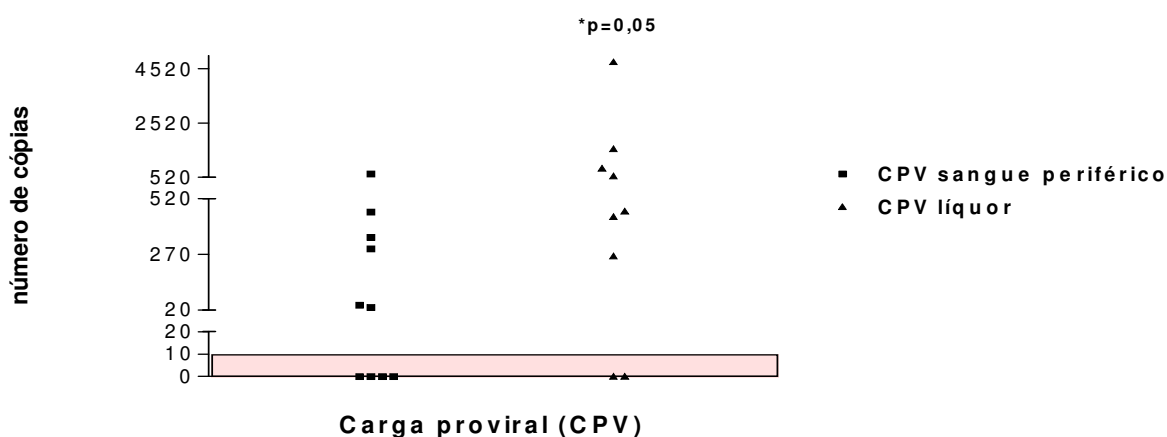


Figura 14. Quantificação da carga proviral dos pacientes TSP/HAM nas CMN e nas células do LCR.

5.5 DOSAGEM DE CITOCINAS POR ELISA

Para esta análise, três grupos foram estudados: grupo controle com 32 indivíduos (HTLV-1 e HIV-1 negativos), sendo 12 homens e 20 mulheres; grupo HTLV-1 assintomático com 68 indivíduos, sendo 22 homens e 46 mulheres; e grupo TSP/HAM com 44 pacientes, sendo 21 homens e 23 mulheres (Tabela 4). A média de idade foi de 42 anos para os indivíduos controle e assintomático e 47 anos para os pacientes com TSP/HAM. A média da contagem de células T CD4⁺ e CD8⁺ foram, respectivamente, 798 e 985 cels/mm³ no grupo controle, 979 e 600 cels/mm³ no grupo assintomático e 1662 e 740 cels/mm³ no grupo com TSP/HAM. As células T CD8⁺ apresentaram valores superiores a 500 cels/mm³, com exceção de três mulheres do grupo assintomático que apresentaram células T CD8⁺ inferior a 250 cels/mm³ (179, 199 e 248), porém, com células T CD4⁺ superior a 600 cels/mm³ (983, 1194 e 649, respectivamente). O grupo TSP/HAM apresentou número absoluto de células T CD4⁺ mais elevado que o grupo controle (p=0,02) (Figura 15).

	Controle (32)	Assintomático (68)	TSP/HAM (44)
Mulheres/homens	20/12	46/22	23/21
Idade (ano) média / SD	42 (\pm 9)	42 (\pm 12)	47 (\pm 10,0)
Células T CD4⁺ média, cells/mm ³ (percentil 25 – 75%)	798 (472 – 1169)	980 (668 – 1189)	1662 (771 – 1462)
Células T CD8⁺ média, cells/mm ³ (percentil 25 – 75%)	985 (644 – 1354)	600 (356 – 805)	740 (506 – 840)
Tempo de doença			
TSP/HAM média, ano (percentil 25 – 75%)	--	--	10,2 (5,2 – 18,2)

Tabela 4. Dados demográficos, número de células T CD4⁺ e células T CD8⁺, dos indivíduos controles, HTLV-1 assintomáticos e TSP/HAM.

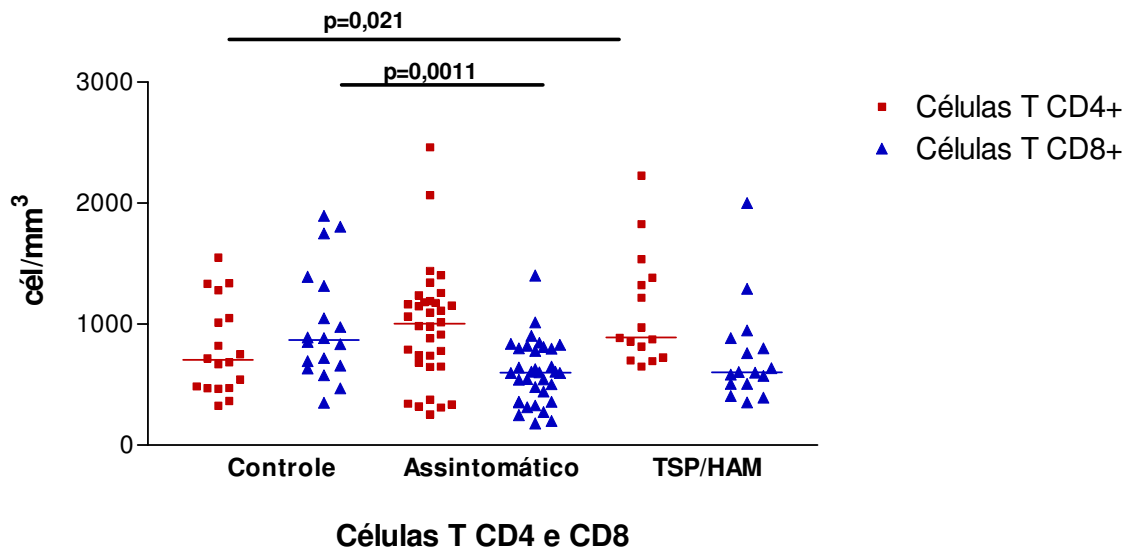


Figura 15. Contagem de células T CD4⁺ e T CD8⁺ nos grupos para análise de citocinas e quimiocinas pelo ensaio de ELISA e expressão de mRNA de citocinas pela PCR em tempo real.

Produção de IL-2 pela CMN detectada por ELISA

Na dosagem de IL-2, o grupo controle, assintomático e com TSP/HAM, apresentaram um aumento quando submetidos ao estímulo pela PHA ($p < 0,0001$), como biologicamente seria o esperado (Figura 16). Isso demonstrou que os grupos apresentaram um comportamento semelhante à resposta espontânea e pela PHA.

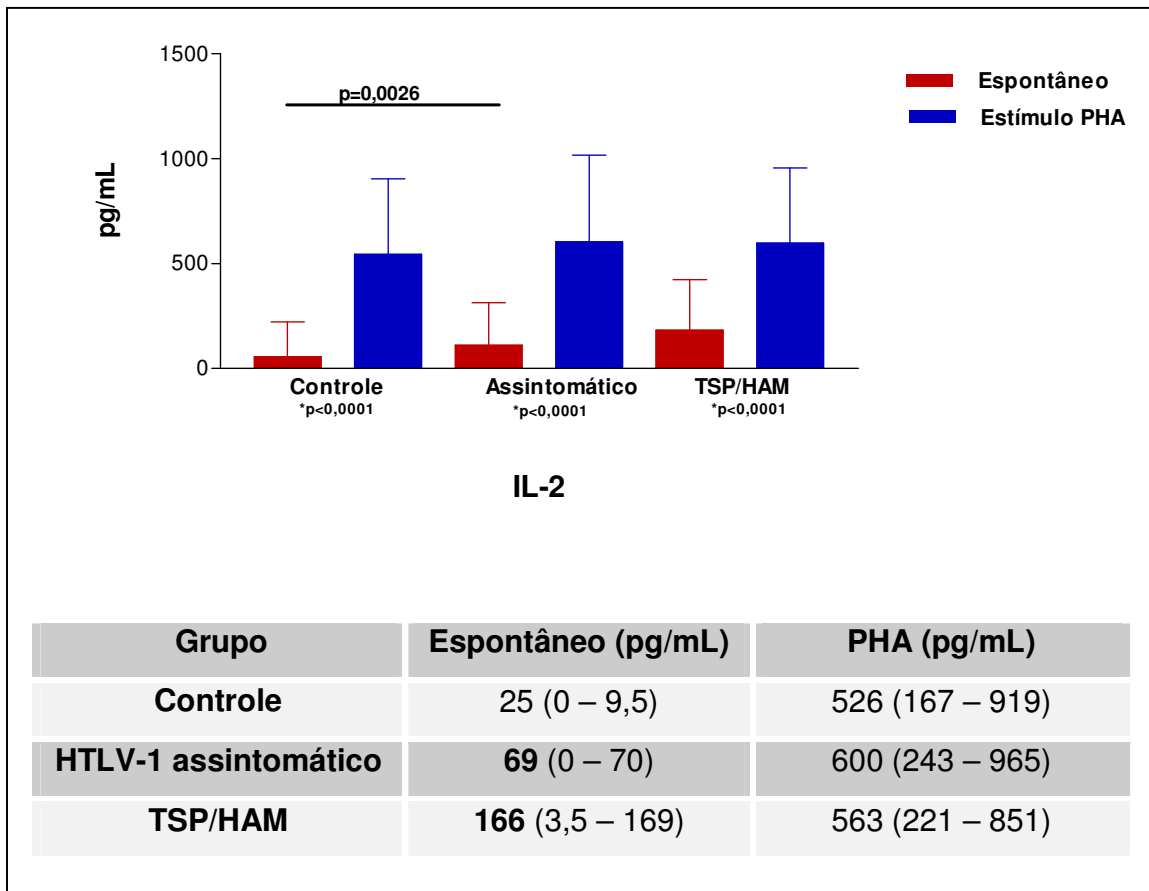


Figura 16. Produção de IL-2 pelas CMN entre indivíduos controle, pacientes infectados pelo HTLV-1 assintomático e com TSP/HAM. Valores em média e percentil 25-75%.

O grupo assintomático está aumentado em comparação ao grupo controle na produção espontânea ($p=0,002$). Embora sem diferença estatística, parece existir uma alta liberação espontânea de IL-2 no grupo com TSP/HAM. Esses resultados são importantes porque demonstraram que a linfoproliferação observada na infecção pelo HTLV-1 foi independente da presença da IL-2.

Produção de IL-2R pela CMN detectada por ELISA

Na produção espontânea e pela PHA, não houve diferença estatística entre os três grupos analisados. Porém, os assintomáticos apresentaram uma melhor resposta quando estimulados pela PHA, embora, estatisticamente não significante (Figura 17).

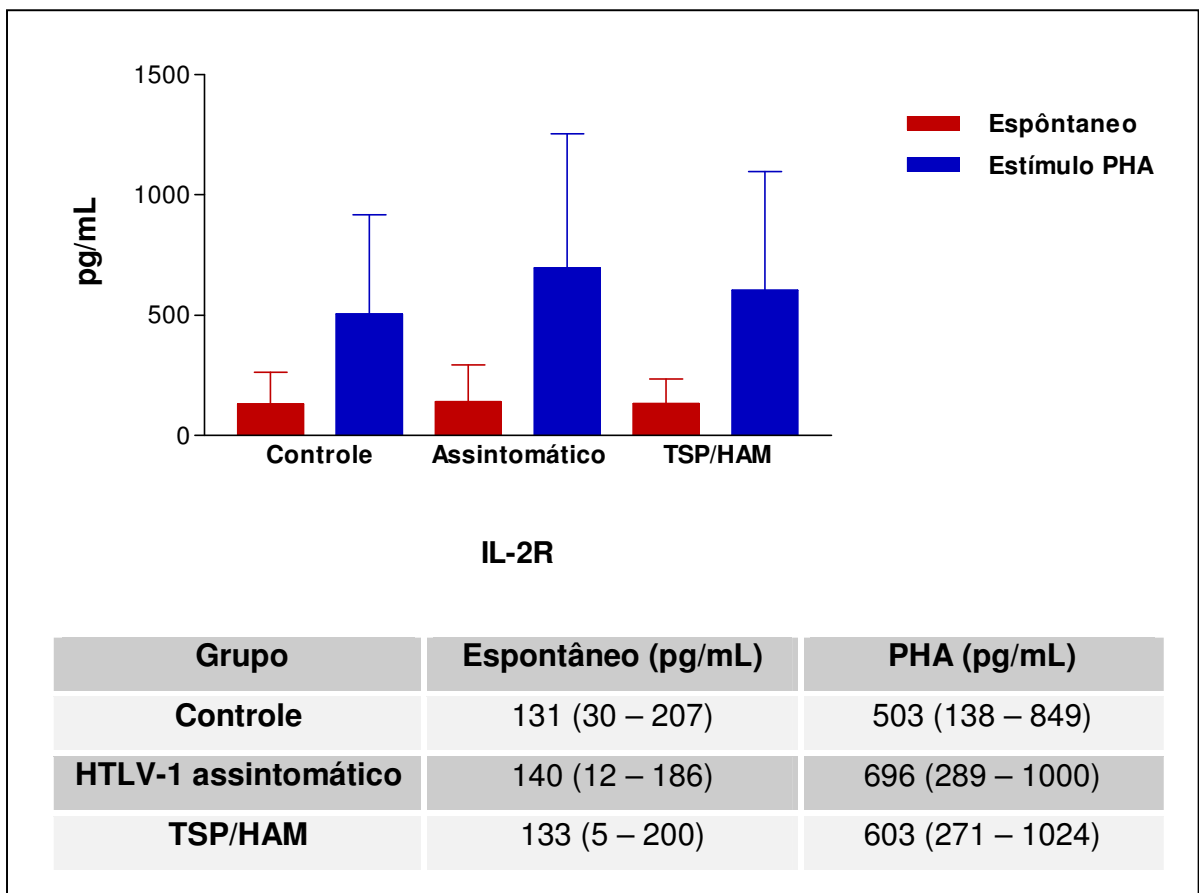


Figura 17. Produção de IL-2R pelas CMN entre indivíduos controle, pacientes infectados pelo HTLV-1 assintomático e com TSP/HAM. Valores em média e percentil 25-75%.

Produção de INF- γ pela CMN detectada por ELISA

Na dosagem de INF- γ (Figura 18), o grupo controle e assintomático estão aumentados na presença da PHA sobre a produção espontânea ($p < 0,0001$ e $p = 0,0002$, respectivamente). Porém, o grupo TSP/HAM não apresentou essa diferença ($p = 0,72$) demonstrando que o aumento de INF- γ ocorreu espontaneamente e permanece estável quando estimulado pela PHA.

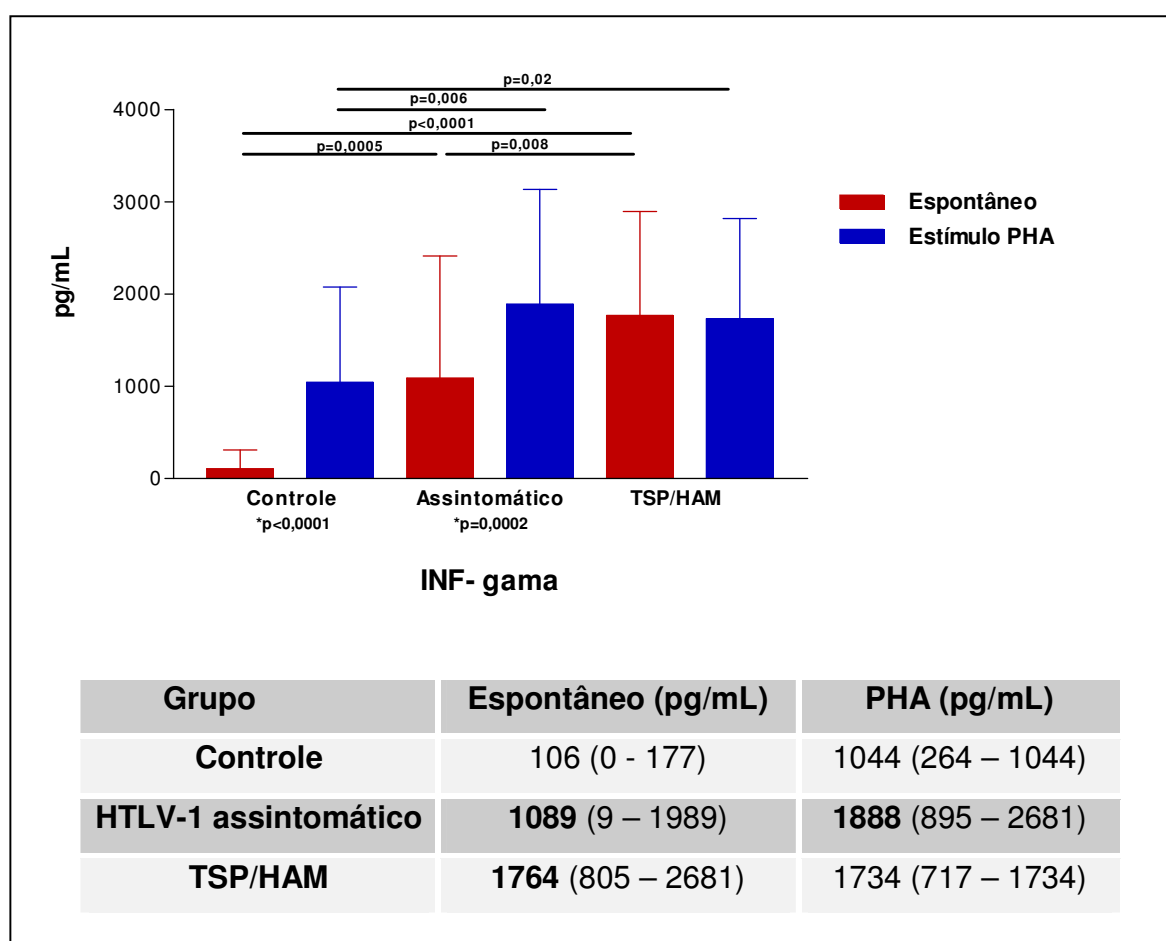


Figura 18. Produção de INF- γ pelas CMN entre indivíduos controle, pacientes infectados pelo HTLV-1 assintomático e com TSP/HAM. Valores em média e percentil 25-75%.

Na análise entre grupos (Figura 18), observamos aumento de 10 vezes no assintomático em comparação ao controle ($p= 0,0005$) e de duas vezes no grupo TSP/HAM em comparação ao assintomático ($p=0,008$) na produção espontânea. Quando estimulado pela PHA, houve aumento de duas vezes nos assintomáticos em comparação ao controle ($p= 0,006$).

Produção de TNF- α pela CMN detectada por ELISA

Na dosagem de TNF- α , houve um aumento na produção pela PHA em comparação a produção espontânea, nos grupos controle, assintomático e TSP/HAM ($p<0,0001$, $p<0,0001$ e $p=0,002$, respectivamente) (Figura 19).

Os níveis de produção TNF- α foram duas vezes aumentados no grupo assintomáticos quando comparado ao grupo controle, espontaneamente e pela PHA ($p=0,02$ e $p=0,04$, respectivamente). No grupo com TSP/HAM, não se observou alteração em comparação ao assintomático. Porém, quando comparado ao controle, houve um aumento de três vezes na produção espontânea ($p=0,001$) e duas vezes na produção pelo estímulo PHA ($p=0,04$) (Figura 19).

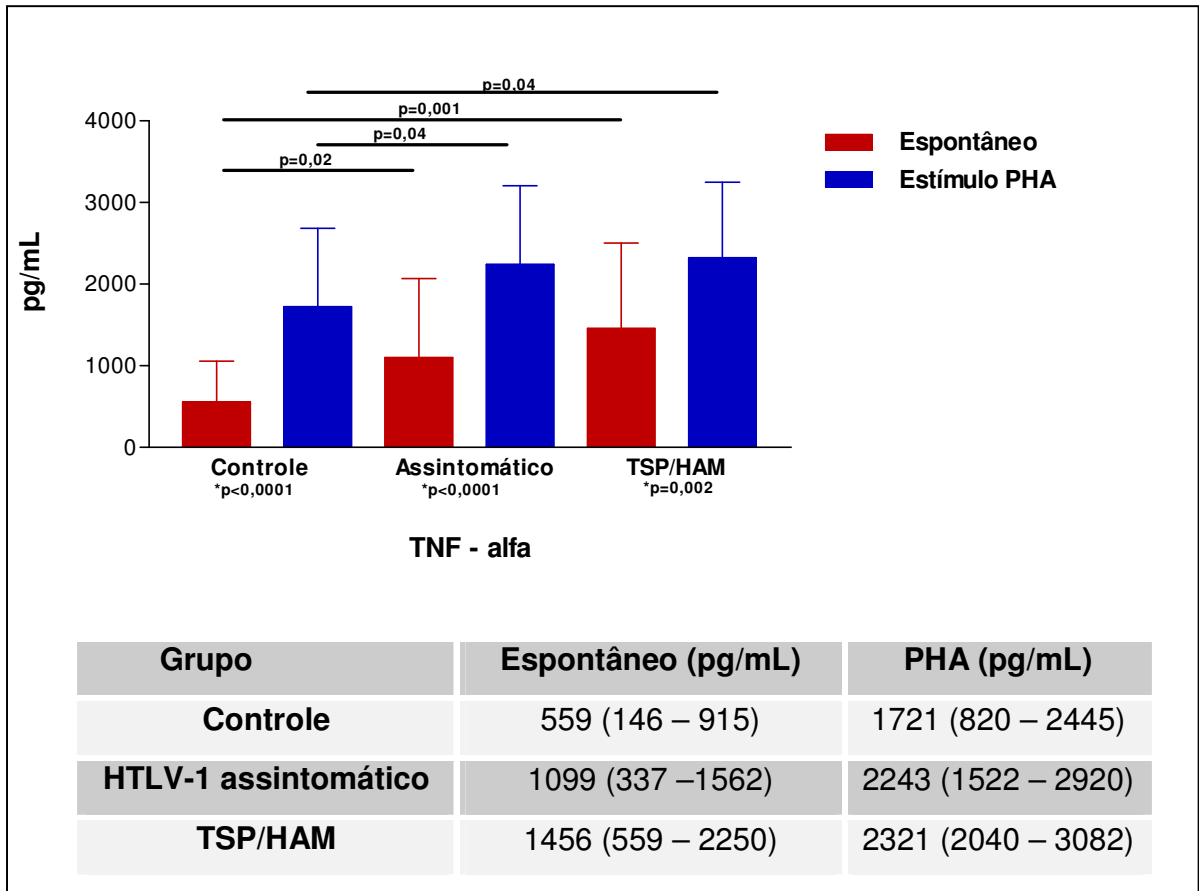


Figura 19. Produção de TNF- α pelas CMN entre indivíduos controle, HTLV-1 assintomático e com TSP/HAM. Valores em média e percentil 25-75%.

Produção de IL-4 pela CMN detectada por ELISA

Na produção de IL-4 (Figura 20), houve aumento nos grupos controle ($p < 0,0001$) e assintomático ($p = 0,0003$) estímulo PHA sobre a produção espontânea. No grupo com TSP/HAM, não se observou essa significância, embora, há um aumento na média dos grupos de quatro vezes da PHA sobre a produção espontânea. Os grupos apresentaram um padrão semelhante sem a

presença de estímulo, e há um aumento de duas vezes nos pacientes com TSP/HAM nos demais grupos, porém sem significância estatística. A produção de IL-4 teve um aumento de duas vezes no grupo assintomático em relação ao grupo com TSP/HAM, e o grupo controle está aumentado (duas vezes) em relação aos assintomáticos, porém sem significância estatística.

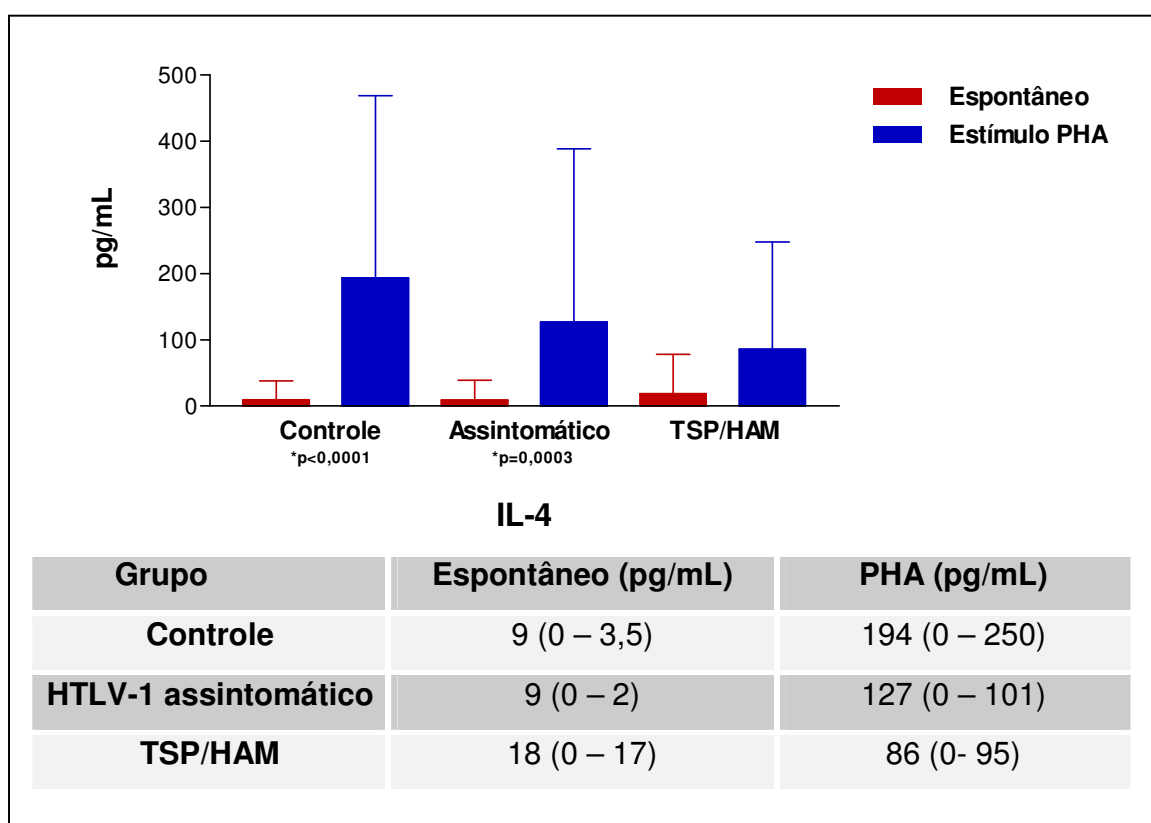


Figura 20. Produção de IL-4 pelas CMN entre indivíduos controle, HTLV-1 assintomático e com TSP/HAM. Valores em média e percentil 25-75%.

Produção de IL-10 pela CMN detectada por ELISA

Na dosagem da IL-10, nos grupos: controle, assintomático e TSP/HAM tiveram resultados semelhantes na produção espontânea e no estímulo com PHA. Não há diferença estatística entre os grupos analisados (Figura 21).

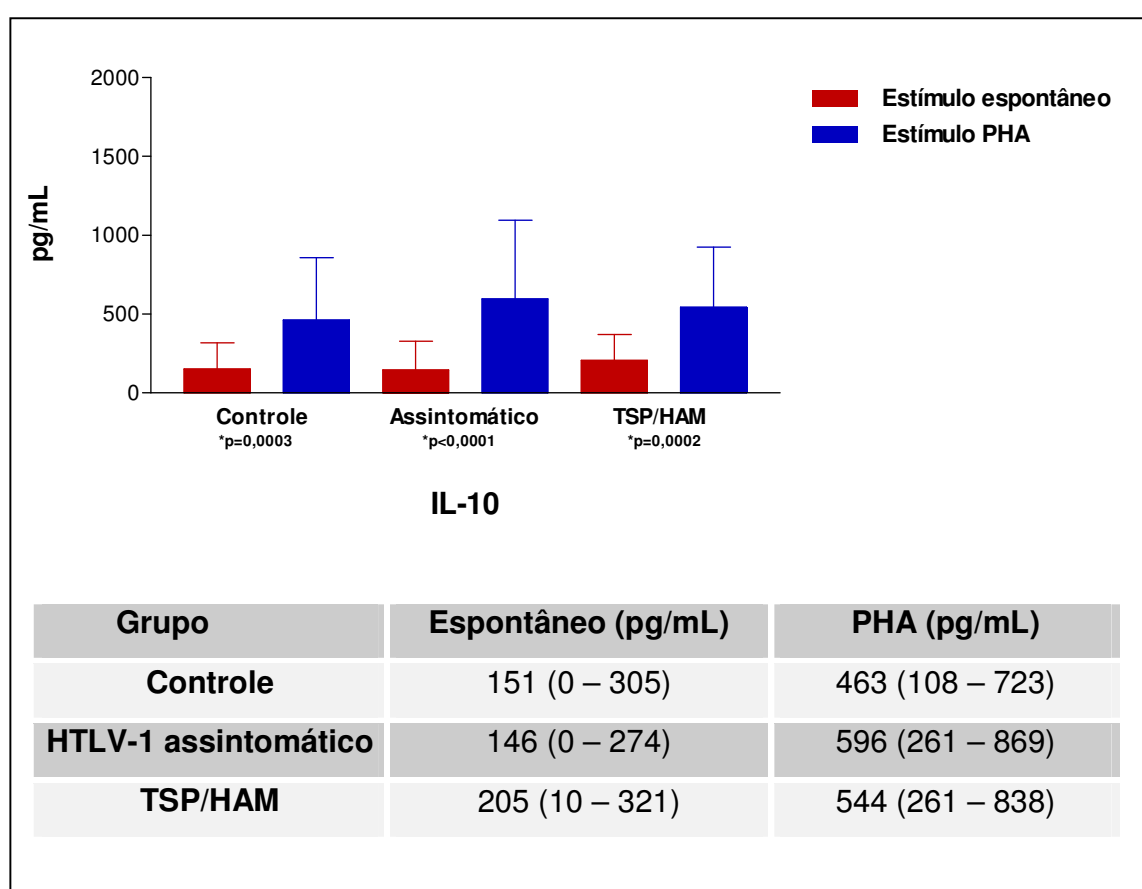


Figura 21. Produção de IL-10 pelas CMN entre indivíduos controle, HTLV-1 assintomático e com TSP/HAM. Valores em média e percentil 25-75%.

Produção de IL-12 p70 pela CMN detectada por ELISA

Na dosagem da IL-12 p70, o grupo controle apresentou uma produção aumentada na estimulação pela PHA ($p=0,02$), porém essa produção não foi modificada nos grupos infectados pelo HTLV-1. Não há diferença estatística entre os grupos analisados (Figura 22).

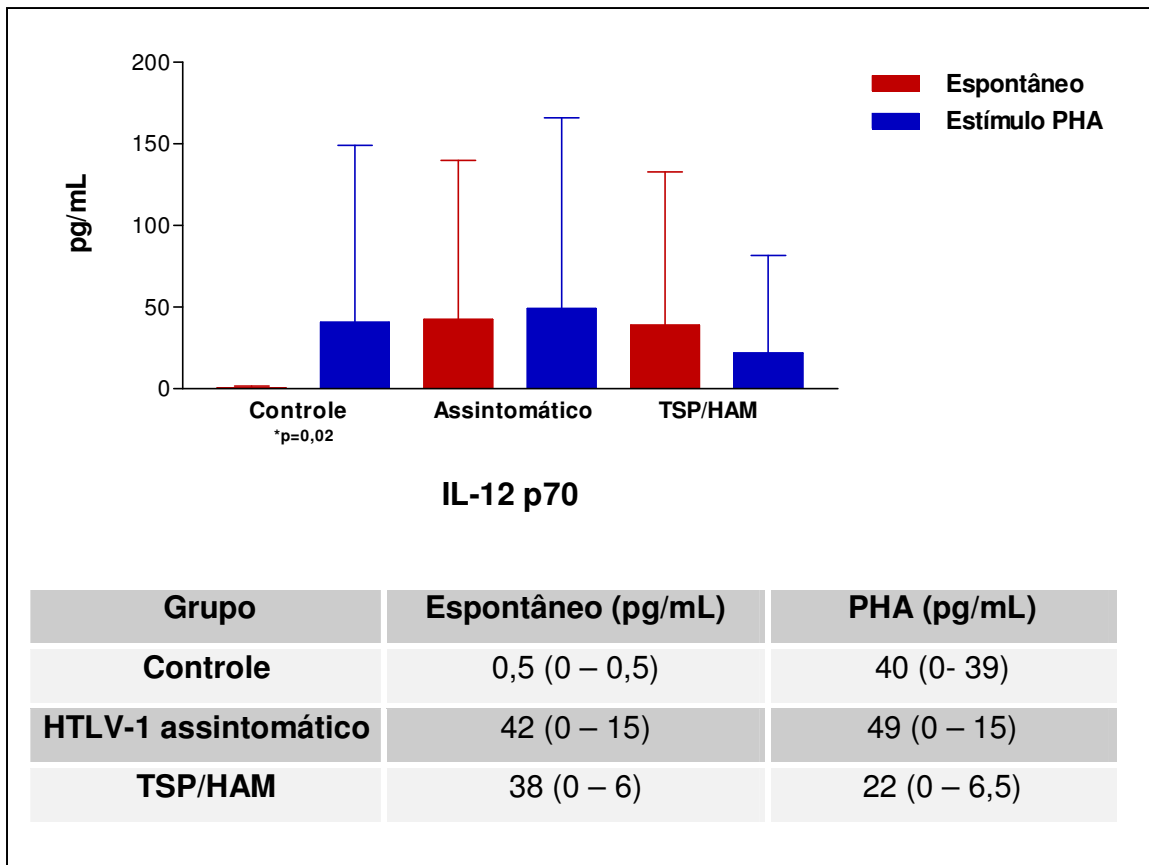


Figura 22. Produção de IL-12 p70 pelas CMN entre indivíduos controle, HTLV-1 assintomático e com TSP/HAM. Valores em média e percentil 25-75%.

5.6 DOSAGEM DE CITOCINAS PELA PCR EM TEMPO REAL

As citocinas INF- γ e TNF- α foram quantificadas pelo uso da técnica de PCR em tempo real, utilizando o kit Syber Green. Valores abaixo de 10 cópias/ 10^4 CMN foram considerados indetectáveis.

Os grupos foram divididos em: grupo controle com 29 indivíduos (HTLV-1 e HIV-1 negativos), grupo HTLV-1 assintomático com 47 indivíduos e grupo TSP/ (Tabela 4).

Expressão de mRNA/TNF- α pela CMN detectada pela PCR em Tempo Real

O grupo controle e TSP/HAM apresentaram expressão de mRNA semelhante no estímulo PHA e espontâneo. O grupo assintomático apresentou diminuição na expressão de mRNA quando comparado ao controle (duas vezes) porém, sem significância estatística. Há aumento de duas vezes no grupo TSP/HAM com o assintomático ($p=0,05$) (Figura 23) na produção espontânea.

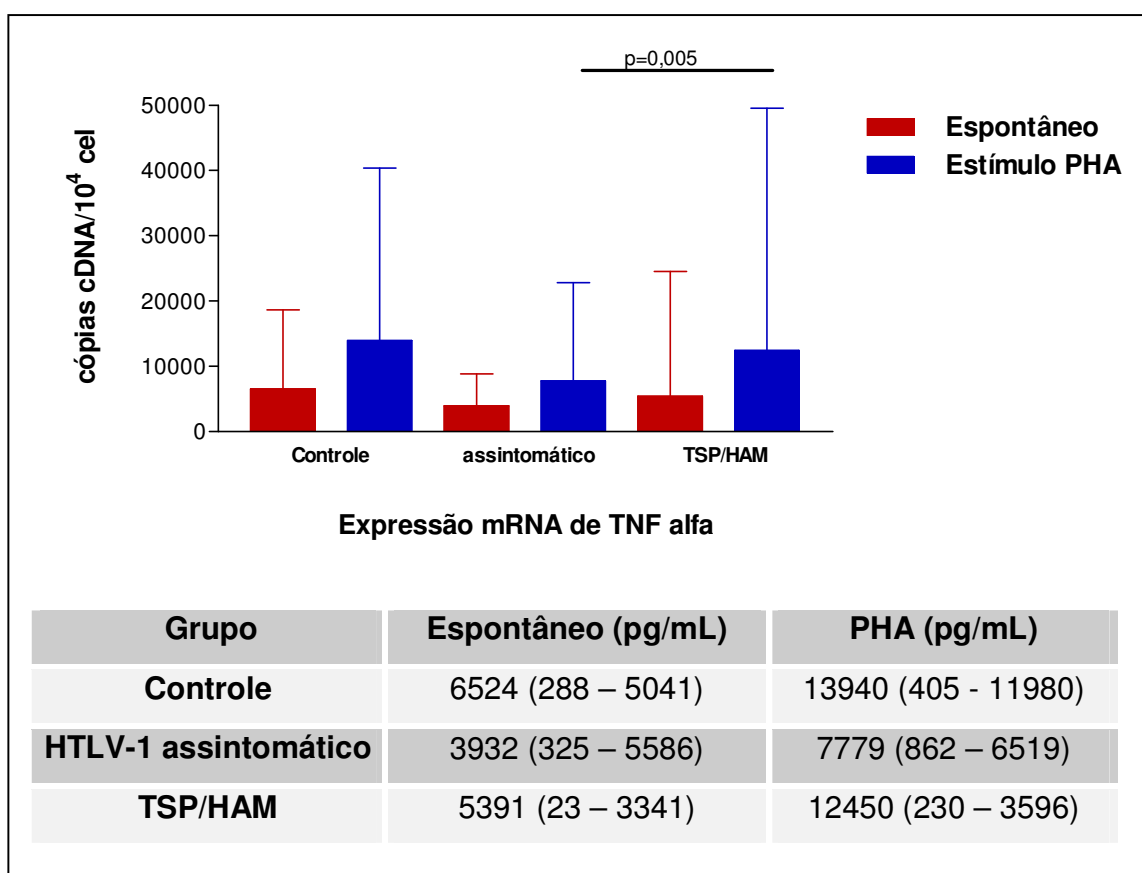


Figura 23. Expressão de mRNA de TNF- α dos grupos controle, HTLV-1 assintomático e TSP/HAM pela PCR em tempo real. Valores em média e percentil 25-75%.

Expressão de mRNA/INF- γ pela CMN detectada pela PCR em Tempo Real

Na expressão de mRNA de INF- γ (Figura 24), o grupo assintomático apresentou abundante expressão de mRNA do INF- γ quando estimulado pela PHA. Quando comparado com o controle, houve aumento de 15 vezes na produção espontânea ($p=0,01$) e de três vezes no estímulo pela PHA, porém sem significância estatística. No grupo TSP/HAM há aumento de quatro vezes em relação ao assintomático na expressão espontânea de mRNA do INF- γ ($p<0,0001$).

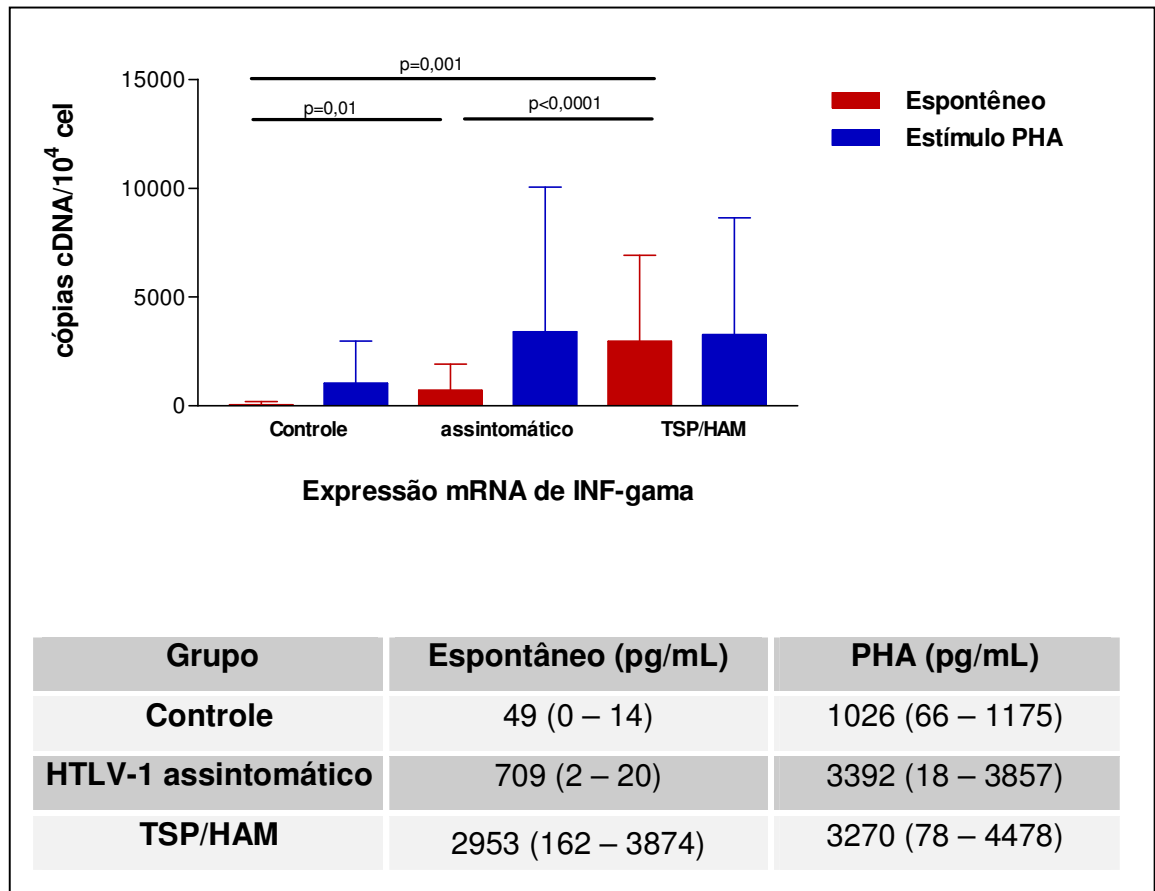


Figura 24. Expressão de mRNA de INF- γ dos grupos controle, HTLV-1 assintomático e TSP/HAM pela PCR em tempo real. Valores em média e percentil 25-75%.

5.7 DOSAGEM DE β -QUIMIOCINA PELO ENSAIO ELISA

Na análise de RANTES, o grupo assintomático apresentou aumento em comparação ao grupo controle no estímulo pela PHA ($p=0,009$) e espontâneo ($p=0,001$) (Figura 25 e Anexo 3).

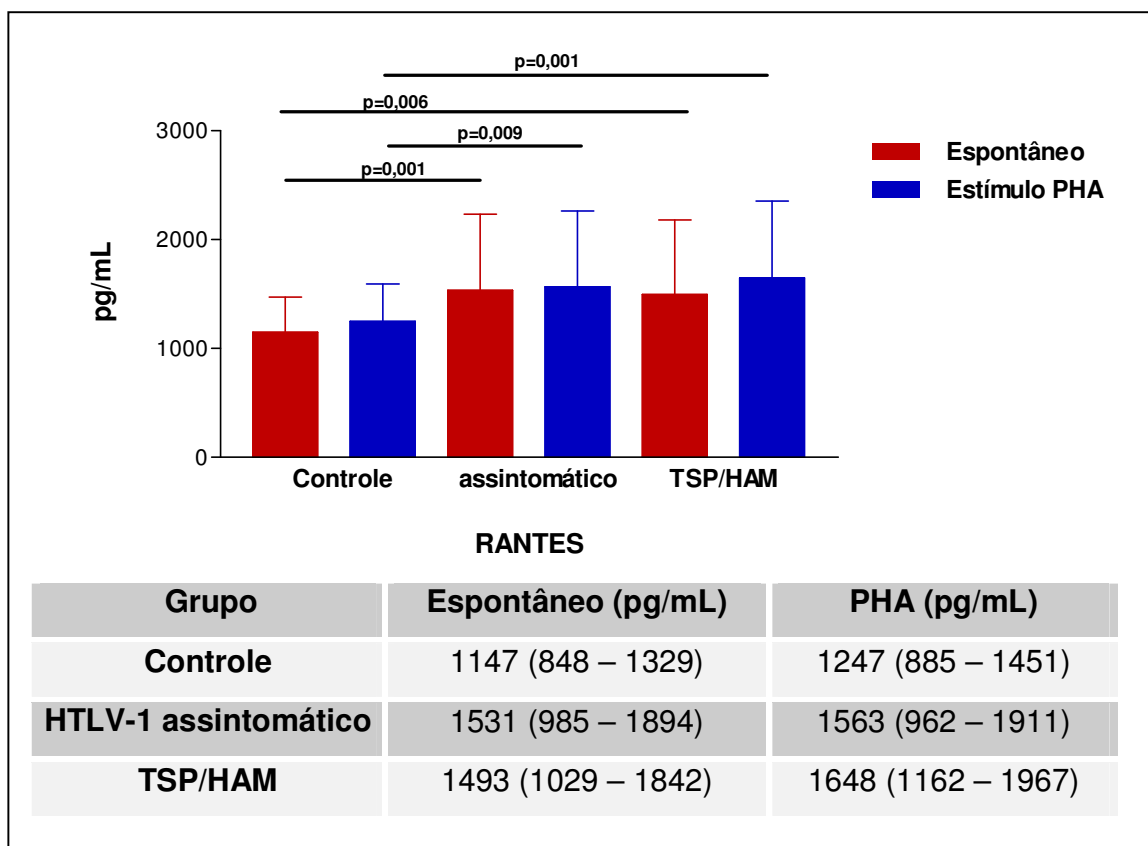


Figura 25. Produção de RANTES pelas CMN entre indivíduos controle, HTLV-1 assintomático e com TSP/HAM. Valores em média e percentil 25-75%.

Na detecção de MIP-1 α , o grupo TSP/HAM esteve duas vezes aumentado quando comparado ao assintomático na produção espontânea ($p=0,01$) e pela PHA ($p=0,05$) (Figura 26).

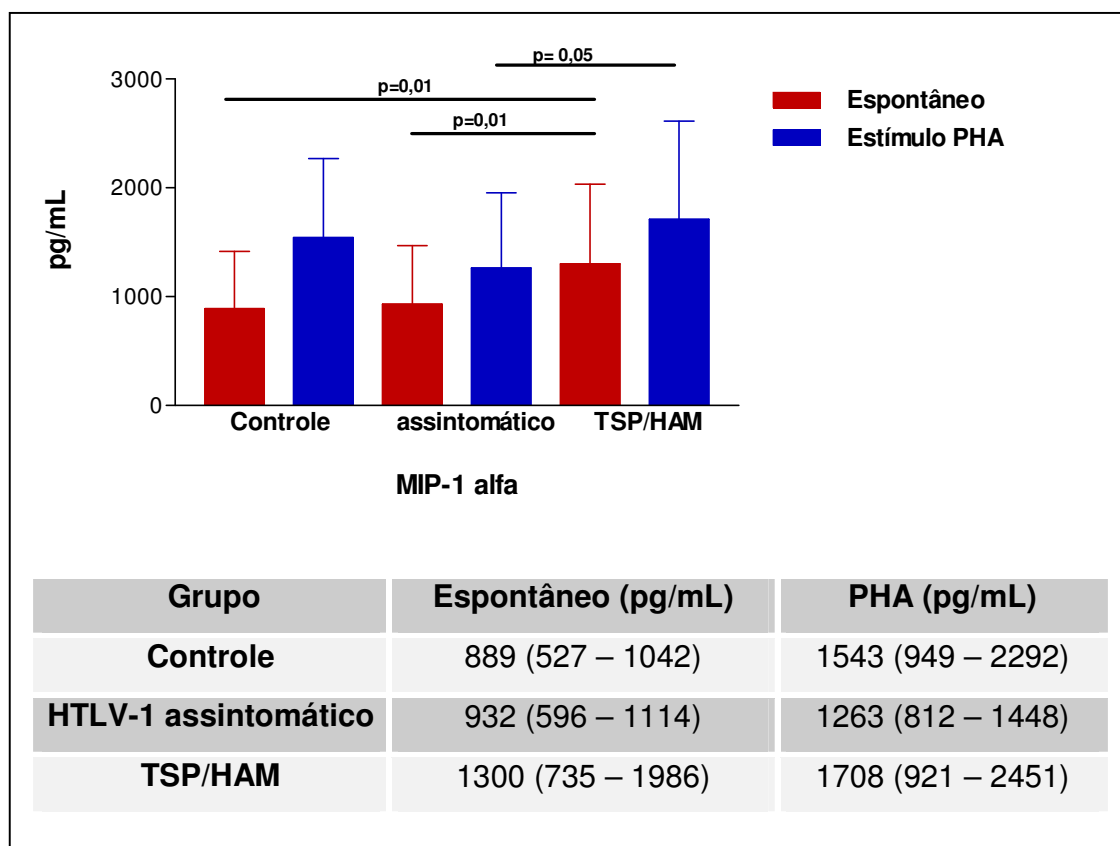


Figura 26. Produção de MIP-1 α pelas CMN entre indivíduos controle, HTLV-1 assintomático e com TSP/HAM. Valores em média e percentil 25-75%.

Não houve alterações nos grupos avaliados na dosagem de MIP-1 β (Figura 27).

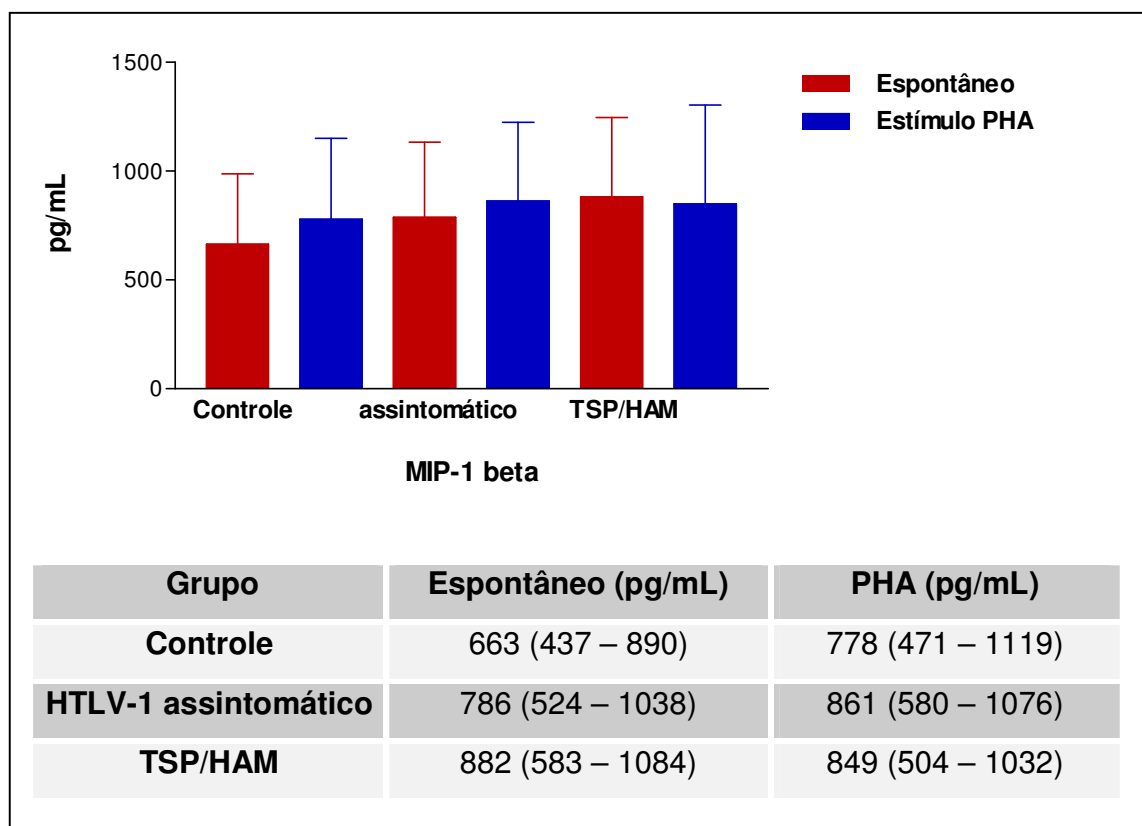


Figura 27. Produção de MIP-1 β pelas CMN entre indivíduos controle, HTLV-1 assintomático e com TSP/HAM. Valores em média e percentil 25-75%.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A infecção pelo HTLV-1 apresenta um longo período de incubação até o aparecimento dos sintomas, com um tempo médio, entre 30 a 40 anos, para o desenvolvimento da TSP/HAM. A TSP/HAM pode ocorrer em menos de 1-2% dos portadores (OSAME et al., 2002), e os primeiros sintomas são fraqueza muscular e enrijecimento dos membros inferiores, decorrentes da desmielinização crônica e progressiva da medula espinhal lombo-torácica. Acredita-se que a ativação constante do sistema imunológico, pela presença do HTLV-1, provavelmente, pode ser a causa da progressão para a TSP/HAM.

A carga proviral do HTLV-1 pode ser um indicativo de progressão para TSP/HAM. Muitos vírus estudados, a carga viral circulante pode definir o processo de agressão e desenvolvimento de patologias (KOWALA-PIASKOWSKA et al., 2007; YEO et al., 2007). Como observado na infecção pelo HIV-1, onde a alta viremia plasmática (RNA) é um dos marcadores indicativos do desenvolvimento da síndrome da imunodeficiência adquirida (Aids). Porém, o uso de anti-retrovirais, promove uma queda expressiva da carga viral, melhora a resposta imunológica, e aumento da sobrevida do paciente (MELLORS et al., 1997; SAAG et al., 1996).

A técnica da PCR em tempo real permitiu um grande avanço nas pesquisas médicas em relação à quantificação de patógenos. No caso do HTLV-1, poucos trabalhos determinaram a quantificação da carga proviral circulante, pelos métodos convencionais, utilizados para a monitoração de pacientes soropositivos. Porém, evidências demonstraram que o vírus continua seu ciclo de replicação nas células do hospedeiro. A PCR em tempo real facilitou a quantificação da carga proviral do HTLV-1, devido sua alta sensibilidade e especificidade em amplificar materiais genéticos. Na literatura, as primeiras quantificações do HTLV-1 foram realizadas através das técnicas “Southern Blot” e PCR quantitativo, evidenciando a replicação viral em pacientes com TSP/HAM apesar do vírus não ser detectado no plasma (YOSHIDA et al., 1989; GESSAIN et al., 1990, KUBOTA et al., 1993).

Em nossos resultados, a carga proviral estava aumentada nos pacientes com TSP/HAM (MONTANHEIRO et al., 2005), dados que corroboram com o fato, que o aumento da carga proviral poderia estar relacionada com o desenvolvimento da TSP/HAM (NAGAI et al., 1998). Por outro lado, a maioria dos indivíduos infectados pelo HTLV-1, que permanece assintomática, apresenta carga proviral indetectável ou com valores inferiores a 100 cópias/10⁴ células, Em contraste, os indivíduos com TSP/HAM apresentam carga proviral superior a 500 cópias/10⁴ células, o que pode indicar que a carga proviral pode ser considerada um marcador de progressão da TSP/HAM. Kubota et al. (1993) analisaram a carga proviral do HTLV-1 e verificaram que nos assintomáticos a carga proviral é baixa (2 a 20 cópias /100 células), e está aumentada em 14 vezes nos pacientes com TSP/HAM.

De fato vários estudos, como do grupo de Nagai et al. (1998), que analisaram 243 indivíduos assintomáticos e 202 pacientes com TSP/HAM, e observaram alta carga proviral nos pacientes sintomáticos. A estimativa da carga proviral na TSP/HAM foi de 16 vezes superior aos assintomáticos. Essa evidência também foi verificada quando subdividiu este grupo em homens e mulheres, demonstrando que há maior predisposição das mulheres em desenvolver a TSP/HAM (NAGAI et al., 1998). Tosswill et al. (1998) testou a carga proviral de HTLV-1, através da PCR duplo, com primer da região *pol* e *tax* do HTLV-1, e obteve uma média de 14.0 cópias nos pacientes com TSP/HAM e 1.55 cópias nos assintomáticos, sendo que a carga proviral foi expressa em cópias/100 células. Desta forma, a despeito do método de detecção da carga proviral, os pacientes com TSP/HAM apresentam melhor sensibilidade na quantificação.

Há relatos que na TSP/HAM, cerca de 6% das células são infectadas pelo vírus, enquanto que nos indivíduos assintomáticos, apenas 1% das células é infectada (HASHIMOTO et al., 1998), o que facilmente explicaria a alta carga proviral nos pacientes com TSP/HAM. Nossos resultados corroboram com Kamihira et al. (2003), onde indicam que a carga proviral detectada pela PCR em tempo real é suficiente e relevante para que ocorra o monitoramento do número

de células infectadas no sangue periférico e prevenir o agravamento e desenvolvimento da doença.

O modo de transmissão viral não foi objeto de nosso estudo, porém, Murphy et al. (2004) correlacionaram a carga proviral com o tempo de doença e modo de infecção. Assim, verificou que na transmissão sanguínea há aumento da carga proviral nos indivíduos assintomáticos e na TSP/HAM, enquanto que na transmissão sexual há baixa carga proviral dos indivíduos assintomáticos e sintomáticos. Outro estudo correlacionou à transmissão sexual do HTLV-1 e concluíram que os homens transmitem sexualmente o vírus para suas parceiras (KAPLAN et al., 1996).

Nossos dados mostraram que ocorreu um aumento da carga proviral nos pacientes TSP/HAM em relação aos assintomáticos, indicando que esta pode ser considerada um marcador de evolução de doença (MONTANHEIRO et al. 2005). Entretanto, para uma compreensão do papel da carga proviral, a análise longitudinal de ser realizada, envolvendo um número maior de pessoas infectadas pelo HTLV-1 e que desenvolveram a TSP/HAM, deve ser realizada.

O tempo do diagnóstico de TSP/HAM (> ou < 10 anos), não influenciou a quantidade da carga proviral do HTLV-1 em nossos resultados. Dois pacientes apresentaram sintomas da TSP/HAM entre 1,5 e 2,3 anos após a primeira consulta clínica e com carga proviral de 355 e 298 cópias/10⁴ células, respectivamente. A idade média que esses pacientes desenvolveram TSP/HAM foi a torno da terceira e quarta década, correspondendo com o período de incubação esperada para essa doença (TAYLOR et al., 1998).

Desta forma, evidenciamos se existe associação na carga proviral quanto ao tempo dos primeiros sintomas da doença e da infecção pelo HTLV-1. De fato, grande parte dos assintomáticos apresentou carga proviral estável durante o acompanhamento clínico de nove anos. Um outro estudo (KWAAN et al., 2006), revelou que a carga proviral permaneceu estável, mesmo subdividindo os pacientes por outros fatores que podem contribuir no desenvolvimento da TSP/HAM, como por exemplo, o consumo de álcool e tabaco.

Neste estudo, os portadores do HTLV-1 e com TSP/HAM estão em acompanhamento ambulatorial, e a grande maioria apresentou estabilidade na carga proviral ao longo da infecção. Em geral, os indivíduos sintomáticos apresentaram queda progressiva da carga proviral. Essa queda pode indicar que os pacientes com a TSP/HAM responderam ao uso de corticosteróide administrado. Isso também corrobora com as teorias do processo inflamatório com causador da patogênese e que o uso de imunomoduladores com uma importante ferramenta para o tratamento da TSP/HAM.

Fatores genéticos, como o haplótipo de HLA, podem influenciar a carga proviral nos indivíduos com HTLV-1. De fato, existem haplótipos que são reconhecidos pelas células T, com uma resposta mais vigorosa. Entre nossos pacientes, há uma família com o desenvolvimento da TSP/HAM na infância ou adolescência. Nagai et al. (1998), relacionando indivíduos infectados pelo HTLV-1, com alta carga proviral são propensos a desenvolver TSP/HAM, este fato pode estar relacionado com a presença do mesmo haplótipos de HLA na família. Nosso estudo não envolveu a análise do polimorfismo do haplótipo HLA, porém vários trabalhos correlacionaram o haplótipo HLA como fator de proteção contra o desenvolvimento da TSP/HAM. Em outro estudo, que analisou o HLA restrito (HLA *A), notou que a ação antiviral dos linfócitos T citotóxicos (CTL), como determinante da diminuição na carga proviral, tornando-se estes fatores benéficos contra a destruição tecidual e progressão da doença.

O HTLV-1 está associado a um grau variável de disfunções esfinterianas e sensitivas, que afeta mais mulheres do que homens, geralmente na quarta e na quinta década de vida. Em nossa análise, não incluímos as funções esfinterianas nas análises e nos nossos dados não houve diferença estatística da carga proviral entre homens e mulheres (Anexo 4). Porém, outros pesquisadores observaram que há alta carga proviral nas mulheres do que nos homens (NAGAI et al., 1998). Esses dados discordantes, possivelmente, influenciados pelo fator genético, pelo uso de algum tratamento específico, ou tempo de doença, entre outros.

O sítio de acometimento da TSP/HAM é o sistema nervoso central. Deste modo, investigamos alguns parâmetros no LCR. A carga proviral foi mais elevada, em média, no LCR que nas células do sangue periférico. Isso sugeriu que as células T, que migraram para o espaço subaracnóideo e presente no líquido, são possivelmente infectadas pelo HTLV-1. Poucos trabalhos investigaram a carga viral líquórica, Takenouchi et al. (2003), mostraram resultados similares, indicando que a migração celular que ocorre no líquido seja proveniente de células infectadas pelo HTLV-1.

Resumidamente, os pacientes com TSP/HAM apresentaram carga proviral maior que os indivíduos assintomáticos. Este achado está de acordo ao descrito em outras infecções persistentes, como HIV-1 e HBV (YEO et al.,2007), cujo prognóstico está intimamente relacionado com o nível de vírus circulante. Na infecção pelo HTLV-1, o aumento da carga proviral é importante, nas CMN do sangue ou do LCR, pois pode estar influenciando a progressão e o desenvolvimento da doença.

Vários estudos indicaram que a TSP/HAM pode ser uma doença imuno-mediada. Deste modo, além da quantificação do HTLV-1, foram estudados os níveis de citocinas e quimiocinas das CMN de pacientes infectados pelo HTLV-1.

Houve um aumento no número de células T CD4⁺ circulantes nos pacientes TSP/HAM, enquanto que as células T CD8⁺ estão diminuídas em relação ao grupo controle. Entretanto, não realizamos um estudo funcional, como a capacidade de citotoxicidade das células T. O HTLV-1 possui tropismo pelas células T CD4⁺, que estão diretamente relacionadas com a produção de citocinas, e auxiliam a resposta de células T CD8⁺. Além disso, uma parte do infiltrado celular que circula pelo sistema nervoso central, corresponde às células T CD4⁺ infectadas pelo vírus, participando diretamente com dano na membrana de mielina. Deste modo, as células T CD4⁺ podem agir diretamente sobre a membrana de mielina ou pela indução de linfocinas inflamatórias (GOON et al., 2002).

As células T são as principais produtoras de citocinas pró-inflamatórias, e a infecção pelo HTLV-1 pode influenciar a rede de interação celular e sua liberação. Assim, poderia atuar na fase inflamatória do processo e, conseqüentemente, em um grau mais avançado, a desmielinização da medula espinhal. Deste modo, foi realizado a quantificação de IL-4, IL-10, IL-2 e seu receptor (IL-2R), IL-12p70, INF- γ e TNF- α no sobrenadante de cultura de células mononucleares. Apesar da dicotomia Th1/Th2 não estar estabelecida nas infecções retrovirais, alguns estudos levam em consideração a possibilidade do HTLV-1 promover um desbalanço.

Os sobrenadantes foram analisados para quantificar a produção espontânea e induzida pela PHA. A produção de IL-4, IL-10 e IL-12 p70 não foi alterada nos diferentes grupos. A IL-10 inibe a função dos macrófagos e estes passam a produzir menor quantidade de IL-12, que é um estímulo crítico para a secreção de INF- γ . A IL-4 apresenta uma capacidade de inibir a produção de IL-12, que atua, primeiramente, na estimulação de células T CD4⁺ do tipo Th1, liberando altas concentrações de INF- γ , e ao mesmo tempo, ocorre a inibição de IL-10. Com estes dados, a produção de INF- γ não sofre baixa regulação pela IL-4 ou IL-10, esses resultados foram semelhantes ao estudo de GEROSA et al. (1996). Nossos resultados mostraram diminuição na produção de IL-4 (após estímulo com o mitógeno PHA), polarização da resposta para o padrão Th1, caracterizada pelo aumento da secreção de IL-2 e INF- γ nos pacientes infectados pelo HTLV-1. Esses dados estão de acordo com a literatura onde a IL-4 inibe a expressão celular de IL-2 e INF- γ nas células humanas (SCHWARZ et al., 1993). Deste modo, sugere-se que há polarização para o padrão Th1 nos pacientes infectados pelo HTLV-1.

Não houve alteração significativa na produção de IL-12 p70. Entretanto, houve uma tendência de diminuição desta citocina nos pacientes com TSP/HAM. Deste modo, é provável que ocorreu um consumo da IL-12 pelas células que passaram a produzir INF- γ nos pacientes com TSP/HAM. A IL-12 é umas das principais citocinas que promove a regulação Th1, principalmente na indução de INF- γ , pela sinalização intracelular via STAT4. Ao mesmo tempo, a baixa produção

de INF- γ induz a produção de IL-12 das APC, mostrando sua importância na infecção de HTLV-1 (GATELY et al., 1998; SINIGAGLIA et al., 1999; NAKAMURA et al., 2000; FUJIMOTO et al., 2002). Fujimoto et al. (2002) investigaram a expressão de IL-12 com as células T CD4⁺ e demonstraram que nos pacientes com TSP/HAM ocorreu uma desregulação da IL-12/IL-12R. Talvez esse seja um mecanismo alternativo que possa explicar o aumento de INF- γ na infecção pelo HTLV-1 assintomáticos.

Apesar da presença de TNF- α ser considerado agressivo aos componentes do sistema nervoso, não foi notada a modificação de sua produção nos pacientes com HTLV-1. O TNF- α poderia ser uma das citocinas principais na patogênese da TSP/HAM, com sua atividade envolvida na desmielinização (GOON et al. 2003), porém nossos achados não levam nessa direção.

A produção de IL-2 apresentou aumento no indivíduo assintomático em relação ao controle. Porém, na TSP/HAM, os níveis de IL-2 permanecem normais. Isso sugeriu que a IL-2 não foi responsável pela proliferação espontânea presente dos linfócitos nos pacientes com TSP/HAM (dados não mostrados) (OLAH et al., 2007).

A proliferação espontânea de células T está intimamente relacionada à infecção pelo HTLV-1 e é provável que os percursos autócrinos e/ou parácrinos não estejam envolvidos com o sistema da IL-2 e o seu receptor (IL-2R) (LI et al., 1990). De fato, é provável que a proliferação de células T seja decorrente de fatores IL-2 independentes. Nossos resultados, em relação a IL-2 e seu receptor, concordam com esses achados e, possivelmente, sejam consequência da produção de IL-15 (WALDMANN, 2002).

Embora neste trabalho, não avaliamos a resposta específica a proteína Tax e/ou sua atividade intracelular, que está intimamente relacionada com a proliferação celular. Em pesquisa sobre o fator que leva a proliferação celular no HTLV-2, a Tax demonstrou ser essencial (KONDO et al., 2006). A proteína Tax foi correlacionada como um dos mecanismos cruciais que distingue a patogênese entre o HTLV-1 e HTLV-2. Outros elementos são sugeridos para explicar como as proteínas virais podem, continuamente, ativar os receptores de IL-2. As células

infectadas pelo HTLV-1, em conjunto com as proteínas do envelope na membrana celular, podem ativar receptores não específicos nas células não infectadas (HÖLLSBERG, 1999; LANDO et al., 1983; KOHTZ et al., 1988).

Desta forma, sabe-se que a proteína Tax apresenta função parecida com a IL-2 e IL-2R, sua expressão anormal pode desencadear ação inflamatória. Vários estudos têm demonstrando a importância da Tax, sendo um dos fatores fundamentais para o desenvolvimento da TSP/HAM (HANON et al., 2001; DING et al., 2003).

Em conclusão, a produção de IL-2 e IL-2R nos pacientes com TSP/HAM, estariam atuando, diretamente, como uma proteína pró-inflamatória nas células do SNC. A imunomodulação destas citocinas, em conjunto com INF- γ , promoveria a agressão direta ou indireta sobre as células localizadas na medula espinhal. Assim, a auto-regulação de IL-2, resulta no direcionamento das células T ativadas, contribuindo para a proliferação celular. O receptor de IL-2 (IL-2R) e a possível presença de IL-15, poderia atuar no mecanismo autócrino dessas citocinas (CD25, IL-2 e IL-15).

O INF- γ é considerado neurotóxico, pois atua juntamente com o TNF- α e, conseqüentemente, ocasionando a lesão neuronal. Deste modo, estudamos o papel do INF- γ na patogênese da TSP/HAM. Os nossos resultados indicaram que a produção de INF- γ está aumentada, nos indivíduos infectados pelo HTLV-1 assintomáticos, e, em maior grau nos casos de TSP/HAM. Esses dados demonstraram que a produção de INF- γ está alterada mais precocemente que a produção de IL-2. Um dos mecanismos envolvido no aumento da produção de INF- γ seria a ação da proteína tax que induz diretamente a sua regulação (SHARMA et al., 2002), assim como é mediado pela produção de IL-12 (GEROSA et al., 1996). Hanon et al. (2001), demonstraram que a expressão da proteína Tax do HTLV-1 está associada com a produção de INF- γ em proporções significativas nas células infectadas. A ativação celular e a espontânea produção de INF- γ , associada com a expressão da Tax, deve ser o fator que leva a transativação dos efeitos intracelulares desta proteína como um agressivo gene celular (HANON et al., 2001).

Uma cinética de IL-1ra, IL-1 β , IL-5, IL-13, TNF- α e INF- γ a partir de cultura celular estimulada pela PHA foi realizada pela técnica da PCR em tempo real (STORDEUR et al., 2002a). Esse grupo de pesquisa indicou que o INF- γ induziu um acúmulo da expressão de mRNA da IL-10 em monócitos humanos (STORDEUR et al., 2002b). Este refinamento poderia proporcionar maior sensibilidade e especificidade em estudos da TSP/HAM, onde se supõe que a base etiopatogênica de origem imunológica.

Em estudo das vias de sinalização e da proteína Tax, revelaram que as células T CD4⁺ produtoras de INF- γ não expressaram tax na superfície celular (MITRE et al., 2003). Deste modo, a produção de INF- γ ocorreu em resposta à infecção HTLV-1 e não diretamente, pela expressão da proteína Tax (MITRE et al., 2003). Em outro estudo, mostrou que os caminhos de sinalização p38 MAPK estão envolvidos na regulação da expressão de INF- γ , e com a carga proviral dos pacientes com TSP/HAM (FUKUSHIMA et al., 2005). Assim, fica sugerido que novas pesquisas, envolvendo as vias de sinalização intracelular, poderiam ser realizadas para relacionar com a elevada carga proviral nos pacientes com TSP/HAM.

De fato, o INF- γ , possui capacidade de inibir e ativar a destruição da célula infectada pelo HTLV-1. Porém, na TSP/HAM devido ao longo tempo e ao constante dano, o INF- γ levaria a uma lesão na membrana mielina, após muitos anos (30-40 anos) de infecção. Assim, essa ativação crônica poderia contribuir para o desenvolvimento da mielopatia, caso o portador vivesse tempo suficiente, todos os portadores de HTLV-1 poderiam desenvolver a TSP/HAM. Entretanto, outros fatores do hospedeiro, como HLA, ou relacionados ao vírus (carga proviral ou subtipo de tax), devem estar envolvidos no prognóstico da infecção (NAGAI et al., 1998; FURUKAWA et al., 2000, NAGAI et al., 2001).

Quatorze amostras de líquido de pacientes com TSP/HAM foram estudadas, e não houve detecção das citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias estudadas (Anexo 5). Em estudo recente, foi demonstrada detecção de INF- γ e IL-12, no soro e no LCR de pacientes com TSP/HAM (FUJIMOTO et al., 2002). A não detecção destas citocinas do LCR pode ter ocorrido devido a problemas técnicos,

mas, o mais provável, seja o acondicionamento, a demora no processamento ou mesmo no congelamento das amostras. A detecção de citocinas no LCR proporcionaria um entendimento do padrão da resposta imunológica, e poderia mostrar fatores envolvidos na migração de linfócitos T do sangue periférico para os tecidos, favorecendo a cronicidade da infecção pelo HTLV-1.

Vários estudos estão sendo focalizados no papel citolítico das células T CD8⁺, como sendo mediadoras da TSP/HAM (JACOBSON, 2002, NAGAI et al., 1998). Os principais fatores solúveis, produzidos pelas células T CD8⁺, são as β -quimiocinas, responsáveis pela quimiotaxia das células inflamatórias. Estas apresentaram importantes ações em infecções virais, como proteção, imunoregulação e ativação do sistema imune, promovendo o tráfico de células para o local da infecção. Outro fator de grande importância é a mediação direta de efeitos antivirais bloqueando a infecção (BERGER et al., 1997; COCCHI et al., 1995).

Devido à ausência de trabalhos envolvendo RANTES e HTLV-1, um dos poucos estudos, relatou experiência envolvendo macacos vacinados. A produção das β -quimiocinas foi associada à liberação de INF- γ como resposta para proteínas do HIV-1 e SIV, levando a uma proteção contra a infecção experimental nesses animais (AHMED et al., 2002).

Portanto, os pacientes com TSP/HAM apresentaram aumento nos níveis de RANTES e INF- γ , indicando uma relação direta com a resposta do padrão Th1. Na infecção pelo HIV-1, a alta produção de RANTES pode ser responsável pela baixa carga viral do HIV-1 (COCCHI et al., 1995). A hiper-estimulação celular que ocorre na TSP/HAM oferece um cenário único para determinar características das quimiocinas "in vivo". Um estudo com paciente co-infectado pelo HTLV-2 e HIV-1 mostrou que houve um aumento de IL-6 e TNF- α (CASOLI et al., 2000), indicando que os mecanismos indiretos do desequilíbrio são decorrentes da ação de β -quimiocinas, em particular a MIP-1 α . Lewis et al. (2000) sugeriram que a proteína Tax poderia ser um fator que induziria a expressão de C-C quimiocinas, em nível de transcrição, e é provável que esta indução seja mediada por diferentes precursores, como observado em pacientes infectados pelo HTLV-2 (LEWIS et al.,

2000). Até o momento, nosso estudo foi pioneiro sobre quimiocinas e infecção pelo HTLV-1 ao nosso conhecimento (Anexo 3).

Surpreendente, não houve alteração da produção de MIP-1 β nos grupos estudados. Isso, talvez ocorra pelo fato, desta quimiocina ser liberada pelos monócitos (OPPERMANN, 2004), que não são importantes no desenvolvimento da TSP/HAM. Em contraste, a RANTES e MIP-1 α são produzidas principalmente pelas células T CD8⁺, que atuam diretamente no processo inflamatório da medula espinhal do indivíduo (ROT and ANDRIAN, 2004).

Entretanto, os receptores de quimiocinas CXCR3 expressos em linfócitos ativados e de memória, respondem a algumas citocinas, inclusive o INF- γ , podendo migrar para a medula espinhal, promovendo os danos na membrana de mielina (TREBST et al., 2003; GUERREIRO et al., 2006). Assim, a resposta envolvendo INF- γ , em consequência das CTL e a ação de RANTES e MIP-1 α , atuando como fatores quimiotáticos, produzidos pelas células T CD8⁺, estariam envolvidos no desenvolvimento da TSP/HAM.

Os fatores solúveis pró-inflamatórios (RANTES e MIP-1 α) podem estar mediando o recrutamento de leucócitos para os tecidos e de células T, que resultou no dano da medula espinhal, originando da TSP/HAM. Isso estaria sendo específico com a RANTES, que induz a hiperfosforilação intracelular e as ativações celulares, importantes na agressão na membrana de mielina. A ativação celular promovida pelas quimiocinas, através das CCR5, conduz a ativação de quinases locais, importantes na mobilidade celular, propagação e migração dessas células (BACON et al., 1996; GANJU et al., 1999). Os ligantes da CCR5 são importantes na proliferação celular e na ativação de genes transcripcionais das citocinas (OPPERMANN, 2004). Isso pode estar envolvido no desenvolvimento da ATL, desde que quantificaram RANTES nesses pacientes (MORI et al., 2004) e um estudo "in vitro" mostrou o caminho conduzido pela Tax na estimulação de MIP-1 α (SHARNA & MAY, 1999).

Atualmente a análise do líquido dos pacientes com TSP/HAM e esclerose múltipla, revelou que os níveis elevados de CCL2/MCP-1 na TSP/HAM seguida da terapia com INF- α e que a CXCL10/IP-10 apresentou níveis elevados (NARIKAWA

et al., 2005). Peterson et al. (2004) descreveram que as MCP-1 protegeram os neurônios da ativação do processo de apoptose em camundongos. Assim, as quimiocinas podem controlar a migração celular para o SNC, e favorecer uma autoregulação nos mecanismos das retrovíroses que induzem danos neurológicos.

Em resumo, a carga proviral do HTLV-1 é fundamental para a progressão da TSP/HAM. Assim, portadores com alta carga proviral estão em constante estímulo, através da atividade da proteína Tax, e ativando, a liberação de INF- γ e outras quimiocinas pró-inflamatórias. Com isso, a membrana de mielina sofreria uma constante agressão, com processos inflamatórios, culminando com o desenvolvimento da TSP/HAM.

O fator principal de nosso estudo foi à presença de elevados níveis de INF- γ , sendo a principal citocina responsável pela ativação do sistema imune nos indivíduos com infecção pelo HTLV-1. Os pacientes com TSP/HAM apresentaram, espontaneamente, altos níveis de citocinas, do padrão Th1, mostrando que a presença do HTLV-1 pode iniciar a excessiva produção da resposta imune, o que contribui para a progressão da doença. Entretanto, esta resposta pode ser a principal causa de agressão das células gliais e nos axônios da medula espinhal, como foi notado nos pacientes com TSP/HAM.

Assim, a infecção pelo HTLV-1 e a progressão para a TSP/HAM envolvem, provavelmente, a resposta citotóxica e a supressora, contra a presença de antígeno do HTLV-1. A presença de elevada quantidade de INF- γ , RANTES e MIP-1 α , fazem o papel de auto-reguladoras, iniciando a estimulação das células T, o processo inflamatório e conseqüente dano na membrana de mielina, principal característica do aparecimento da mielopatia nos pacientes infectados pelo HTLV-1.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÕES

1. Os pacientes com TSP/HAM apresentaram elevada produção de INF- γ em comparação ao grupo HTLV-1 assintomático. Deste modo, INF- γ pode ser o principal responsável pela agressão da membrana de mielina;
2. Não observamos alterações nos níveis basais e estimulados por PHA nos diversos grupos de IL-4, IL-12p70 e IL-10;
3. A dosagem de RANTES e MIP-1 α apresentou significativa produção nos pacientes portadores de HTLV-1; sugerindo ser um marcador de progressão para TSP/HAM;
4. A IL-2 não deve estar envolvida na linfoproliferação celular espontânea observada nos indivíduos infectado pelo HTLV-1;
5. A análise da carga proviral longitudinal revelou estabilidade e até mesmo diminuição nos indivíduos assintomáticos e com TSP/HAM;
6. A carga proviral é mais sensível nas CMN procedentes do líquido quando comparada com a encontrada nas CMN do sangue periférico;

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

8 REFERÊNCIA

AHMED, R.; BIRON, C. A. Immunity to viruses. In: *Fundamental Immunology*, Fourth Edition, ed by **William E Paul**, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1295-1334, 1999.

AHMED, R. K. et al. Spontaneous production of RANTES and antigen-specific INF-gamma production in macaques vaccinated with SHIV-4 correlates with protection against SIVsm challenge. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 129, n. 1, p. 11-18, 2002.

AKIZUKI, S. et al. Necropsy findings in htlv-i associated myelopathy. **Lancet**, v. 329, n. 8525, p. 156-157, 1987.

AKIZUKI, A. H. et al. Dysautonomia in human T-cell lymphotropic vírus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Annual of Neurology**, v. 50, p. 681-685, 2001.

ARAÚJO, A.; SILVA, M. T. T. Neurologic manifestations of HTLV-10infection. In: Roos KL. (ed). **Principles of Neurologic Infectious Diseases**, McGraw-Hil, New York, p. 137-149, 2005.

AYE, M. M. et al. Histopathological análisis of tour autopsy cases of HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: inflammatory chances occur simultaneously in the central nervous system. **Acta Neuropathology**, v. 100, p. 245-252, 2000.

AZIMI, N.; NAGAI, M.; JACOBSON, S.; WALDMANN, T. A. IL-15 plays a major role in the persistence of Tax-specific CD8⁺ cells in TSP/HAM patients.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A., v 98, p. 14559-14564, 2001.

BACON, K. B. et al. RANTES induces tyrosine kinase activity of stably complexed p125FAK and ZAP-70 in human T cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 184, p. 873-882, 1996.

BACON, K. et al. Chemokine/chemokine receptor nomenclature. **Journal of Interferon Cytokine Research.**, v. 22. p. 1067-1068, 2002.

BALLARD, D. W. et al. HTLV-1 tax induces cellular proteins that activate the kB element in the IL-2 receptor alpha gene. **Science**, v. 241, p.1652-1655, 1988.

BEIMLING, P.; MOELLING, K. Direct interaction of CREB protein with 21 bp Tax-response elements of HTLV-1 LTR. **Oncogene**, v. 7, p. 257-262, 1992.

BERGER, J. R. Myelopathy and coinfection with HIV and HTLV-1. **Neurology**, v. 49, p. 1190-1191, 1997.

BILLIAU, A.; DIJKMANS, R. Interferon-gamma: mechanism of action and therapeutic potential. **Biochem Pharmacology**, v. 40, p. 1433-1439, 1990.

BLATTNER, W. A. et al. The human type-C retrovirus, HTLV, in blacks from the Caribbean region, and relationship to adult T-cell leukemia/lymphoma. **International Journal of Cancer**, v. 30. p. 257-264, 1982.

CALATTINI, S. et al. Discovery of a new human T-celllymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. **Retrovirology**, v. 2, p. 31-34, 2005.

CANN, A. J.; CHEN, I. S. Y. Human T-cell leukemia virus types I and II. In: **Fields Virology** (ed. BN Fields, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath

TP, Roizman B, Straus SE) eds. Fields virology, Vol 59. Philadelphia: Raven Publishers, p. 1849-1939. 1996.

CANTRELL, D. A.; SMITH, K. A. The Interleukin-2 T-cell system: a new cell growth model. **Science**, v.224, p.1312-1316, 1984.

CASOLI, C. et al. HTLV-II down-regulates HIV-1 replication in IL-2 stimulated primary PBMC of coinfecting individuals through expression of MIP-1 α . **Blood**. v. 95, p. 2760, 2000.

CASSEB, J. et al. Lack of tax diversity for tropical spastic paraparesis/human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-I) associated myelopathy development in HTLV-I-infected subjects in São Paulo, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 273-276, 2006.

CASSEB, J. et al. T CD4⁺ cells count among patients co-infected with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1): high prevalence of tropical spastic paraparesis/HTLV-1-associated myelopathy (TSP/HAM). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 49, p. 231-233, 2007.

CASTRO-COSTA, C. M. et al. Neuropathology of the Brazilian autopsied cases of tropical spastic paraparesis/human T-cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy (TSP/HAM) of long evolution. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 60, p. 531-536, 2002;

CASTRO-COSTA, C. M. et al. Proposal for diagnostic criteria of tropical spastic paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy (TSP/HAM). **AIDS Res Hum Retroviruses (AIDS research and human retroviruses)**, v.22, p. 931-935, 2006.

COCCHI, F. et al. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 β as the major HIV-suppressive factors produced by CD8⁺ T cells. **Science**, v. 270, p. 1811-1815, 1995.

COCCHI, F. et al. Higher macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha and MIP-1 β levels from CD8⁺ T cells are associated with asymptomatic HIV-1 infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, v. 97(25), p. 13812-13817, 2000.

COFFIN JM. Retroviridae: the viruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM (Ed.). **Fields Virology**. 3^a edition. Philadelphia: Raven Publishers. V. 2, p. 1767-1847, 1996.

COPELAND, T. F. K.; HEENEY, I. J. T Helper cell activation and Human Retroviral Pathogenesis . **Microbiological Reviews**, v. 151, p. 722-742, 1996.

COSTA, C. M. et al. Tropical spastic paraparesis in Northeastern Brazil. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 47, p.134-138, 1989.

DAENKE, S. et al. High activated and memory cytotoxic T-cell responses to HTLV-1 in healthy carriers and patients with tropical spastic paraparesis. **Virology**, v. 217, p. 139-146, 1996.

DERSE, D.; HEIDECKER, G. Forced entry-or does HTLV-1 have the key?. **Science**, v. 299 (5613), p.1670-1671, 2003.

DING, W. et al. Human T-cell lymphotropic virus type 1 p12I enhances interleukin-2 production during T-cell activation. **Journal Virology**, v. 77, p. 11027-11039, 2003.

ELLISON, D. et al. *Neuropathology: A reference text of CNS pathology*. Mosby, London, 1998.

FANTRY, L. et al. Immunodeficiency and elevated CD4 lymphocytes counts in two patients coinfecting with human immunodeficiency virus and human lymphotropic virus type I. **Journal of Infection Diseases**, v. 21, p. 1466-1468, 1995.

FENG, J. et al. INF-alpha significantly reduces cerebrospinal fluid CD4 cell subsets in HAM/TSP. **Journal of Neuroimmunology.**, v. 141, p. 170-173, 2003.

FERREIRA. J. O. C.; PLANELLES, V.; ROSENBLATT, J. D. Human T-cell leukemia viruses: epidemiology, biology, and pathogenesis. **Blood**, v. 11, p. 91-104, 1997.

FRANCHINI, G. Molecular mechanisms of HTLV-1. **Blood**, v. 86, p. 1619-1639, 1995.

FUJIMOTO, T. et al. Up-regulation of interleukin-12 receptor expression in peripheral blood mononuclear cells of patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Journal of NeuroSciences**, v, 196, p. 21-26, 2002.

FURUKAWA, Y. et al. Phylogenetic subgroups of human T cell lymphotropic virus (HTLV) type I in the tax gene and their association with different risks for HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Journal Infectious Diseases**, v. 182, p. 1343-1349, 2000.

FURUKAWA, Y. et al. Different cytokines production in tax-expressing cells between patients with human T-cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis and asymptomatic HTLV-1 carriers. **Journal Infectious Diseases**, v. 187, p. 1116-1125, 2003.

FURUYA, T. et al. Human T-cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy associated with multi-organ inflammatory disease: a case report. **Journal of the Neurological Science**, v. 157, p. 109-112, 1998.

FUKUSHIMA, N. et al. Involvement of p38 MAPK signaling pathway in IFN-gamma and HTLV-I expression in patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 159, p. 196-202, 2005.

GANJU, R. K. et al. Beta-chemokine receptor CCR5 signals via the novel tyrosine kinase RAFTK. **Blood**, v. 91, p. 791-797, 1999.

GARCIA-VALLEJO, F.; DOMINGUEZ, M. C.; TAMAYO, O. Autoimmunity and molecular mimicry in tropical spastic paraparesis/human T-lymphotropic virus-associated myelopathy. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 241-250, 2005.

GATELY, D. P. et al. Characterization of ATM expression, localization, and associated DNA-dependent protein kinase activity. **Molecular biology of the cell**, v. 9 (9), p. 2361-2374, 1998.

GEROSA, F. et al. Interleukin-12 primes human CD4 and CD8 T cells clones for high production of both interferon- γ and interleukin-10. **The journal of experimental medicine**, v. 183, p. 2559-2569, 1996.

GESSAIN, A.; GOUT, O. Chronic myelopathy associated with human T-lymphotropic virus type I (HTLV-1). **Annals of Internal Medicine**, v. 117, p. 933-946, 1992.

GESSAIN, A.; GALLO, R.; FRANCHINI, G. Low degree of human T-cell leukemia/lymphoma virus type I genetic drift in vivo as a means of monitoring viral

transmission and movement of ancient human populations. **Journal of Virology**, v. 66, p. 2288-2293, 1992.

GESSAIN, A. et al. Antibodies to human T-lymphotropic virus type I in patient with tropical spastic paraparesis. **Lancet**, v. 2, p. 407-410, 1985.

GESSAIN, A. et al. Epidemiology and immunovirology of human T-cell leukemia/lymphoma virus type I-associated adult T-cell leukemia and chronic myelopathies as seen in France. **Cancer Research**, v. 50 (17), p. 5692-5696, 1990.

GESSAIN, A. et al. High human T-cell lymphotropic virus type I proviral DNA load with polyclonal virus type I proviral DNA load with polyclonal integration in peripheral blood mononuclear cells of French West Indian, Guianese, and African patients with tropical spastic paraparesis. **Blood**, v. 75, p.1031-1034, 1990.

GOGOY, A. J. et al. Allolymphocytotoxic antibodies in sera from HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients--putative anti-HLA antibodies. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 125, p. 62-69, 1994.

WYCUFF, D. R.; GOFF, M. D.; MARRIOTT, S. J. Identification of an initiator-like element within the HTLV-I promoter. **Virology**, v. 280, n. 1, p. 72-79, 2001.

GOMES, I. et al. Human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) infection in neurological patients in Salvador, Bahia, Brazil. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 165, n. 1, p. 84-89, 1999.

GOON, P. K. 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.

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

GRANDVAUX, N. et al. The interferon antiviral response: from viral invasion to evasion. **Current Opinion in Infection Diseases**, v. 15, p. 259-267, 2002.

GRANT, C. et al. HTLV-1 and neurologic disease: events in bone marrow, peripheral blood, and central nervous system during normal immune surveillance and neuroinflammation. **Journal of Cellular Physiology**, v. 190, p. 133-159, 2002.

GREENBERG, S. J. et al. Molecular analysis of HTLV-1 proviral integration and T-cell receptor arrangement indicates that T-cells in tropical spastic paraparesis are polyclonal. **Journal of Infection Diseases**, v. 159, p. 741-744, 1989.

GREENE, W. C. et al. Trans-activator gene of HTLV-1 induces IL-2 receptor and IL-2 cellular gene expression. **Science**, v. 232, p. 877-880, 1986.

GREENE, W. C. et al. The trans-regulatory proteins of HTLV-1: Analysis of tax and rex. In: BLATTNER, W.A.; **Human Retrovirology: HTLV-1**, New York, Raven Press, 35-43, 1990.

GREENE, W. C.; BOHNLEIN, E.; BALLARD, D. W. HIV-1, HTLV-1 and T-cell growth: transcriptional strategies and surprises. **Immunology Today**, v. 10, p. 272-277, 1989.

GRETEN, T. F. et al. Direct visualization of antigen-specific T cells: HTLV-1 Tax11-19-specific CD8(+) T cells are activated in peripheral blood and accumulate in cerebrospinal fluid from HAM/TSP patients. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, v. 95, p. 7568-7573. 1998.

GUERREIRO, J. B. et al. Levels of serum chemokines discriminate clinical myelopathy associated with human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) disease from HTLV-1 carrier state. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 145, p. 296-301, 2006.

HALL, W. W. et al. Human T cell lymphotropic virus type II (HTLV-II): emergence of a important newly recognized pathogen. **Seminars in Virology**, v. 5, p. 165-178, 1994.

HAMASAKI, S. et al. Resistance of CD4-positive T lymphocytes to etoposide-induced apoptosis mediated by upregulation of Bcl-xL expression in patients with HTLV-I-associated myelopathy. **Journal of Neuroimmunology**, v.117, p. 143-148, 2001.

HANON, E. et al. Abundant Tax protein expression in CD4+ T-cells infected with HTLV-1 is prevented by cytotoxic T lymphocytes. **Blood**, v. 95, p. 1386-1392, 2000.

HANON, E. et al. High production of interferon γ but not IL-2 by human T-lymphotropic virus type I-infected peripheral blood mononuclear cells. **Blood**, v. 98, p. 721, 2001.

HARA, H. Autoimmune mechanism in HAM/TSP. **Nippon Rinsho.**, v. 2, p. 2919-2925, 1994.

HASELTINE, W. A.; SODROSKI, J. G.; PATARCA, R. Structure and function of the genome of HTLV. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 115, p. 177-209, 1985.

HASHIMOTO, K. et al. Quantitative in situ PCR assay of HTLV-1 infected cells in peripheral blood lymphocytes of patients with ATL, HAM/TSP and asymptomatic carriers. **Journal of Neurological Sciences**, v. 159, p. 67-72, 1998.

HEMOMIMAS. HTLV. Volume XIII. 4. edição. 2006

HENRY, B. J. Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais. Edit. Manole. 18^a edição, 1995.

HOFFMAN, P. M. et al. Human T-cell leukemia virus type I infection of monocytes and microglial cells in primary human cultures. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, v. 89, p. 11784-11788, 1992.

HOLLSBERG, P.; HAFLER, D. What is the pathogenesis of human T-cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis? **Annals Neurological**, v. 37, p. 143-145, 1995.

HÖLLSBERG, P. Mechanisms of T-cell activation by human T-cell lymphotropic virus type I. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 63, p. 308, 1999.

HINUMA, Y. et al. Adult T cell leukemia: antigen in an ATL cell line and detection of the antigen in human sera. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, v. 78, p. 6476-6480, 1981.

HORWITZ, M. S. et al. Primary demyelination in transgenic mice expressing interferon-gamma. **Nature Medicine**, v. 3, p. 1037-1041, 1997.

IGAKURA, T. et al. Spread of HTLV-1 between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. **Science**, v. 299, p. 1713-1716, 2003.

IWASAKI, Y. Human T cell leukemia virus type I infection and chronic myelopathy. **Brain Path.**, v. 3, p. 1-10, 1993.

IJICHI, S.; OSAME, M. Human T-cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP): recent perspectives. **Internal Medicine**, v. 34, p. 713-721, 1995.

IJICHI, S. et al. Activated T lymphocytes in cerebrospinal fluid of patients with HTLV-I-associated myelopathy (HAM/TSP). **Journal Neuroimmunol**, v. 25, p. 251-254, 1989.

IJICHI, S. et al. HAM/TSP: recent perspectives in Japan. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology**, v. 13, p. 26-32, 1996.

IWASAKI, Y. et al. Widespread active inflammatory lesions in a case of HTLV-1-associated myelopathy lasting 29 years. **Acta Neuropathology**, v. 108, p. 456-551, 2004.

IZUMO, S. et al. INF-alpha is effective in HTLV-1-associated myelopathy: a multicenter, randomized, double-blind, controlled trial. **Neurology**, v. 46, p. 1016-1021, 1996.

JACOBSON, S. et al. Isolation of HTLV-I like retrovirus from patients with TSP. **Nature**, v. 331, p. 540-543, 1988.

JACOBSON, S. Immunopathogenesis of human T cell lymphotropic virus type I-associated neurologic disease. **Journal of Infection Diseases**, v. 186, p. 187-192, 2002.

JACOBSON, S. et al. Circulating CD8+ cytotoxic T lymphocytes specific for HTLV-I pX in patients with HTLV-I associated neurological disease. **Nature**, v. 348, p. 245-248, 1990.

JEFFERY, K. J. M. et al. HLA alleles determine human T-lymphotropic virus-I (HTLV-10 proviral load and the risk of HTLV-1 associated myelopathy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, v. 96, p. 3848-3853, 1999.

JOHNSON, J. M.; FRANCHINI, G. Retroviral proteins that target the major histocompatibility complex class I. **Virus Research**, v. 88, p. 119-127, 2002.

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

JOHNSON, R. T. Viral infections of the nervous system. 2nd ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, 1998.

KALUME, F. et al. Molecular mimicry: cross reactivity antibodies from patients with immune-mediated neurologic disease inhibit neuronal firing. **Journal of Neurosciences Research**, v. 77, p. 82-89, 2004.

KAMIHIRA, S. et al. Significance of HTLV-1 proviral load quantification by real-time PCR as a surrogate marker for HTLV-1-infected cell count. **Clinical and Laboratory Haematology**, v. 26, p. 111-117, 2003.

KAPLAN, J. E. et al. Male-to-female transmission of human T-cell lymphotropic virus types I and II: association with viral load. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology**, v. 12, p. 193-201, 1996.

KATZEN, D. et al. Mechanism of human T cell response to mitogens : IL-2 induces IL-2 receptor expression and proliferation but not IL-2 synthesis in PHA stimulated T cells. **Journal of Immunology**, v. 135, p. 1840, 1995.

KITZE, B. et al. Human CD4+ T lymphocytes recognize a highly conserved epitope of human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) env gp21 restricted by HLA DRB1*0101. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 111, p. 278-285, 1998.

KOWALA-PIASKOWSKA, A. et al. Influence of the presence of HCV-RNA in peripheral blood mononuclear cells on the clinical course of chronic hepatitis C in children. **Eur JOURNAL Epidemiol.** v.22, p. 343-348, 2007.

KOENIG, S. et al. Characterization of MHC class I restricted cytotoxic T cell responses to tax in HTLV-1 infected patients with neurologic disease. **Journal of Immunology**, v. 156, p. 3874-3883, 1993.

KOHTZ, D. S. et al. Immunological and structural homology between human T-cell leukemia virus type I envelope glycoprotein and a region of human interleukin-2 implicated in binding the beta receptor. **Journal of Virology**, v. 62, p. 659-662, 1988.

KONDO, R. et al. Human T-cell leukemia virus type 2 Tax protein induces IL-2 growth in a T-cell line. **Retrovirology**, v. 3, p. 88, 2006.

KUBOTA, R. et al. Flutuation of HTLV-1 proviral DNA in peripheral blood mononuclear cells of HTLV-1-associated myelopathy. **Journal of Neuroimmunology**, v. 42, p. 147-154, 1993.

KUBOTA, R. et al. Degenerate specificity of HTLV-1-specific CD8+ T cells during viral replication in patients with HTLV-1 associated myelopathy (HAM/TSP). **Blood**, v. 101, p. 3074-3081, 2003.

KWAAN, N. et al. Long-term variations in human T lymphotropic virus (HTLV)-I and HTLV-II proviral loads and association with clinical data. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 194, p. 1557-1564, 2006.

LANDO, Z. et al. Association of human T-cell leukemia/lymphoma virus with the Tac antigen marker for the human T-cell growth factor receptor. **Nature**, v. 305, p. 733-736, 1983.

LANOIX, T. et al. Overproduction of NF- κ B2 (I κ B) and c-Rel: a mechanism for HTLV-1 tax-mediated trans-activation via the NF- κ B signaling pathway. **Oncogene**, v. 9, p. 841, 1994.

LEE, J. S. et al. Profiles of INF- γ and its regulatory cytokines (IL-12, IL-18 and IL-10) in peripheral blood mononuclear cells from patients with multidrug-resistant tuberculosis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 128, p. 516-524, 2002.

LEE, T. H. et al. Quantitation of HTLV-1 and II proviral load using real-time quantitative PCR with Sybr Green chemistry. **Journal of Clinical Virology**, v. 31, p. 375-382, 2004.

LEE, S. M. et al. HTLV-1 induced molecular mimicry in neurological disease. **Current Topical Microbiology and Immunology**, v. 296, p. 125-136. 2005.

LENZI, M. E. R. et al. Dermatological findings of human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-I)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Clinical of Infections Diseases**, v. 36, p. 507-513, 2003.

LEZIN, A. et al. Human T lymphotropic virus type I (HTLV-1) proviral load in cerebrospinal fluid: a new criterion for the diagnosis of HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis? **Journal of Infections Diseases**, v. 191, p. 1830-1834, 2005.

LEVIN, M. C.; JACOBSON, S. HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP): a chronic progressive neurologic disease associated with immunologically mediated damage to the central nervous system. **Journal Neurovirology**, v. 3, p. 126-140, 1997.

LEVIN, M. C. et al. Autoimmunity due to molecular mimicry as a cause of neurological disease. **Nature Medicine**, v. 8, p. 509-513, 2002.

LEWIS, M. J. et al. Spontaneous production of C-C chemokines by individuals infected with human T lymphotropic virus type II (HTLV-II) alone and HTLV-II/HIV-1 coinfecting individuals. **Journal of Immunology**, v. 165, p. 4127-4132, 2000.

LI, Q. et al. Immunological abnormalities in HTLV-1-associated myelopathy: spontaneous release of interleukin-2 and interleukin-2 receptor by peripheral blood lymphocytes. **Japanese Journal Medicine**, v. 29, p. 487, 1990.

MANNS, A. et al. Human leukocyte antigen class 11 alleles associated with human T-cell lymphotropic virus type 1 infection and adult T-cell leukemia/lymphoma in a black population. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, p. 617-622, 1998.

MANNS, A. et al. Quantative proviral DNA and antibody levels in the natural history of HTLV-1 infection. **Journal of Infections Diseases**, v. 180, p. 1487-1493, 1999.

MANEL, N. et al. Glut-1 is the receptor of retrovirus HTLV. **Medicine and Sciences**, v. 20, p. 277-279, 2004.

MANEL, N. et al. The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV. **Cell**, v. 115, p. 449-459, 2003.

MARTINS-CASTRO, L. H. et al. HTLV-1 associated myelopathy in Brazil; a preliminary report. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 47, p. 501-502, 1989.

MASTERS, J. et al. Poxvirus infection rapidly activates tyrosine kinase signal transduction. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, p. 48371-48375, 2001.

MATSUZAKI, T. et al. HTLV-1 proviral load correlates with progression of motor disability in HAM/TSP: analysis of 239 HAM/TSP patients including 64 patients followed up for 10 years. **Journal of Neurovirology**, v. 7, p. 228-234, 2001.

MCGIRR, K. M.; BUEHURING, G. C. Tax & Rex: overlapping of the Deltaretrovirus group. **Virus Gene**, v. 32, p. 229-239, 2006.

MELO, A.; GOMES, I.; MATTOS, K. Mielopatias por HTLV-I na cidade de Salvador, Bahia. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 52, p. 320-325, 1994.

MELLORS, J. W. et al. Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. **Annals of Internal Medicine**, v. 126, p. 946-954, 1997.

MENNA-BARRETO, M. et al. HTLV-1 associates myelopathy in Porto Alegre (southern Brazil). **Arquivo de Neuropsiquiatria**, v. 53, p. 771-776, 1995.

MESNARD, J. M.; DEVAUX, C. Multiple control levels of cell proliferation by human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein. **Virology**, v. 257, p. 277-284, 1999.

MITRE, E. Majority of interferon-gamma-producing CD4+ cells in patients infected with human T cell lymphotropic virus do not express tax protein. **The Journal of infectious diseases**, v. 188, p. 428-432. 2003.

MONTANHEIRO, P. et al. HTLV-1 proviral DNA viral load among asymptomatic patients and patients with TSP/HAM. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 1643-1647, 2005.

MONTANHEIRO, P. et al. High production of RANTES and MIP-1 α in the tropical spastic paraparesis/HTLV-1-associated myelopathy (TSP/HAM). **Journal Neuroimmunology**. 2007.

MOREIRA JR, E. D. et al. Seroepidemiology of human T-cell lymphotropic virus type I/II in Northeastern Brazil. **Journal of AIDS**, v. 6, p. 959-663, 1993.

MORI, N. et al. Elevated expression of CCL5/RANTES in adult T-cell leukemia cells: possible transactivation of the CCL5 gene by human T-cell leukemia virus type I tax. **International Journal of Cancer**, v. 111, p. 548-557, 2004.

MOSLEY, A. J.; ASQUITO, B.; BANGHAM, C. R. Cell-mediated immune response to HTLV-1. **Viral Immunology**, v. 18, p. 293-305, 2005.

MURPHY, E. L. et al. Higher human T lymphotropic virus (HTLV) provirus load is associated with HTLV-1 versus HTLV-1I, with HTLV-1I subtype A versus B, and with male sex and a history of blood transfusion. **The journal of infectious diseases**, v. 190, p. 504-510, 2004.

MURPHY, E. L. et al. Modeling the risk of adult T-cell leukemia/lymphoma in persons infected with human T lymphotropic virus type I. **International Journal of Cancer**, v. 43, p. 250-253, 1989.

NAGAI, M. et al. Analysis of HTLV-1 proviral load in 202 HAM/TSP patients and 243 asymptomatic HTLV-1 carriers: high proviral load strongly predisposes to HAM/TSP. **Journal of NeuroVirology**, v. 4, p. 586-593, 1998.

NAGAI, M. et al. Differential effect of TGF-beta 1 on the in vitro activation of HTLV-1 and the proliferative response of CD8+ T lymphocytes in patients with HTLV-1-associated myelopathy (HAM/TSP). **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 77, p. 324-331, 1995.

NAGAI, M.; JACOBSON, S. Immunopathogenesis of human T cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy. **Current Opinion in Neurology**, v. 14, p. 381-386, 2001.

NAGAI, M. et al. Increased HTLV-1 proviral load and preferential expansion of HTLV-1 Tax-specific CD8+ T cells in cerebrospinal fluid from patients with HAM/TSP. **Annals of Neurology**, v. 50, p. 807-812, 2001.

NAGAI, M. et al. CD8+ T cells are in vivo reservoir for human T cell lymphotropic virus type I. **Blood**, v. 98, p. 1858-1861, 2000.

NAGAI, M.; OSAME, M. Pathogenesis and treatment of human T-cell lymphotropic virus type-I-associated myelopathy. **Experimental Reviews Neurotherapy**, v. 2, p. 89-97, 2002.

NAGAI, M.; OSAME, M. Human T-cell lymphotropic virus type I and neurological diseases. **Journal of Neurovirology**, v. 9, p. 228-235, 2003.

NAKAGAWA, M. et al. Therapeutic trial in 200 patients with HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Journal of Neurovirology**, v. 2, p. 345-355, 1996.

NAKAMURA, T. et al. Importance of immune deviation toward Th1 in the early immunopathogenesis of human T-lymphotropic virus type I-associated myelopathy. **Medicine Hypotheses**, v. 54, p. 777-782, 2000.

NAKAO, K. M.; OHBA, N.; MATSUMOTO, M. Noninfectious anterior uveitis in patients infected with human T-cell lymphotropic virus type I. **Ophthalmology**, v. 33, p. 472-481, 1989.

NAN, X.; CROSS, S.; BIRD, A. Gene silencing by methyl-CpG-binding proteins. **Novartis Foundation Symposium**, v. 214, p. 46-50, 1998.

NARIKAWA, K. et al. CSF-chemokines in HTLV-I-associated myelopathy: CXCL10 up-regulation and therapeutic effect of interferon-alpha. **Journal of Neuroimmunology**, v.159, p. 177-182, 2005.

NEJMEDDINE, M. et al. HTLV-1 Tax protein triggers microtubule reorientation in the virological synapse. **The Journal of biological chemistry**, v. 1, p. 10, 2005.

NEVA, F. A. et al. Interferon-gamma and interleukin-4 responses in relation to serum IgE levels in persons infected with human T lymphotropic virus type I and *Strongyloides stercoralis*. **Journal of Infections Diseases**, v. 178, p. 1856-1859, 1998.

NIEWIESK, S.; BANGHAM, C. R. Evolution in a chronic RNA virus infection: selection on HTLV-1 tax protein differs between healthy carriers and patients with tropical spastic paraparesis. **Journal of Molecular Evolution**, v. 42, p. 452-458, 1996.

NISHIURA, Y. et al. Increased mRNA expression of Th1-cytokine signaling molecules in patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **The Tohoku journal of experimental medicine**, v. 204, p. 289-298, 2004.

OLAH, I. et al. Patterns of in vitro lymphoproliferative responses among HTLV-I-infected subjects: Up regulation by HTLV-I during HIV-1 co-infection. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 65, p. 577-580, 2007.

OLINDO, S. et al. HTLV-1 proviral load in peripheral blood mononuclear cells quantified in 100 HAM/TSP patients: a marker of disease progression. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 237, p. 53-59, 2005.

OLIVA, A. et al. Natural killer cells from human immunodeficiency virus (HIV)-infected individuals are an important source of CC-chemokines and suppress HIV-1 entry and replication in vitro. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 102, p. 223-31, 1998.

OPPERMANN, M. Chemokine receptor CCR5: insights into structure, function, and regulation. **Cellular Signaling**, v.16, p. 1201-1210, 2004.

OSAME, M. et al. HTLV-1-associated myelopathy: a new clinical entity. **Lancet**, v. 1, p. 1031-1032, 1985.

OSAME, M. Mielopatía asociada con el HTLV-1 (HAM/PET) en Japón. In: Zaninovic V, Galindo J, Blank A. (ed) Enfermedades asociadas con el virus HTLV-1. Fundación MAR. Cali, Colombia, p. 87-96, 1992.

OSAME, M. Pathological mechanisms of human T-cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy (HAM/TSP). **Journal of Neurovirology**, v. 8, p. 359-364, 2002.

OSAME, M. Review of WHO Kagoshima Meeting and Diagnostic Guidelines for HAM/TSP. In: BLATTNEY, W.A, ed. **Human Retrovirology: HTLV**. New York, Raven Press, p. 191-197, 1990.

OSAME, M. The past, the present and the future of HAM/TSP research. XI International Conference on Human Retrovirology: HTLV. Kagoshima, Japan. 1999.

OVERBAUGH, J. HTLV-1 sweet-talks its way into cells. **Nature Medicine**, v. 10, p. 20-21, 2004.

PACA-UCCARALERTKUN, S. et al. In vitro selection of DNA elements highly responsive to the human T-cell lymphotropic virus type I transcriptional activator Tax. **Molecular and Cellular Biology**, v. 14, p. 456-462, 1994.

PETERSON, K. E. et al. MCP-1 and CCR2 contribute to non-lymphocyte-mediated brain disease induced by Fr98 polytropic retrovirus infection in mice: role for astrocytes in retroviral neuropathogenesis. **Journal of Virology**, v. 78, p. 6449-6458, 2004.

PICCARDO, P. et al. Pathological and immunological observations on tropical spastic paraparesis in patients from Jamaica. **Annals of Neurology**, v. 23, p. 156-160, 1988.

POIESZ, B. J. et al. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A., v. 77, p. 7415-7419, 1980.

POIESZ, B. J. The HTLV cell surface receptor. **Cancer Investigation**, v. 20, p. 154-155, 2002.

PORTER, K. R. et al. Immune response against the exp-1 protein of *Plasmodium falciparum* results in antibodies that cross-react with human T-cell lymphotropic virus type 1 proteins. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 5, p. 721-724, 1998.

RIMSKY, L. et al. Functional replacement of the HIV-1 rev protein by the HTLV-1 rex protein. **Nature**, v. 335, p. 738-740, 1988.

RODGERS, J. P. et al. HTLV-I and HTLV-III antibodies and tropical spastic paraparesis. **Lancet**, v. 2, p. 1247-1248, 1985.

RODGERS-JOHNSON, P. E. B. et al. Tropical spastic paraparesis and HTLV-I myelopathy: clinical features and pathogenesis. In: Walksman BH (ed). Immunologic mechanisms in neurologic and psychiatric disease. Raven Press, New York, p. 117-130, 1990.

ROGGERO, R. et al. Binding of human immunodeficiency virus type 1 gp120 to CXCR4 induces mitochondrial transmembrane depolarization and cytochrome c-mediated apoptosis independently of Fas signaling. **Journal of Virology**, v. 75, p. 7637-7650, 2001.

ROSENBLUM, W. I.; BREW, B. J.; HAHN, B. Human T-lymphotropic virus type I associated myelopathy in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. **Human Pathology**, v. 23, p. 513-519, 1992.

ROSSI, D.; ZLOTNIK, A. The biology of chemokines and their receptors. **Annuals Reviews of Immunology**, v. 18, p. 217-242, 2000.

SAAG, M. S. et al. HIV viral load markers in clinical practice. **Nature Medicine**, v. 2, p. 625-629, 1996.

SABOURI, A. H. et al. Polymorphism in the interleukin-10 promoter affects both provirus load and the risk of human T lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Journal of Infection Diseases**, v. 190, p. 1279-1285, 2004.

SABOURI, A. H. et al. Differences in viral and host genetic risk factors for development of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis between Iranian and Japanese HTLV-1-infected individuals. **Journal of General Virology**, v. 86, p. 773-781, 2005.

SAITO, M. et al. A polymorphism of vitamin D receptor gene is associated with susceptibility to HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in HTLV-1 infected individuals. **Journal of Neurological Sciences**, v. 232, p. 29-35, 2005.

SAKAI, J. A. et al. In vitro spontaneous lymphoproliferation in patients with human T-cell lymphotropic virus type I-associated neurologic disease: predominant expansion of CD8⁺ T-cells. **Blood**, v. 98, p. 1506-1511, 2001.

SATOH, M. et al. Reduced efficacy of treatment of strongyloidiasis in HTLV-1 carriers related to enhanced expression of INF- γ and TGF- β 1. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 127, p. 354-359, 2002.

SCHUPBACH, J. Human Retrovirology. Facts and concepts. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 142, p. 1-27, 1989.

SCHWARZ, E. M.; SALGAME, P.; BLOOM, B. R. Molecular regulation of HTLV-2 and T-cell function by interleukin 4. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, v. 90, p. 7734-7738, 1993.

SEIKI, M. et al. Human adult T-cell leukemia virus complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, v. 80, p. 3618-3622, 1983.

SHARMA, S. et al. Regulation of IFN regulatory factor 4 expression in human T cell leukemia virus-I-transformed T cells. **Journal of Immunology**, v. 169, p. 3120-3130, 2002.

SHARMA, V.; MAY, C. C. Human T-cell lymphotropic virus type-I tax gene induces secretion of human macrophage inflammatory protein-1alpha. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 262, p. 429-432, 1999.

SHIMAMOTO, Y. et al. Increased production of interferon-gamma but not interleukin-4 in human T-lymphotropic virus type I carriers. **International Journal of Hematology**, v. 64, p. 11-18, 1996.

SILVA, M. T. T. Complexo neurológico do HTLV-I: caracterização clínica e carga proviral nas diversas manifestações neurológicas associadas ao vírus. Tese de doutorado. Universidade Federal Fluminense. Niterói, 2006.

SINIGAGLIA, F. et al. Regulation of the IL-12/IL-12R axis: a critical step in T-helper cell differentiation and effector function. **Immunological Reviews**, v. 170, p. 65-72, 1999.

SODROSKI, J. The human T-cell leukemia virus (HTLV) transactivator (tax) protein. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1114, p. 19-29, 1992.

STORDEUR, P. (A). et al. Cytokine mRNA quantification by real-time PCR. **Journal Immunological Methods**, v. 259, p. 55-64, 2002.

STORDEUR, P. (B); ZHOU, L.; GOLDMAN, M. Analysis of spontaneous mRNA cytokine production in peripheral blood. **Journal Immunological Methods**, v. 261, p. 195-197, 2002.

SUZUKI, T. et al. Transactivator Tax of human T-cell leukemia virus type I binds to NF- κ B p50 and serum response factor (SRF) and associates with enhancer DNAs of the NF- κ B site and CarG box. **Oncogene**, v. 8, p. 2391, 1993.

TAKENOUCI, N. et al. Usefulness of proviral load measurement for monitoring of disease activity in individual patients with T-lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Journal of Neurovirology**, v. 9, p. 29-35, 2003.

TAKENOUCI, N. et al. GLUT 1 is not the primary binding receptor but is associated with cell-cell transmission of HTLV-1. **Journal of Virology**, v. 81, p. 1506-1510, 2007.

TAYLOR, G. P. Pathogenesis and treatment of HTLV-1 associated myelopathy. **Sex Transmission**, v. 74, p. 316-322, 1998.

TAYLOR, G. P. et al. Zidovudine plus lamivudine in Human T-Lymphotropic Virus type-I-associated myelopathy: a randomised trial. **Retrovirology**, v.19, p. 63, 2006.

TENDLER, C. L. et al. Cytokine induction in HTLV-1 associated myelopathy and adult T-cell leukemia: alternate molecular mechanisms underlying retroviral pathogenesis. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 46, p. 302-311, 1991.

TOSSWILL, J. H. C. et al. Quantification of proviral DNA load in human T-cell leukaemia virus type I infections. **Journal of virological methods**, v. 75, p. 21-26, 1998.

TREBST, C. et al. Chemokine receptors on infiltrating leucocytes in inflammatory pathologies of the central nervous system (CNS). **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 29, p. 584-595, 2003.

UCHIYAMA, T. Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-1) and human diseases. **Annals Reviews Immunology**, v. 15, p. 15-37, 1997.

UMEHARA, F. et al. Immunocytochemical analysis of the cellular infiltrate in the spinal cord lesions in HTLV-I-associated myelopathy. **Journal of neuropathology and experimental neurology**, v. 52, p. 424-430, 1993.

UMEHARA, F. et al. . Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in HTLV-I-associated myelopathy. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 57,p. 839-849, 1998.

UMEHARA, F. et al. Expression of adhesion molecules and monocyte chemoattractant protein -1 (MCP-1) in the spinal cord lesions in HTLV-1-associated myelopathy. **Acta Neuropathology**, v. 91, p. 343-350, 1996.

URETA-VIDAL, A. et al. Human T-cell leukemia virus Type I (HTLV-I) infection induces greater expansions of CD8 T lymphocytes in persons with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis than in asymptomatic Carriers.

Journal Infection Diseases, v. 183, p. 857-864, 2001.

USUKU, K. et al. HLA haplotype-linked high immune responsiveness against HTLV-1 in HTLV-1-associated myelopathy: comparison with adult T-cell leukemia/lymphoma. **Annals of Neurology**, v. 23, p. 143-150, 1988.

VIDAL, A. U. et al. The phylogenetic classification of human T cell leukaemia/lymphoma virus type I genotypes in five major molecular and geographical subtypes. **Journal of General Virology**, v. 75, p. 3655-3666, 1994.

VINE, A. M. et al. Polygenic control of human T lymphotropic virus type I (HTLV-1) provirus load and the risk of HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Journal of Infection Diseases**, v. 186, p. 932-939, 2002.

YOSHIE, O. Lymphocyte subsets and chemokine receptors. Tanpakushitsu kakusan koso. **Protein, nucleic acid, enzyme**, v. 47, p. 16, 2006.

WALDMANN, T. A. The IL-2/IL-15 receptor systems: targets for immunotherapy. **Journal of Clinical Immunology**, v. 22, p. 51-56, 2002.

WATANABE, A. et al. HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis accompanied with psoriasis. **Journal Neurological Science**, v. 221, p. 95-97, 2004.

WATANABE, T. HTLV-I associated diseases. **International Journal of Hematology**, v. 66, p. 257-278, 1997.

WOLFE, N. D. et al. Emergence of primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, v. 102, p. 7994-7999, 2005.

WU, E. et al. Neuroaxonal dystrophy in HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: neuropathologic and neuroimmunologic correlations. **Acta Neuropathology**, v. 86, p. 224-235, 1993.

XU, X.; HEIDENREICH, O.; NEWENBERG, M. HAM/TSP and ATL: persistent paradoxes and new hypotheses. **Journal Neurovirology**, v. 2, p. 60-69, 1996.

YEO, W. et al. Hepatitis B viral load predicts survival of HCC patients undergoing systemic chemotherapy. **Hepatology**, v. 45, p. 1382-1389, 2007.

YOSHIDA, M. et al. Increased replication of HTLV-1 in HTLV-1-associated myelopathy. **Annals of Neurology**, v. 26, p. 331-335, 1989.

YOSHIE, O. et al. Frequent expression of CCR4 in adult T-cell leukemia and human T-cell leukemia virus type 1-transformed T cells. **Blood**, v. 99, p. 1505, 2002.

YOSHIOKA, A. et al. Neuropathological studies of the spinal cord in early stage HTLV-1-associated myelopathy (HAM). **Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry**, v. 56, p. 1004-1007, 1993.

YOSHIDA, M. et al. Monoclonal integration of human T-cell leukemia provirus in all primary tumors of adult T-cell leukemia suggests causative role of human T-cell leukemia virus in the disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, v. 81, p. 2534-2537. 1984.

ANEXO

9 ANEXOS

ANEXO 1 TERMO DE CONSENTIMENTO

Prevalência e seguimento de indivíduos portadores de infecção pelo HTLV-1 e HTLV-2 no Instituto de Infectologia “Emílio Ribas”, SP

Os investigadores-principais desse estudo são Dr. Jorge Casseb e Dr. Augusto César Penalva, que são médicos do Instituto de Infectologia Emílio Ribas. Esse estudo é em colaboração com o Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica-LIM-56/FMUSP, SP.

Proposta

Você está sendo convidado a participar em uma pesquisa médica. O propósito desse estudo é determinar o perfil imunológico (células T – defesa do organismo em infecções) e a carga proviral dos vírus HTLV-1 e 2 em indivíduos com risco para adquirir retrovirose, e a possibilidade do desenvolvimento de doenças associadas a estes vírus. Os resultados deste estudo proporcionarão uma melhor compreensão da evolução clínica do vírus HTLV-1 e do HTLV-2 entre os pacientes de nosso país, visto que a maioria dos estudos sobre esse assunto foram realizados no exterior.

Procedimentos

1. Uma coleta de sangue (aproximadamente 10 ml) foi obtida dos indivíduos participantes do Projeto;
2. As amostras de sangue foram utilizadas imediatamente, para técnicas de separação das células mononucleares (células brancas do sangue). Os soros/plasmas foram estocados em freezer -70 C até a realização dos exames. Deixamos claro que, se o paciente recusar/desistir de participar do estudo, as amostras foram descartadas.

3. Foram realizados testes de triagem para os vírus HTLV-1 e HIV-1. Os indivíduos soronegativos para ambos os vírus, foram convidados a participar da pesquisa, como grupo controle (HTLV-1 e HIV-1 negativos).

4. Uma ou duas vezes por ano (cada visita medica), sera realizada nova coleta sanguinea, para o acompanhamento longitudinal do vírus e do perfil imunológico do paciente.

Aspectos Éticos

Caso você se recuse a participar ou desista da pesquisa, isso de modo algum acarretará prejuízo no seu atendimento no Instituto de Infectologia “Emílio Ribas”.

Riscos

Essa pesquisa não envolverá qualquer adicional risco ou desconforto além de uma coleta de sangue de rotina. Essa coleta poderá ser realizada durante procedimento de rotina, de acordo com seu acompanhamento clinico.

Confidencialidade

Toda informação obtida a partir das fichas médicas ou os resultados dos testes laboratoriais foram codificados. Todos os dados foram tabulados em códigos, sem a identificação do nome dos pacientes.

Aspectos Financeiros

A participação na pesquisa e voluntária e não envolverá qualquer custo adicional para o participante ou qualquer remuneração especial para o mesmo.

Perguntas

Caso você tenha qualquer pergunte ou dúvida sobre o estudo, por favor pergunte-nos. Caso você tenha qualquer pergunta após essa entrevista, nós ficaremos satisfeitos em respondê-las. Dr. Jorge Casseb pode ser localizado no telefone 3061 5633 ramal 270 ou no número 3066 7194.

Nós pedimos que assine essa ficha para confirmar que você foi informado sobre o projeto e sobre os direitos de indivíduos voluntários e que você consente que os investigadores tenham acesso ao seu prontuário médico.

Você ficará de posse de uma cópia assinada e datada desse documento.

SUA ASSINATURA ABAIXO INDICARÁ QUE VOCÊ DECIDIU SER VOLUNTÁRIO EM UMA PESQUISA, QUE VOCE CONSENTE QUE OS INVESTIGADORES TENHAM ACESSO AO SEU PRONTUÁRIO MÉDICO E QUE VOCÊ TEM INFORMAÇÃO SOBRE SEUS DIREITOS.

COLAR ETIQUETA

Nome completo: _____

Assinatura: _____

Data: ____ / ____ / ____

Investigador: _____

Assinatura: _____

Data: ____ / ____ / ____

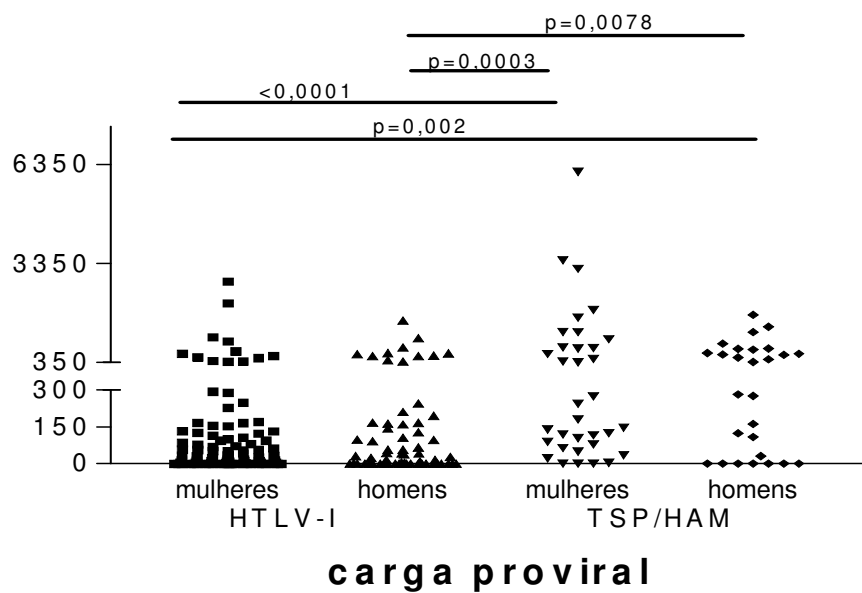
Grupo que foi adicionado (após o teste de triagem para HTLV-1 e HIV-1):

- () grupo controle HTLV-1 e HIV-1 NEGATIVO
- () grupo HTLV-1 assintomático (sem doença)
- () grupo com TSP/HAM (Com desenvolvimento da doença)
- () grupo HIV-1
- () grupo co-infectado HTLV-1/HIV-1.

ANEXO 2 ARTIGO PUBLICADO DE CARGA PROVIRAL DO HTLV-1

**ANEXO 3. ARTIGO DE QUIMIOCINAS PUBLICADO NO JOURNAL
NEUROIMMUNOLOGY**

ANEXO 4. CARGA PROVIRAL DO HTLV-1 (HOMENS E MULHERES)

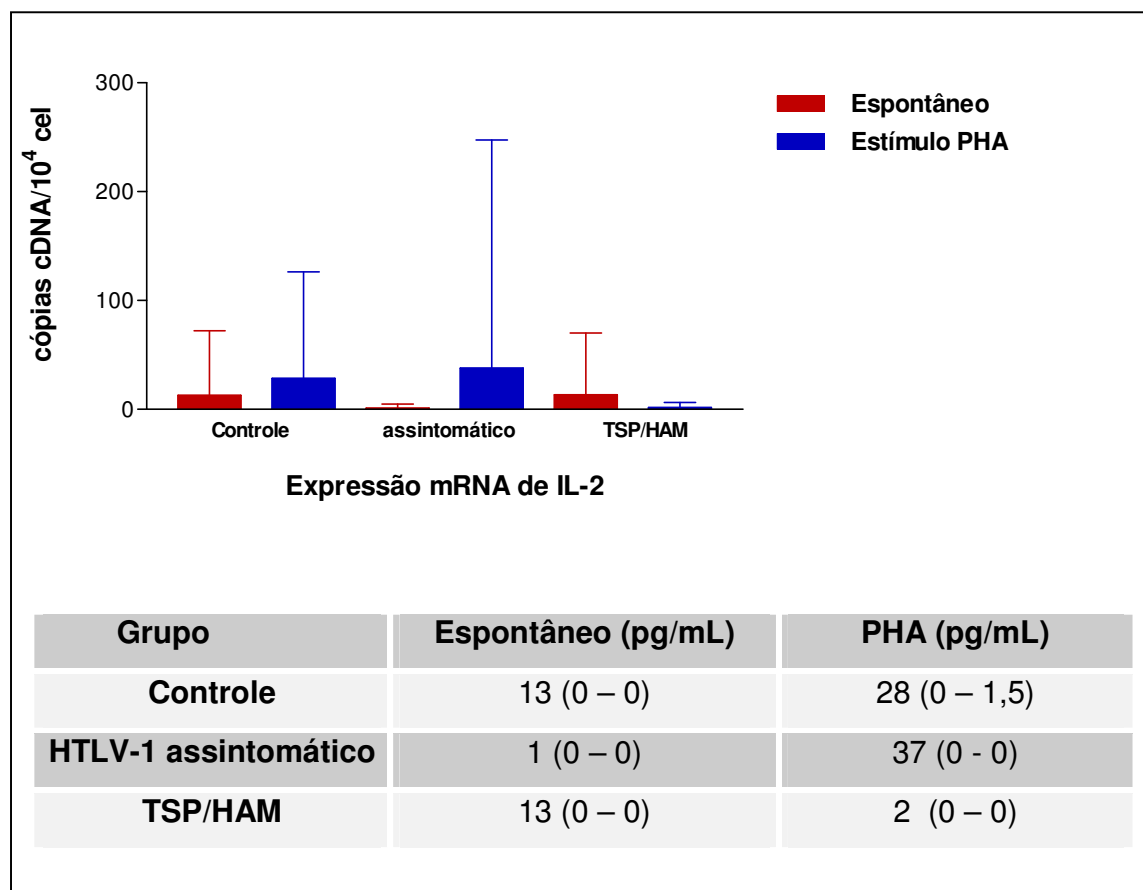


ANEXO 5. DOSAGEM DE QUIMIOCINA E CITOCINAS NO LIQUOR DE PACIENTES TSP/HAM

	IL-2	IL-4	IL-10	IL-12	INF- γ	TNF- α	MIP-1 β	MIP-1 α	RANTES
1	0	0	--	0	0	0	0	0	--
2	0	0	--	0	0	0	0	0	--
3	0	7	--	10	0	0	0	0	--
4	0	10	--	0	0	0	0	0	--
5	0	1	--	0	0	0	0	0	--
6	0	0	--	0	0	0	0	0	--
7	0	143	--	0	0	0	0	0	--
8	0	42	--	0	0	0	0	0	--
9	0	7	--	0	0	0	0	0	--
10	0	0	--	0	0	0	0	0	--
11	0	23	--	0	0	0	0	0	--
12	0	14	--	0	0	0	0	0	--
13	0	20	--	0	0	0	0	0	--
14	0	3	--	0	0	0	0	0	--

Tabela. Dosagem de citocinas e quimiocinas no líquido de pacientes com TSP/HAM. Onde: (--) não foi realizado o ensaio de ELISA, e os valores estão em pg/ml.

ANEXO 6 . GRÁFICO DA EXPRESSÃO DE mRNA DE IL-2.



Expressão de mRNA de IL-2 dos grupos controle, HTLV-1 assintomático e TSP/HAM pela PCR em tempo real. Valores em média e percentil 25-75%.