



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
**Instituto de Ciências Biológicas**

**Prevalência de auto-anticorpos contra antígenos celulares em  
pacientes com infecção pelos vírus da dengue e vírus linfotrópico  
de células T humanas, HTLV – 1 e 2**

**CARLOS DAVID ARAÚJO BICHARA**

Belém-Pará  
2009

CARLOS DAVID ARAÚJO BICHARA

PREVALÊNCIA DE AUTO-ANTICORPOS CONTRA ANTÍGENOS  
CELULARES EM PACIENTES COM INFECÇÃO PELOS VÍRUS DA  
DENGUE E VÍRUS LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T HUMANAS,  
HTLV – 1 e 2

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.  
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Ishak.

Belém-Pará  
2009

Bichara, Carlos David Araújo

Prevalência de auto-anticorpos contra antígenos celulares em pacientes com infecção pelos vírus da Dengue e vírus linfotrófico de células T humanas, HTLV - 1/2, Belém-Pará, 2009, 97 p, Dissertação de Mestrado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

1.FAN 2.Auto-anticorpos 3. HTLV. 4. Dengue

**CARLOS DAVID ARAÚJO BICHARA**

**PREVALÊNCIA DE AUTO-ANTICORPOS CONTRA ANTÍGENOS  
CELULARES EM PACIENTES COM INFECÇÃO PELOS VÍRUS DA  
DENGUE E VÍRUS LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T HUMANAS,  
HTLV – 1e 2**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infeciosos e Parasitários, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Biologia de Agentes Infeciosos e Parasitários.

Orientador:

---

Prof. Dr. Ricardo Ishak  
Instituto de Ciências Biológicas / UFPA

Banca Examinadora:

---

Profa. Dra. Marluísa de O. Guimarães Ishak  
Instituto de Ciências Biológicas / UFPA

---

Prof. Dr. Antonio Carlos R. Vallinoto  
Instituto de Ciências Biológicas / UFPA

---

Prof. Dr. Juarez Antonio Simão Quaresma  
Núcleo de Medicina Tropical / UFPA

---

Profa. Dra. Maristela Gomes da Cunha (Suplente)  
Instituto de Ciências Biológicas / UFPA

Belém, 26 de novembro de 2009

*“Acredito que o trabalho é amor em movimento. Tenho a impressão de que, se mais pessoas encarassem o trabalho e a vida desta forma, seriam capazes de maiores realizações.”*

*Papa João XXIII*

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais (*in memoriam*), meu eterno agradecimento por tudo que me proporcionaram na grandeza de vossas existências. Permitiram que brotassem em mim atitudes que só são possíveis quando há um exemplo maior a ser seguido. A vocês, que mesmo na humildade, dedicaram toda uma vida na condução correta e digna, do caminho de seus filhos.

A Cléa, Carlos David e Carla, pelo compartilhamento dos nossos sonhos, o que sempre me fortaleceu diante às dificuldades.

Aos meus irmãos, pelos inesquecíveis dias da infância, com muitas histórias para contar, que ainda ecoam na minha memória emocional

## **AGRADECIMENTOS**

Meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram com este importante momento de minha vida, tornando possível a conclusão deste trabalho, em especial:

A Deus, por acreditar que nossa existência pressupõe outra infinitamente superior.

Ao amigo e orientador, Prof. Dr. Ricardo Ishak, pelo incentivo, auxílio, disponibilidade e segurança que me foi dada em todas as etapas da elaboração desta pesquisa.

Às amigas Rosimar Neris Martins e Lucinda Assunção Gustavo Souza, pela contribuição nas diversas fases de execução deste trabalho.

Aos amigos Isabella e Alberto Amaral, pelo incondicional apoio em todos os momentos necessários a construção deste sonho. Vocês são pessoas muito importantes nas minhas conquistas.

Ao amigo e Prof. Dr. Manuel Ayres, grande exemplo de vida para todos nós, que sempre me incentivou e disponibilizou seu valioso tempo para as minhas consultas estatísticas.

Ao colega Geraldo Macedo pelas contribuições e disponibilidade sempre que necessário.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, que com conhecimento e dedicação viabilizam a formação qualificada de profissionais para a região amazônica, contribuindo com o desenvolvimento do Estado do Pará.

Aos amigos da “Turma de Pós-Graduação do BAIP”, que compartilharam este período de vida tão gratificante, me acolheram e incentivaram, amenizando as dificuldades, superando-as todos juntos.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS E QUADROS</b> .....	vi
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	xi
<b>RESUMO</b> .....	xiii
<b>ABSTRACT</b> .....	xiv
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 DOENÇA AUTO-IMUNE, HIPERSENSIBILIDADE E AUTOTOLERÂNCIA....	1
1.2 RELAÇÃO VÍRUS-HOSPEDEIRO E RESPOSTA INFLAMATÓRIA .....	2
1.3 O VÍRUS LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T HUMANAS (HTLV) .....	4
<b>1.3.1 Biologia, Epidemiologia e Patogenia</b> .....	4
<b>1.3.2 Diagnóstico Laboratorial da Infecção pelo HTLV</b> .....	9
1.4 O VÍRUS DA DENGUE .....	10
<b>1.4.1 Biologia, Epidemiologia e Patogenia</b> .....	10
<b>1.4.2 Diagnóstico Laboratorial da Infecção pelo Vírus da Dengue</b> .....	15
1.5 AUTO-ANTICORPOS .....	19
<b>1.5.1 O Fator Anti-Nuclear (FAN)</b> .....	19
<b>1.5.2 Principais marcadores da resposta inflamatória (auto-anticorpos) já descritos e sua importância</b> .....	23
1.5.2.1 Principais padrões de fluorescência encontrados em células HEp-2 .....	25
1.6 OBJETIVOS .....	48

1. 6.1 <b>Objetivo Geral</b> .....	48
1. 6.2 <b>Objetivos Específicos</b> .....	48
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	49
2.1 GRUPOS POPULACIONAIS ESTUDADOS .....	49
<b>2.1.1 Pacientes com diagnóstico clínico e laboratorial de HTLV 1 e 2</b> .....	49
<b>2.1.2 Pacientes com diagnóstico laboratorial para o vírus da dengue</b> .....	50
<b>2.1.3 Grupo não infectado</b> .....	50
2.2 PRECEITOS ÉTICOS .....	50
2.3 COLETA DE MATERIAL .....	51
2.4 MÉTODO LABORATORIAL.....	51
<b>2.4.1 Técnica da pesquisa de auto-anticorpos anti-nucleares (FAN) em células HEp-2</b> .....	51
2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
<b>3. RESULTADOS</b> .....	53
3.1 CARACTERÍSTICAS DOS GRUPOS EXAMINADOS.....	53
3.2 PREVALÊNCIA DE AUTO-ANTICORPOS CONTRA ANTÍGENOS CELULARES ENTRE INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO VD .....	54
3.3 PREVALÊNCIA DE AUTO-ANTICORPOS CONTRA ANTÍGENOS CELULARES ENTRE INDIVÍDUOS INFECTADOS PELOS HTLV 1 E 2.....	58
3.4 CORRELAÇÃO DA PREVALÊNCIA DE AUTO-ANTICORPOS CONTRA ANTÍGENOS CELULARES ENTRE INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO VD E HTLV 1 e 2.....	64

<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	66
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	76
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	77
<b>ANEXOS</b>	

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

<b>Tabela 1</b> – Distribuição dos grupos populacionais estudados de acordo com o sexo.....	53
<b>Tabela 2</b> – Distribuição por faixa etária do grupo de pessoas infectadas pelo HTLV 1 e 2.....	54
<b>Tabela 3</b> – Distribuição dos indivíduos examinados de acordo com a espécie de VD infectante.....	54
<b>Tabela 4</b> – Prevalência de auto-anticorpos de acordo com o padrão em pessoas infectadas pelo Vírus da dengue e grupo controle .....	55
<b>Tabela 5</b> – Prevalência de ANA, de acordo com o sexo, em pessoas infectadas pelo VD.....	56
<b>Tabela 6</b> – Distribuição dos padrões de ANA de acordo com o sexo, no grupo de indivíduos infectados pelo VD .....	57
<b>Tabela 7</b> – Prevalência de ANA, de acordo com a espécie de VD infectante .....	57
<b>Tabela 8</b> – Distribuição dos padrões de ANA de acordo com a espécie de VD Infectante... ..	58
<b>Tabela 9</b> – Distribuição de indivíduos examinados de acordo com o tipo de HTLV Infectante... ..	58
<b>Tabela 10</b> – Distribuição de indivíduos infectados pelos HTLV 1 e 2, de acordo com as manifestações clínicas.....	59
<b>Tabela 11</b> - Distribuição de prevalência de acordo com o padrão de ANA em	

indivíduos HTLV 1 e 2 e Grupo controle .....	59
<b>Tabela 12</b> – Distribuição da prevalência de ANA, de acordo com o sexo, em pacientes infectados pelo HTLV 1 e 2.....	60
<b>Tabela 13</b> - Distribuição dos padrões de ANA de acordo com o sexo, em indivíduos infectados pelo HTLV 1 e 2.....	60
<b>Tabela 14</b> – Distribuição da prevalência de ANA de acordo com o tipo do HTLV infectante... ..	62
<b>Tabela 15</b> - Distribuição dos padrões de ANA de acordo com o tipo do HTLV Infectante... ..	62
<b>Tabela 16</b> – Distribuição de ANA, entre indivíduos infectados pelos HTLV 1 e 2, de acordo com a presença de sintomas .....	63
<b>Tabela 17</b> – Distribuição de ANA, entre indivíduos infectados pelos HTLV 1 e 2, de acordo com de acordo com as manifestações clínicas .....	63
<b>Tabela 18</b> – Correlação da prevalência de ANA entre indivíduos dos três grupos estudados.....	64
<b>Tabela 19</b> – Correlação da prevalência de padrão de ANA entre indivíduos com infecção pelo VD e HTLV 1 e 2.....	65
<b>Quadro 1</b> – Padrões de FAN mistos e relevâncias clínicas mais frequentes .....	25
<b>Quadro 2</b> – Padrões de FAN e relevâncias clínicas mais frequentes.....	26

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação esquemática de padrões nucleares .....	29
Figura 2 - Padrão de FAN do tipo membrana nuclear.....	30
Figura 3 - Padrão de FAN do tipo homogêneo .....	30
Figura 4 - Padrão de FAN do tipo pontilhado pleomórfico .....	31
Figura 5 - Padrão de FAN do tipo pontilhado, pontos isolados mais que dez pontos .....	32
Figura 6 - Padrão de FAN do tipo pontilhado, pontos isolados menos que dez pontos .....	32
Figura 7 - Padrão de FAN do tipo pontilhado grosso .....	32
Figura 8 - Padrão de FAN do tipo pontilhado grosso reticulado.....	33
Figura 9 - Padrão de FAN do tipo pontilhado fino .....	33
Figura 10 - Padrão de FAN do tipo pontilhado centromérico .....	34
Figura 11 - Padrão de FAN do tipo pontilhado fino denso .....	34
Figura 12 - Classificação esquemática de padrões nucleolares .....	35
Figura 13 - Padrão de FAN do tipo nucleolar homogêneo .....	36
Figura 14 - Padrão de FAN do tipo nucleolar aglomerado .....	36
Figura 15 - Padrão de FAN do tipo nucleolar pontilhado .....	37
Figura 16 - Classificação esquemática dos padrões citoplasmáticos .....	37
Figura 17 - Padrão de FAN do tipo citoplasmático fibrilar linear .....	38
Figura 18 - Padrão de FAN do tipo citoplasmático fibrilar filamentar .....	38
Figura 19 - Padrão de FAN do tipo citoplasmático fibrilar segmentar .....	39

Figura 20 - Padrão de FAN do tipo citoplasmático pontilhado polar .....	40
Figura 21 - Padrão de FAN do tipo citoplasmático pontilhado com pontos isolados.....	40
Figura 22 - Padrão de FAN do tipo citoplasmático pontilhado fino denso .....	41
Figura 23 - Padrão de FAN do tipo citoplasmático pontilhado fino .....	41
Figura 24 - Padrão de FAN do tipo citoplasmático pontilhado reticulado .....	42
Figura 25 - Classificação esquemática de padrões do aparelho mitótico .....	42
Figura 26 – Padrão de FAN do tipo centríolo .....	43
Figura 27 - Padrão de FAN do tipo ponte intercelular .....	43
Figura 28 – Padrão de FAN do tipo aparelho mitótico - NuMa 1 .....	44
Figura 29 - Padrão de FAN do tipo aparelho mitótico - NuMa 2 .....	44
Figura 30 - Classificação esquemática de padrões mistos .....	45
Figura 31 - Padrão de FAN do tipo misto nucleolar homogêneo e nuclear pontilhado grosso.....	46
Figura 32 - Padrão de FAN do tipo misto nuclear e nucleolar pontilhado .....	46
Figura 33 - Padrão de FAN do tipo misto citoplasmático pontilhado fino denso a homogêneo e nucleolar homogêneo.....	47
Figura 34 - Padrão de FAN do tipo misto nuclear pontilhado fino com Fluorescência do aparelho mitótico.....	47
Figura 35 - Imunofluorescência indireta em células HEp-2, mostrando a presença de anticorpos contra antígenos celulares, com padrão citoplasmático, em um indivíduo infectado pelo VD1.....	55
Figura 36 - Imunofluorescência indireta em células HEp-2, mostrando a presença	

de anticorpos contra antígenos celulares, com padrão nuclear, em um indivíduo infectado pelo VD2.....56

Figura 37 - Imunofluorescência indireta em células HEp-2, mostrando a presença de anticorpos contra antígenos celulares, com padrão citoplasmático, em um indivíduo infectado pelo HTLV - 1. ....61

Figura 38 - Imunofluorescência indireta em células HEp-2, mostrando a presença de anticorpos contra antígenos celulares, com padrão nuclear, em um indivíduo infectado pelo HTLV - 1. ....61

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADE - Antibody Dependent Enhancement

ANA - Anticorpos anti-nucleares

PCNA - Auto-anticorpos anti-núcleo de célula em proliferação

CD4+ - Cluster designation 4

CD8+ - Cluster designation 8

Célula HEP-2 - células imortalizadas que se originam de carcinoma laríngeo humano (Human Epithelioma Cells)

Células LE – Células do Lúpus Eritematoso

Ag-Ac - Complexos antígeno-anticorpo

EIE – Ensaio imunoenzimático

ELISA – Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay

EUA - Estados Unidos da América

FAN – Fator anti-núcleo

FC - Fixação do Complemento

FHD - Febre Hemorrágica da Dengue

*gag, env e pol* - Genes estruturais comuns aos retrovírus

HIV 1 - Vírus da imunodeficiência humana 1

G-ELISA - IgG Antibody Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

HTLV - Vírus linfotrópico de células T humanas

IFI - Imunofluorescência Indireta

IFN- $\gamma$  - Interferon gama

IH - Inibição da Hemaglutinação

IL- Interleucina

LES - Lupus Eritematoso Sistêmico

MAC-ELISA – IgM Antibody Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

LLcTA - Leucemia/linfoma de células T de adultos

LTR - Long Terminal Repeats

ORF - Open Reading Frames

PCR - Reação em Cadeia Mediada pela Polimerase

PET/MAH - Paraparesia Espástica Tropical / Mielopatia Associada ao HTLV-1

SIDA - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SCD - Síndrome do Choque da Dengue

TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral alfa

VD - Vírus da Dengue

VD 1 - Vírus da Dengue 1

VD 2 - Vírus da Dengue 2

VD 3 - Vírus da Dengue 3

VD 4 - Vírus da Dengue 4

WB - Western blot

## RESUMO

A pesquisa de anticorpos contra antígenos celulares requer permanente revisão das informações sobre a interpretação dos resultados, visto que a positividade é observada em parte da população normal e desencadeada transitoriamente por processos infecciosos. O objetivo deste trabalho foi determinar, através da técnica da pesquisa de auto-anticorpos anti-nucleares (ANA) em células HEp-2, a prevalência de auto-anticorpos contra antígenos celulares em três grupos de pessoas: Grupo 1- pacientes com infecção pelo *Virus da dengue* (VD) (n= 30); Grupo 2 - pacientes com infecção pelos HTLV 1 e 2 (n= 30), Grupo 3 - indivíduos doadores de sangue (n= 100) não infectados e sem manifestações clínicas aparentes. A prevalência de ANA nos Grupos 1 (40%) e 2 (40%) foi altamente significativa em relação ao Grupo 3 (2%) ( $p < 0,0001$ ), com predomínio do padrão citoplasmático em relação ao padrão nuclear. Os indivíduos do Grupo 1 estavam infectados por três espécies do VD, com predominância ( $p = 0,002$ ) para o DEN 3 (66,7%), entretanto a distribuição da frequência de ANA de acordo com a espécie, mostrou uma diferença significativa ( $p = 0,0260$ ) entre as infecções pelo VD1 ( $p = 0,0644$ ) e VD2 ( $p = 0,0249$ ), em relação ao VD3, mas sem diferença entre os padrões ( $p = 0,2479$ ). No Grupo 2 a prevalência e o padrão de ANA não mostraram correlação com o tipo de HTLV, embora tenha predominado indivíduos infectados pelo HTLV 1 ( $p = 0,0035$ ) (76,7%); a maioria não apresentava sintomas clínicos ( $p = 0,0136$ ), 36,7% mostrava doença compatível com PET/MAH, e a presença de ANA não mostrou diferença significativa entre sintomáticos e assintomáticos ( $p > 0,05$ ). Não houve correlação de soropositividade com sexo entre os grupos. Concluiu-se que o quadro infeccioso é um importante desencadeador de respostas auto-imunes detectadas laboratorialmente, não se observando influência nas manifestações clínicas dos agravos. Estudos prospectivos, com controles destes casos, poderão trazer as respostas quanto a importância e significado dos resultados obtidos.

Palavras chaves: 1.FAN 2.Auto-anticorpos 3. HTLV. 4. Dengue

## ABSTRACT

The antibodies against cellular antigens requires ongoing review of information on the interpretation of results, whereas the positivity is observed in the normal population and transiently triggered by infectious processes. The objective of this study was to determine, through the technique for auto-anti-nuclear antibody (ANA) on HEp-2, the prevalence of autoantibodies to cellular antigens in three groups: Group 1 - infected patients Dengue virus (RV) (n = 30), Group 2 - patients infected by HTLV 1 and 2 (n = 30) Group 3 - blood donors (n = 100) uninfected and without apparent clinical manifestations. The prevalence of ANA in Group 1 (40%) and 2 (40%) was highly significant compared to Group 3 (2%) ( $p < 0.0001$ ), predominantly cytoplasmic pattern in relation to nuclear pattern. Individuals in Group 1 were infected by three species of the RV, with prevalence ( $p = 0.002$ ) for the DEN 3 (66.7%), though the frequency distribution of NAA in accordance with the species showed a significant difference ( $p = 0.0260$ ) between VD1 infections ( $p = 0.0644$ ) and VD2 ( $p = 0.0249$ ), compared to VD3, but no difference between the patterns ( $p = 0.2479$ ). In Group 2, the prevalence and pattern of ANA showed no correlation with the type of HTLV, although dominated individuals infected with HTLV 1 ( $p = 0.0035$ ) (76.7%), most had no clinical symptoms ( $p = 0, 0136$ ), 36.7% showed disease compatible with HAM / TSP, and the presence of NAA showed no significant difference between symptomatic and asymptomatic patients ( $p > 0.05$ ). There was no correlation of seropositivity with sex between the groups. It was concluded that the stage of infection is an important trigger of autoimmune responses detected by laboratory testing, with no significant influence on the clinical manifestations of diseases. Prospective studies, with controls these cases, may bring answers regarding the importance and significance of the results.

Key words: 1.ANA 2.Autoantibodies 3. HTLV. 4. Dengue

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 DOENÇA AUTO-IMUNE, HIPERSENSIBILIDADE E AUTOTOLERÂNCIA

O sistema imunológico tem como principal função a proteção orgânica, através de mecanismos específicos que reconhecem antígenos estranhos ao hospedeiro. Entretanto, em determinadas circunstâncias podem ocorrer falhas nestes mecanismos, e uma resposta anormal a componentes próprios pode ser desencadeada pela quebra do controle ativo de tolerância imunológica, mecanismo que assegura a não resposta a antígenos próprios. Este desequilíbrio resulta na produção de linfócitos T auto-reativos e eventualmente, lesão tecidual (Bonfá *et al.*, 1987).

As doenças auto-imunes podem resultar de respostas anormais ou excessivas contra antígenos estranhos, como os microrganismos e antígenos ambientais não infecciosos, em indivíduos geneticamente suscetíveis (Tan, 1997).

Entre os possíveis mecanismos envolvidos conseqüentes às infecções, destacam-se: quebra da autotolerância, indução de co-estimuladores nas células apresentadoras de antígenos e simulação molecular, presença de super-antígenos, além das reações cruzadas entre antígenos microbianos e antígenos próprios. Vários estudos mostram que as diversas formas de expressão desta interação imunológica estão relacionadas não com a presença ou ausência do microorganismo, mas sim com o tipo de resposta imunológica atípica do hospedeiro frente ao processo infeccioso (Tan, 1997; Abbas & Lichtman, 2005).

A diversidade de resposta do hospedeiro ao agente infeccioso, desde quadros assintomáticos até aqueles com evolução grave, fatal ou incapacitante, tem estimulado a busca por justificativas de tais discrepâncias clínicas, sobretudo na imunomodulação. Dentre as infecções mais bem estudadas quanto a esta resposta destacam-se aquelas pelos Vírus da hepatite C, Vírus da imunodeficiência humana 1 (HIV-1), Herpes vírus humano 4 (vírus do Epstein Baar) e pelo *Mycobacterium leprae* (Abbas & Lichtman, 2005).

## 1.2 RELAÇÃO VÍRUS-HOSPEDEIRO E RESPOSTA INFLAMATÓRIA

A resposta imunológica é mediada por células, imunoglobulinas, complemento e citocinas, dentre outros, todos envolvidos na resposta às infecções virais dependentes de células que suportam a sua multiplicação. Esses componentes normalmente operam em conjunto e sua importância não pode ser avaliada de maneira individual, tanto na recuperação da infecção aguda como na proteção contra reinfecções (Ferreira & Ávila, 2001; Abbas & Lichtman, 2005).

Os agentes virais comportam-se de maneira diferente das bactérias, fungos e protozoários em nível celular e molecular quando se leva em consideração a ação dos mesmos nos distúrbios funcionais que são observados em decorrência de seu processo de multiplicação nas células hospedeiras (Abbas & Lichtman, 2005).

Os vírus mantêm interações com o hospedeiro vertebrado que incluem efeitos citolíticos (em que ocorre morte celular no processo de replicação), transformação celular (com alteração morfológica e bioquímica levando a

multiplicação constante da célula hospedeira) e persistência viral (que envolve a integração, ou não, do genoma viral e a permanência do agente durante a existência da célula) (Ferreira & Ávila, 2001).

A patogênese da infecção viral inclui pelo menos três tipos de interações com o hospedeiro vertebrado: (i) o efeito do agente sobre as células; (ii) a maneira de disseminação do agente no organismo infectado; (iii) a resposta imunológica e a sua influência no processo infeccioso. Destacam-se dois tipos principais da interação: a destruição celular e a resposta imunológica (Figueiredo, 1999; Catalan-Soares, Carneio-Proietti & Proietti, 2006).

A destruição celular por si só, quando em uma grande extensão de um órgão vital ocasiona o aparecimento de sintomatologia específica (taquicardia, icterícia e convulsão). Entretanto, os sinais e sintomas que acompanham o processo de doença não podem ser explicados unicamente pela destruição celular ocasionada por grande parte dos agentes infecciosos, em particular, os vírus. Mesmo na ausência de lise celular, mudanças funcionais em nível celular e molecular são capazes de gerar doença grave e fatal (Martins & Aguiar, 2006).

A citólise viral, assim como a citólise imunológica, promove uma destruição extensa das áreas atingidas por determinados vírus. Os complexos antígeno-anticorpo (Ag-Ac) circulantes podem ser depositados nos rins e arteríolas e ocasionar doenças agudas (acompanhadas de exantemas e artrites) e doenças crônicas (acompanhadas de glomerulonefrites e arterites). Complexos antígeno-anticorpo podem também ocasionar reações sistêmicas sendo a mais grave a

disseminação intravascular disseminada que acompanha as febres hemorrágicas (George *et al.*, 1988).

Dentre os aspectos importantes das infecções persistentes incluem-se o escape à resposta imunológica e a replicação em sítios não acessíveis aos mecanismos de defesa. As infecções persistentes, entretanto, são pouco compreendidas, tanto em referência à imunopatogênese, quanto no seu estabelecimento e em sua manutenção (Abbas & Lichtman, 2005).

### 1.3 O VÍRUS LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T HUMANAS (HTLV)

#### 1.3.1 Biologia, Epidemiologia e Patogenia

A possibilidade da associação entre os retrovírus e neoplasias em seres humanos, pode ser feita com sucesso na década de 1980, quando foi isolado o Vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV), a partir de uma linhagem de células linfoblastóides, obtida de um paciente com linfoma cutâneo de células T nos Estados Unidos da América (EUA). O mesmo ocorreu no Japão, com quadros de leucemia/linfoma de células T de adultos (LLTA) em situações independentes (Levine *et al.*, 1994).

No ano de 1982, foi isolado um segundo tipo de HTLV, a partir de um paciente com tricoleucemia. Métodos de cultivo *in vitro* e a caracterização biológica e molecular desses agentes evidenciaram que se tratava de dois agentes relacionados, porém distintos, que passaram a ser denominados HTLV- 1

e HTLV- 2. Posteriormente, foi definido o tropismo desses dois vírus para linfócitos T, CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, respectivamente (Kalyanaraman *et al.*, 1982a; Kalyanaraman *et al.*, 1982b; International committee on the taxonomy of viruses, 2006).

O HTLV é um agente viral de tamanho médio (100-120 nm), que pertence a família *Retroviridae*, gênero *Deltaretrovirus*. Este vírus contém duas moléculas de RNA de cadeia simples, iguais, com polaridade positiva e utilizam uma estratégia de replicação semelhante aos demais retrovírus, sendo capazes de persistir no hospedeiro infectado (Catalan-Soares, Carneio-Proietti & Proietti, 2006).

Além dos genes estruturais comuns aos retrovírus (*gag*, *env* e *pol*), os HTLV apresentam uma região denominada de *pX*, que exhibe quatro áreas de leitura *Open Reading Frames* (ORF) codificadoras de seis proteínas, como as proteínas reguladoras Tax e Rex e outras proteínas com função não totalmente definidas. O genoma viral ainda apresenta duas regiões nas extremidades, denominadas *Long Terminal Repeats* (LTR), que são seqüências repetitivas, sem função de codificação (Levine *et al.*, 1994; *apud* Vallinoto *et al.*, 2002). A homologia entre os dois tipos do vírus, HTLV-1 e HTLV-2, varia de acordo com a região gênica analisada. A região *gag* apresenta 85% de similaridade, enquanto a região *env* mostra uma concordância de 65%. A região LTR tem sido utilizada para subtipar genotipicamente os dois HTLV (Mahieux *et al.*, 1997; Vallinoto *et al.*, 2002).

A infecção pelo HTLV tem início através da interação das glicoproteínas do envelope viral com receptores situados junto à membrana plasmática das células-alvo. Após a introdução do material genético viral no citoplasma da célula, observa-se a transcrição reversa do RNA viral, dando origem à molécula de DNA

complementar de dupla fita, que migra para o núcleo celular, integra-se ao genoma, passando então a ser denominada DNA proviral. Nessas etapas atuam as enzimas virais essenciais para a manutenção do ciclo replicativo do agente, a transcriptase reversa e a integrase. Após a integração, o provírus torna-se estável, fazendo a sua replicação e mantendo-se em persistência por ocasião da duplicação do DNA durante o ciclo celular (Franchini, 1995; Kubota *et al.*, 2000).

Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos assumem um papel importante na evolução da infecção pelos HTLV - 1 e 2 (Nagai & Jacobson, 2001). Acredita-se que além de exercerem função citotóxica, os linfócitos T CD8<sup>+</sup> secretam citocinas essenciais para a manutenção da resposta inflamatória. O aumento de citocinas, tais como o interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) nos compartimentos afetados durante a infecção viral, acompanhado da manutenção do processo inflamatório, parece ser controlador importante da ativação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> auto-reativos e/ou da perda da tolerância a auto-antígenos (Kubota *et al.*, 2000). Os linfócitos T CD8<sup>+</sup>, de forma controversa, atuam em mecanismos antivirais e imunopatológicos, uma vez que a infecção pelo HTLV poderia interferir em aspectos centrais da resposta imológica do hospedeiro, fato importante para o desenvolvimento de auto-agressão (Carneiro-Proietti *et al.*, 2002).

A partir de estudos soropidemiológicos foi possível mostrar que o HTLV-1 estava associado a uma encefalomieloneuropatia endêmica na região do Caribe, conhecida como Paraparesia Espástica Tropical e também referida como Mielopatia Associada ao HTLV-1 (PET/MAH) (Ijichi *et al.*, 1989; Leite *et al.*, 2003).

No Brasil, as evidências de infecção por HTLV-1 e 2 surgiram de inquéritos soropidemiológicos que incluíram a descrição de uma elevada prevalência do HTLV-2 entre comunidades indígenas da Amazônia brasileira (Ishak *et al.*, 1995; Vallinoto, 2001). Outros inquéritos demonstraram soroprevalências de 10% entre pacientes com AIDS em São Paulo, 4% entre homossexuais no Rio de Janeiro e 9% entre profissionais do sexo no Rio de Janeiro e Minas Gerais, 1% entre portadores assintomáticos do HIV em São Paulo, 2,8% entre profissionais do sexo da cidade de Santos e 2% entre seus parceiros sexuais, 18,2% entre pacientes com doenças hematológicas no Rio de Janeiro e 35,2% entre usuários de drogas injetáveis na Bahia (Catalan-Soares, Carneio-Proietti & Proietti, 2006).

Em candidatos a doador de sangue voluntários, encontram-se prevalências variáveis: 0,42% a 0,78% em inquéritos conduzidos no Rio de Janeiro, 0,15% em São Paulo, enquanto índices de até 1,35% foram identificados na Bahia e em Pernambuco. Na Bahia, mais recentemente, estudo de base populacional revelou prevalência de 1,8% na população geral. Estima-se a existência de pelo menos 1.000.000 de pessoas portadoras de infecção por HTLV no Brasil (Catalan-Soares, Proietti & Carneio-Proietti, 2001; Carneio-Proietti *et al.*, 2002).

As manifestações clínicas destes pacientes estão assim classificadas: a) Complexo neurológico associado ao HTLV - PET/MAH associada ao HTLV - 1, que está subdividido em: miopatia, doença do neurônio motor, neuropatia periférica, disautonomia, ataxia cerebelar e disfunção cognitiva; b) LLTA, que pode ser ainda classificada em quatro grupos: forma aguda, forma crônica, linfomatosa

e *smoldering*; c) Manifestações dermatológicas, que se subclassificam em: relacionadas ao HTLV, relacionadas à imunossupressão e cutâneas inespecíficas; d) manifestações oftalmológicas (Carneiro-Proietti *et al.*, 2002; Catalan-Soares, Carneiro-Proietti & Proietti, 2006). A PET/MAH acomete menos de 5% dos infectados pelo HTLV-1, se caracteriza por acometimento insidioso e progressivo de fraqueza muscular nos membros inferiores e espasticidade, associada em grau variado a distúrbios esfinterianos e sensitivos (Leite *et al.*, 2003).

Os indivíduos infectados que evoluem de maneira assintomática (maioria) possivelmente estão sob pressão de mecanismos imunoprotetores que conseguem criar um equilíbrio nas interações vírus-hospedeiro. Todavia, é importante ressaltar que a forma clínica assintomática pode não refletir uma ausência de reações inflamatórias anti-HTLV ou anergia do sistema imunológico (Pinheiro *et al.*, 1995; Leite *et al.*, 2003).

Inúmeras são as pesquisas que buscam a compreensão da evolução do processo de cronicidade do HTLV-1, e tais pesquisas relacionam fatores ligados aos mecanismos imunopatológicos com o desenvolvimento ou manutenção das diferentes formas clínicas da infecção. Alta carga proviral, imunolinfoproliferação espontânea elevada *in vitro*, altos títulos de anticorpos e de linfócitos T CD8<sup>+</sup> específicos para antígenos do HTLV-1, tanto no soro quanto no fluido cefalorraquidiano, parecem estar associados com a evolução e presença de PET/MAH. Merecem menção a investigação do eventual papel prognóstico da carga proviral de HTLV-1, que no sangue periférico é mais elevada entre pacientes com LLcTA, com PET/MAH e com uveíte, se comparada à exibida por

portadores assintomáticos da infecção (Shimoyama, 1991; Levine *et al.*, 1994; Sagawa *et al.*, 1995). No entanto, até o momento nenhum fator isoladamente esclarece tal evolução (Ijichi *et al.*, 1989; Souza *et al.*, 2006).

### **1.3.2 Diagnóstico Laboratorial da Infecção pelo HTLV**

O diagnóstico laboratorial da infecção pelo HTLV é feito por meio de dois grupos básicos de testes: a) Testes de triagem sorológica (usualmente não diferenciam o HTLV-1 do HTLV-2): aglutinação de partículas de látex ou de gelatina e ensaios imunoenzimáticos do tipo ELISA; b) Testes confirmatórios: Imunofluorescência Indireta (IFI) e ensaio imunoenzimático do tipo Western blot (WB) e imunoblot (Catalan-Soares, Carneio-Proietti & Proietti, 2006).

As reações de ELISA utilizam como antígeno o lisado viral e proteínas virais obtidas por tecnologia recombinante ou por síntese de peptídeos. O teste de WB é uma reação confirmatória também muito utilizada. Alguns *kits* contêm uma proteína recombinante do envelope do vírus (rgp46-I ou rgp46-II) e/ou uma proteína da região transmembrana (rgp 21 ou p21), além dos demais antígenos virais. Assim, já é possível a diferenciação entre o HTLV-1 do HTLV-2 em muitos casos, mas resultados indeterminados, que não preenchem os critérios de positividade, persistem. A interpretação das bandas deve obedecer a critérios pré-estabelecidos pelo fabricante, sendo, em geral, requerida reatividade para p19 ou p24 e para o antígeno do envelope viral (gp46) (Brito-Melo, 2000).

O uso de métodos de amplificação gênica do tipo da reação em cadeia mediada pela polimerase (PCR), amplificando seqüências específicas no genoma viral é hoje o método de escolha para detecção do genoma do HTLV diretamente do sangue e de muitos outros tecidos. Apresenta maior sensibilidade e especificidade que os métodos anteriores, é considerada a ferramenta ideal para a diferenciação entre HTLV-1 e HTLV-2, pois além de sua grande sensibilidade, a seqüência de nucleotídeos dos produtos amplificados pode ser facilmente determinada, permitindo diagnóstico preciso do tipo de vírus infectante (Franchini, 1995).

## 1.4 O VÍRUS DA DENGUE

### 1.4.1 Biologia, Epidemiologia e Patogenia

O vírus da dengue (VD) é um agente da família *Flaviviridae*, a qual possui alguns outros agentes importantes causadores de doença em seres humanos como o Vírus da febre amarela e o Vírus West Nile. Apresenta quatro espécies conhecidas: DEN1, DEN2, DEN3 e DEN4, com propriedades antigênicas distintas, todas capazes de produzir dengue hemorrágico (Morens & Halstead, 1987; Vasconcelos *et al.*, 1999).

A dengue é a arbovirose mais importante nos dias de hoje, em termos de morbidade e mortalidade, com uma estimativa de cem milhões de pessoas infectadas anualmente no mundo, principalmente nas regiões de clima tropical das

Américas, da África, da Ásia e da Oceania. A prevalência está na dependência direta da presença e distribuição do vetor principal, o *Aedes aegypti*, o que significa uma expansão importante da doença nos últimos trinta anos para mais de cem países e uma ameaça real à saúde de 40% da população humana (aproximadamente 2,5 bilhões de pessoas) (Morens & Halstead, 1987; WHO, 1997). No Brasil, a partir da re-emergência do vírus, as epidemias são crescentes alcançando um número significativos de casos a cada ano com a renovação de hospedeiros suscetíveis e vetores (Vasconcelos *et al.*, 1999; Teixeira *et al.*, 2003; Martins & Aguiar, 2006).

O VD é esférico, têm 40-50 nm de diâmetro, e um capsídeo icosaédrico coberto por um envelope lipídico. O RNA é de cadeia simples, de polaridade positiva e o genoma com 11 Kb, codifica três proteínas estruturais (C, do capsídeo; M, da membrana; e E, a glicoproteína do envelope), além de sete proteínas não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5). As regiões não codificantes são importantes para a regulação da replicação viral. As principais propriedades biológicas do vírus relacionam-se à proteína E, do envelope: a ligação aos receptores, a aglutinação de eritrócitos, a indução de anticorpos neutralizantes e a resposta imune protetora estão, todas, relacionadas à estrutura desta proteína (Chambers *et al.*, 1990; Monath & Heinz, 1996; Tsai, 2005).

Após ser inoculado através da picada do *Aedes aegypti*, o VD faz uma primeira replicação em células musculares estriadas, lisas e fibroblastos, bem

como em linfonodos locais. Com a viremia, se dissemina por todo o organismo, circulando livre no plasma ou no interior de monócitos/macrófagos pelos quais tem tropismo e por isso estas células fagocitárias são consideradas seus maiores sítios de replicação (Russel, 1971; Monath, 1986).

Depois de um período de incubação de dois a sete dias, surgem os sintomas gerais da dengue, com febre e mal-estar, coincidindo com a viremia. Esses sintomas relacionam-se a níveis séricos elevados de citocinas liberadas por macrófagos ao interagirem com linfócitos T ativados. Observam-se altos teores séricos de interleucina-2 (IL-2) e de seu receptor solúvel, de CD4 solúvel, IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$  que se mantêm elevados até a convalescença. A leucopenia e a discreta e transitória depressão medular que se apresentam nesses casos, também, relacionam-se aos altos teores de citocinas macrofágicas. As mialgias são conseqüentes, em parte, à multiplicação viral no próprio tecido muscular e são acometidos, inclusive músculos oculomotores, responsáveis pela cefaléia retroorbitária que muitos pacientes apresentam (Kurane & Eennis, 1992; Monath, 1986; Monath & Heinz, 1996).

Citocinas pró-inflamatórias, TNF- $\alpha$  e IL-1 e IL-6 têm sido encontradas em pacientes com dengue na Ásia, e também no Brasil, e seus níveis circulantes têm correlação com as manifestações hemorrágicas e uma maior incidência de dengue hemorrágico.

Citocinas produzidas e secretadas por macrófagos ativados desempenham um papel importante no mecanismo de defesa contra infecções virais, inibindo a replicação viral direta ou indiretamente, entre elas, IFN, TNF- $\alpha$ , IL-1b. O TNF- $\alpha$

induz IFN- $\gamma$  e outras citocinas, aumentando inflamação, fagocitose e atividade T citotóxica. TNF- $\alpha$ , IL-1b e outros mediadores inflamatórios agem sobre as células endoteliais, contribuindo para a expressão de várias moléculas de adesão tais como ICAM-1, VCAM-1, E- e P-selectina, essenciais para iniciar o processo de extravasamento plasmático, que por sua vez é fundamental para a gravidade da doença (Monath & Tsai, 1997; Hanon *et al.*, 2000; Cunha & Nogueira, 2006).

A resposta imune celular citotóxica por linfócitos T ocorre sob estímulo das proteínas NS1, NS3 e E do VD. Linfócitos T atuam na presença das células infectadas pelo VD que expressam receptores LA tipo II, produzindo IFN- $\gamma$ , IL-2 e o fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos. Portanto, as células T participam ativamente na resposta imune, reduzindo o número de células infectadas com o vírus, e conferindo proteção contra reinfecção (Halstead & O'Rourke, 1977; Kurane & Eennis, 1992).

Anticorpos produzidos durante a infecção por um tipo de dengue, também, protegem da infecção por outros tipos, entretanto, tal imunidade é mais curta, com duração de meses ou poucos anos. Infecções por dengue, em indivíduos que já tiveram contato com outros sorotipos do vírus ou, mesmo, outros *Flavivirus* (como os vacinados contra a febre amarela), podem alterar o perfil da resposta imune, que passa a ser do tipo anamnésico ou de infecção secundária (reinfecção), com baixa produção de IgM e liberação intensa e precoce de IgG (Halstead & O'Rourke, 1977; Kurane & Eennis, 1992).

Esta é considerada uma resposta imunológica paradoxal, que ocorre nos casos de infecção seqüencial, tendo o paciente anticorpos preexistentes, obtidos

quando da infecção prévia por outra espécie viral, não neutralizam o segundo vírus infectante e amplificam a infecção, facilitando ao novo tipo infectante a penetração em macrófagos. Os vírus utilizam a porção Fc das imunoglobulinas ligados ao envelope para a ligação com os receptores de membrana Fc $\gamma$ , presentes na membrana celular macrofágica. Trata-se do fenômeno de facilitação, por anticorpos, da penetração viral em macrófagos (*Antibody Dependent Enhancement - ADE*) (Figueiredo, 1999).

A Febre Hemorrágica da Dengue (FHD) e a Síndrome do Choque da Dengue (SCD), complicações clínicas da infecção pelo VD, possuem como base fisiopatológica uma resposta imunológica anômala, pelo doente, desencadeada por uma cepa viral infectante, envolvendo leucócitos, citocinas e imunocomplexos. Isto provoca o aumento da permeabilidade por má função vascular endotelial, sem destruição do endotélio, com extravasamento de líquidos para o interstício, causando queda da pressão arterial e manifestações hemorrágicas, associadas à trombocitopenia. Conseqüentes a tais manifestações, surgem hemoconcentração com redução da volemia, má perfusão tissular, hipóxia e acidose láctica (Russel, 1971; Monath, 1986; Gluber, 1998).

Tal mecanismo pode ser observado em dois grupos de indivíduos: acima de um ano de idade com uma segunda infecção por dengue (mais de 90% dos casos) e crianças, menores de um ano, infectadas pela primeira vez, que receberam intra-útero anticorpos maternos contra dengue. Com o passar dos meses, tais anticorpos, que apresentam queda gradual, atingem níveis subneutralizantes (Halstead & O'Rourke, 1977; Kurane & Eennis, 1992; Monath & Tsai, 1997). No

caso de infecção desses lactentes pelo mesmo tipo de dengue que causou a infecção materna e, na presença dos anticorpos subneutralizantes, ocorreria ADE, e os pacientes desenvolveriam FHD/SCD (Kliks *et al.*, 1988; Hung *et al.*, 2004). Isto ficou evidente com o aparecimento da FHD e SCD nas Américas com a detecção de variantes específicas do sorotipo 2, originárias do Sudeste Asiático (Morens & Halstead, 1987; Cunha & Nogueira, 2006).

Finalmente, não apenas a resposta imunológica e as características próprias do indivíduo infectado estariam associadas aos quadros graves de dengue, mas a cepa viral infectante. Infecções subseqüentes são reconhecidas como provável fator determinante para o aparecimento da dengue hemorrágica e sabe-se que FHD/SCD ocorre em frequência desproporcionalmente mais alta, quando a infecção é causada pelo sorotipo 2 (Gubler, 1998). Também, observa-se nessas epidemias de dengue, agravamento clínico dos casos com a progressão do surto, sugerindo um aumento da virulência do microrganismo após passagens sucessivas em seres humanos (Cunha & Nogueira, 2006).

#### **1.4.2 Diagnóstico Laboratorial da Infecção pelo Vírus da Dengue**

Diversas técnicas são empregadas para o diagnóstico sorológico da dengue. A Inibição da Hemaglutinação (IH) e a Fixação do Complemento (FC) são as mais clássicas. A IH é uma reação simples, sensível, de fácil realização, que não exige

qualquer aparelhagem sofisticada. Esta técnica detecta anticorpos a partir do quinto dia de doença. Os anticorpos detectados pela FC são transitórios, mas específicos, e permitem a diferenciação entre os complexos antigênicos dos *Flavivirus* (Gubler, 1998; Tsai, 2005).

Os anticorpos que surgem em resposta à infecção por um sorotipo apresentam em maior ou menor grau, reação cruzada com os outros sorotipos do VD. Embora nas infecções primárias a resposta humoral tende a ser relativamente monotípica, nas infecções seqüenciais os exames sorológicos não permitem o diagnóstico do sorotipo infectante (Groen *et al.*, 1999).

Os anticorpos IgM específicos são detectáveis a partir do quarto dia, após o início dos sintomas, atingindo os níveis mais elevados por volta do sétimo ou oitavo dia e declinando lentamente, passando a não ser detectáveis após alguns meses. As IgG específicas são observadas, em níveis baixos, a partir do quarto dia após o início dos sintomas, elevam-se gradualmente, atingindo altos teores em duas semanas e mantêm-se detectáveis por vários anos, conferindo imunidade contra o tipo infectante, provavelmente, por toda a vida (Figueiredo *et al.*, 1989; Groen *et al.*, 1999).

O exame mais empregado é o MAC-ELISA. Sua grande vantagem é a utilização de uma única amostra de soro para um diagnóstico relativamente seguro de infecção aguda, na detecção de anticorpos IgM. Em soros obtidos entre sete e dez dias a sensibilidade é de 95 a 97%, em comparação com o padrão ouro, que é a IH. As reações falso positivas podem chegar a 2%, e ocorrem com

infecções por herpesvírus e com o vírus da hepatite B (Groen *et al.*, 1999; Guzmán & Kouri, 2002).

Nas infecções secundárias, uma combinação do MAC-ELISA com o G-ELISA tem sensibilidade de 100%, após quatro a cinco dias do início do quadro. O MAC-ELISA torna-se negativo dois meses após a infecção por dengue, mas pode persistir positivo mais tempo em outras flavivirose, como nas encefalite por carrapatos, Nilo Ocidental e St. Louis. Isto pode causar problemas para o diagnóstico em países onde vários agentes do gênero *Flavivirus* circulam, pois a presença de anticorpos contra outros *Flavivirus* prejudica o diagnóstico sorológico da dengue, especialmente quando são empregados testes como a IH e G-ELISA. Mesmo com o MAC-ELISA, a soroconversão ou a subida significativa dos títulos (elevação de duas ou mais diluições, ou de quatro ou mais vezes o título) são necessárias para a confirmação do diagnóstico (Martins & Aguiar, 2006).

Existem técnicas de detecção de IgM e IgG por IFI, que pode ser usada também para a detecção de anticorpos IgA, pois tem a mesma cinética da IgM, constituindo-se numa alternativa mais barata que o MAC-ELISA (Groen *et al.*, 1999).

Os testes que envolvem detecção de antígenos possuem maior importância quando há casos de óbitos com pouca ou nenhuma amostra de soro colhida. A imunohistoquímica com anticorpos (monoclonais ou policlonais) específicos

substituiu a imunofluorescência direta e permitiu a detecção de antígenos virais no fígado, baço, pulmões e linfonodos, em casos fatais (Guzmán & Kouri, 2002).

Foram descritos vários protocolos de amplificação gênica para a detecção do VD, que variam quanto ao método de extração, posição dos "*primers*" no genoma, especificidade, sensibilidade, método de detecção dos produtos e modo de determinar o sorotipo. A PCR, precedida pela ação da transcriptase reversa, RT-PCR é um método rápido, sensível, simples, reprodutível e pode ser empregado para detectar o RNA viral em amostras clínicas, material de necropsia, culturas de tecido e mosquitos adultos ou larvas. A sensibilidade é igual a do isolamento viral em células C6/36 (Guzmán & Kouri, 2002; Aquino *et al.*, 2006).

O isolamento para identificação do vírus é o único método capaz de fornecer com segurança a espécie viral. Esta identificação tem maior importância para fins de saúde pública, sendo pouco relevante para a conduta clínica. Há quatro sistemas para isolamento do vírus: inoculação intracerebral em camundongos de um a três dias, culturas de células de mamíferos, inoculação intratorácica em mosquito (com sensibilidade de 100%) e a técnica mais recente que é isolamento em cultura de células de mosquito, considerada rápida, sensível e econômica para o isolamento viral (Figueiredo *et al.*, 1989; Martins & Setúbal, 1990; Groen *et al.*, 1999).

## 1.5 AUTO-ANTICORPOS

### 1.5.1 O Fator Anti-Nuclear (FAN)

Os auto-anticorpos são imunoglobulinas que reconhecem como não próprios antígenos presentes nas células e órgãos do próprio indivíduo. A presença de auto-anticorpos é característica de várias doenças auto-imunes. Entretanto, a presença de auto-anticorpos não é específica de autoimunidade, uma vez que indivíduos com diversas condições inflamatórias crônicas, e até sadios podem apresentar auto-anticorpos circulantes (Von Muhlen & Nakamura, 2002).

Os auto-anticorpos podem ser naturais, que são poli-reativos, ocorrem em baixos títulos, têm baixa avidéz e ocorrem na maioria das pessoas, cuja função não é totalmente conhecida. Outros auto-anticorpos surgem em decorrência de condições patológicas com especificidade restrita, ocorrem em títulos elevados e têm alta avidéz, alguns destes são denominados marcadores de doença (anticorpos anti-DNA nativo e anti-Sm, marcadores de Lupus Eritematoso Sistêmico - LES) (Tan, 1997).

Os anticorpos anti-nucleares (ANA) compreendem um grupo bastante heterogêneo quanto sua especificidade antigênica. São dirigidos para componentes celulares com distribuição nuclear ou citoplasmática. O teste de IFI utilizando como substrato antigênico, fígado de camundongo ou linhagem celular humana, célula HEP-2 (células imortalizadas que se originam de carcinoma

laríngeo humano e crescem em monocamadas), é o mais comumente empregado na detecção desses auto-anticorpos. Tanto a sensibilidade, como a identificação e discriminação dos padrões de reatividade dos anticorpos, são melhores quando o ensaio é realizado sobre células HEp-2 isoladas, comparativamente à cortes de tecido ou *imprint* teciduais. Os resultados se baseiam no padrão e na distribuição celular da fluorescência, e são expressos em títulos de acordo com a maior diluição do soro que ainda apresenta reatividade (Von Muhlen & Nakamura, 2002).

A presença de ANA em alguns indivíduos frente a determinados estímulos pode ser explicado, em parte, pela característica dos antígenos de histocompatibilidade presentes (HLA-B8, DR2 e DQ3), além de aspectos genéticos familiares. Também ocorre a presença de FAN positivo frente a outros estímulos como drogas e vírus, por exemplo, que também têm dependência da característica familiar e dos antígenos de histocompatibilidade, entre outros fatores ainda desconhecidos (Schmidt-Acevedo, Pérez-Romano & Ruiz-Argueles, 2000; Narain *et al.*, 2004; Peng & Craft, 2005).

Em princípio, a formação de ANA, deve-se a apoptose celular, sendo que um dos modelos experimentais observados se dá principalmente nos ceratinócitos, quando a doença se expressa na pele, ou em células circulantes e endoteliais, entre outras, frente a estímulos específicos (Hargraves, Richmond & Morton, 1948; Hargraves, 1949; Golan *et al.*, 1992).

Além da predisposição genética, vários fatores podem desencadear a apoptose celular (infecções virais, bacterianas e drogas). A irradiação citotóxica por ultravioleta é uma dessas principais causas que, incidindo sobre a pele,

induzem a apoptose dos ceratinócitos (Golan *et al.*, 1992; Wallace & Hahn, 1997; Schmidt-Acevedo, Pérez-Romano & Ruiz-Argueles, 2000).

A partir da exposição de elementos, tanto do núcleo como do citoplasma, as células imunocompetentes predispostas iniciam a formação de anticorpos contra determinadas proteínas nucleares ou citoplasmáticas, que passam a receber denominações diversas, de acordo com a estrutura reativa antigênica: anticorpos anti-ribonucleoproteína (RNP), anticorpos anti-DNA, entre outros. Esses auto-anticorpos na circulação depositam-se em diferentes tecidos e órgãos, ativam o sistema de complemento e, conseqüentemente, levam à inflamação e disfunção do órgão-alvo (Molden, Nakamura e Tan, 1984; Lahita, Chiorazzi & Reeves, 2000; Narain *et al.*, 2004; Duarte, 2004; Peng & Craft, 2005).

A formação do complexo "fator antinúcleo" pode ter significado específico, sendo marcador de determinadas doenças, ter significado prognóstico ou mesmo não ter um significado importante quanto à presença de doenças auto-imunes. Daí, sua interpretação ter que estar sempre relacionada ao local observado da fluorescência, padrão de depósito, diluição máxima observada e associação clínica (Maddison & Reichlin, 1977; Kullick, Provost & Reichlin, 1982; Lahita, Chiorazzi & Reeves, 2000; Kavanaugh *et al.*, 2000; Duarte, 2004; Peng & Craft, 2005).

No II Consenso Brasileiro de Fator Anti-nuclear em Células HEp-2 foi mostrado que os padrões citoplasmáticos podem ser encontrados em soros de portadores do Vírus da hepatite C, do Vírus da imunodeficiência humana (HIV) e do Herpes vírus humano 4 (vírus do Epstein Barr) (Dellavance *et al.*, 2003).

O teste de FAN traz três tipos básicos de informação: (i) presença ou ausência de auto-anticorpos, (ii) caráter semi-quantitativo referindo-se à concentração do auto-anticorpo no soro (título), e (iii) a informação de maior relevância clínica que se refere ao padrão de fluorescência, com característica estreitamente relacionada às manifestações clínicas.

O FAN é positivo na maioria das condições reumáticas auto-imunes, mas também em diversas condições inflamatórias crônicas, neoplasias e mesmo em indivíduos saudáveis. Esta positividade nos pacientes normais varia conforme as técnicas utilizadas e a população estudada. No Brasil a frequência é de 12,8% para crianças e adolescentes entre 1 e 20 anos, 6,7% para adultos até 65 anos e 8,8% para adultos acima de 65 anos. Estas taxas revelam a baixa especificidade do teste, e que frente a um resultado de FAN positivo é necessária a interpretação integrada do título, do padrão de fluorescência e da contrapartida clínica (Andrade *et al.*, 1996).

O conhecimento prévio desta propriedade com relação à sensibilidade e especificidade permitirá entender a razão do achado do número crescente de reações positivas em indivíduos normais ou naqueles com diferentes processos inflamatórios específicos e inespecíficos, e que não guardam nenhuma relação com doenças reumáticas auto-imunes, podendo estar relacionado a determinadas doenças infecciosas (Wucherpfennig, 2001).

### **1.5.2 Principais marcadores da resposta inflamatória (auto-anticorpos) já descritos e sua importância**

As primeiras descrições sobre auto-anticorpos ocorreram em doenças reumáticas auto-imunes, como o fator reumatóide na artrite reumatóide e o fenômeno LE no LES. A célula LE foi descrita por Hargraves em 1949, tendo sido utilizada por muitos anos como marcador sorológico para o diagnóstico de LES (Bradwell, Stokes e Johnson, 1995). Por ser uma técnica trabalhosa, demorada e de difícil interpretação, foi substituída nas últimas décadas por outros métodos para a pesquisa e identificação de auto-anticorpos.

Após a adaptação da técnica de IFI para a pesquisa de auto-anticorpos, diversos substratos antigênicos foram utilizados, como, por exemplo, corte de fígado ou rim de rato, *imprint* de fígado de camundongo, leucócitos humanos e diversas linhagens celulares. Estes substratos foram substituídos largamente por células HEp-2 (Andrade *et al.*, 1996).

As vantagens do uso de células HEp-2 são: a) possuem antígenos humanos não-encontrados em tecidos de roedores, e os antígenos semelhantes estão em maior concentração; b) apresentam todas as fases de divisão celular, interfase/prófase, metáfase, anáfase e telófase, cada uma delas sendo a expressão fenotípica da atuação de uma série de genes, que codificam uma miríade de proteínas que surgem, reagem, atuam e desaparecem, de acordo com as fases do ciclo de vida celular, e que funcionam como auto-antígenos que possibilitam a identificação de inúmeros auto-anticorpos; c) possuem uma relação

núcleo/citoplasma em favor do núcleo, característica neoplásica, que facilita o reconhecimento de vários rearranjos fluorescentes; d) possuem vários nucléolos, permitindo avaliar sua forma de apresentação nos padrões nucleolares; e) têm um citoplasma rico em fibrilas e organelas, fundamentais no reconhecimento dos padrões citoplasmáticos (Tan, 1997; Von Muhlen & Nakamura, 2002).

Com o uso de células HEp-2 são reconhecidos mais de 30 diferentes padrões nucleares, nucleolares, da membrana nuclear, do aparelho mitótico e citoplasmáticos, que são dados por diferentes auto-anticorpos. A vantagem do método é a sua grande sensibilidade, que permite a triagem de uma gama imensa de anticorpos, fornece uma idéia da concentração dos mesmos e uma informação qualitativa importante que pode ser usada como um passo inicial para uma identificação específica (Doi, 1995).

Alguns padrões de fluorescência são relativamente inespecíficos, podendo ser evocados por vários auto-anticorpos distintos (pontilhado grosso associado a antígenos Sm e U1RNP). Outros padrões de fluorescência, entretanto, são ocasionados por uma taxa restrita de auto-anticorpos anti-núcleo de célula em proliferação (PCNA), e outros, ainda, exclusivamente por um único auto-anticorpo (centromérico) (Dellavance *et al.*, 2003).

Nestes casos, só o padrão de fluorescência pode ser suficiente para definir a especificidade do auto-anticorpo. Entretanto, o padrão de fluorescência não pode identificar qual o auto-anticorpo presente, mas sua definição é de vital importância, pois pode sugerir qual o próximo passo na investigação de sua especificidade. Os ensaios para identificação dos auto-anticorpos (imunodifusão, contra-

imunoeletroforese, hemaglutinação passiva, Elisa, imunoprecipitação, imunodot e WB) são específicos para cada teste. Assim, o FAN apresenta-se como importante método de triagem, viabilizando o conhecimento do(s) anticorpo(s) provavelmente envolvido(s), permitindo observar inúmeros padrões de fluorescência (Von Muhlen & Nakamura, 2002).

#### 1.5.2.1 Principais padrões de fluorescência encontrados em células HEp-2

De acordo com o II Consenso Brasileiro de FAN em células HEp-2 (Dellavance *et al.*, 2003), os padrões de fluorescência mais freqüentemente encontrados, com os respectivos anticorpos de interesse clínico podem ser observados nos Quadros 1 e 2:

Quadro 1 – Padrões de FAN mistos e relevâncias clínicas mais frequentes

Padrão	Relevância clínica
Misto do tipo nucleolar homogêneo e nuclear pontilhado grosso com placa metafásica decorada em anel (cromossomos negativos)	Anticorpo anti-Ku. Marcador de superposição polimiosite e esclerose sistêmica. Podem ocorrer no LES e esclerodermia
Misto do tipo nuclear e nucleolar pontilhado com placa metafásica positiva	Anticorpo anti-Topoisomerase 1 (Scl-70). Associado a esclerose sistêmica forma difusa. Pode ocorrer na síndrome CREST e superposição polimiosite/esclerodermia
Misto do tipo citoplasmático pontilhado fino denso a homogêneo e nucleolar homogêneo	Anticorpo anti-rRNP (anti-proteína P-ribossomal). Marcador de LES e relacionado com a psicose lúpica
Misto do tipo nuclear pontilhado fino com fluorescência do aparelho mitótico	Anticorpo anti-NuMa1. Associado à síndrome de Sjögren, podendo ocorrer em outras condições auto-imunes ou inflamatórias crônicas

(Fonte: Dellavance *et al.*, 2003)

Quadro 2 – Padrões de FAN e relevâncias clínicas mais freqüentes

Padrão	Relevância clínica por auto-anticorpos
Nuclear pontilhado centromérico	Anticorpo anticentrômero (proteínas A, B e C). Esclerose sistêmica forma CREST (calcinose, fenômeno de Raynaud, disfunção motora do esôfago, esclerodactilia e telangiectasia) e cirrose biliar primária
Nuclear homogêneo	Anticorpo anti-DNA nativo. Marcador de LES. Anticorpo anti-histona. Marcador de LES induzido por drogas e idiopático. Anticorpo anticromatina (DNA/histona, nucleossomo). Artrite reumatóide, Artrite idiopática juvenil, importante associação com uveíte na forma oligoarticular, Síndrome de Felty e cirrose biliar primária
Nuclear tipo membrana nuclear contínua	Anticorpo antilamina e contra componentes antigênicos do envelope nuclear – lamínas, Hepatite auto-imune, raramente associado a doenças reumáticas, algumas formas de LES e esclerodermia linear. Raramente associado à síndrome dos anticorpos antifosfolípidos
Nuclear pontilhado pleomórfico/PCNA	Anticorpo contra núcleo de células em proliferação. Encontrado especificamente em pacientes com LES
Nuclear pontilhado fino denso	Anticorpo antiproteína p 75 KDa (cofator de transcrição). Padrão freqüentemente encontrado na rotina, cuja correlação clínica ainda não está bem estabelecida, podendo ser encontrado em indivíduos saudáveis. Anticorpo com especificidade para proteína de 75 KDa, encontrado em doenças reumáticas auto-imunes, mais freqüente nos processos inflamatórios específicos e inespecíficos. Pode ser observado em pacientes com cistite intersticial, dermatite atópica, psoríase e asma
Nuclear pontilhado tipo pontos isolados com menos de dez pontos	Anticorpo anti-p80 coilina. Sem associação clínica definida
Nuclear pontilhado tipo pontos isolados com mais de dez pontos	Anticorpo anti-Sp100 (anti-p95). Descrito principalmente na cirrose biliar primária, podendo ser observado em outras condições clínicas
Nuclear pontilhado grosso	Anticorpo anti-Sm. Marcador para LES. Anticorpo anti-RNP. Critério obrigatório no diagnóstico da doença mista do tecido conjuntivo. Presente no LES, menor freqüência na esclerose sistêmica e artrite reumatóide
Nuclear pontilhado fino	Anticorpo anti SS-A/Ro. Síndrome de Sjögren primária, LES, lúpus neonatal (bloqueio átrio ventricular e outras manifestações do lúpus neonatal) e lúpus cutâneo subagudo. Anticorpo anti SS-B/La. Síndrome de Sjögren primária, LES, lúpus neonatal (bloqueio átrio ventricular e outras manifestações do lúpus neonatal)
Nucleolar aglomerado	Anticorpo antifibrilarina (U3-nRNP). Associado à esclerose sistêmica, especialmente com comprometimento visceral grave, entre elas a hipertensão pulmonar

Quadro 2 – Padrões de FAN HEp-2 e relevâncias clínicas mais freqüentes

(continua)

Padrão	Relevância clínica por auto-anticorpos
Nucleolar pontilhado	Anticorpo anti-NOR-90. Inicialmente descrito na esclerose sistêmica. Atualmente descrito em outras doenças do tecido conjuntivo, sem relevância clínica definida. Anticorpo anti-RNA polimerase I. Esclerose sistêmica de forma difusa com tendência para comprometimento visceral mais freqüente e grave
Nucleolar homogêneo	Anticorpo anti-PM/Scl. Ocorre na síndrome de superposição da polimiosite com esclerose sistêmica. Raramente encontrado em casos de polimiosite ou esclerose sistêmica sem superposição clínica. Outros auto-anticorpos mais raros podem apresentar esse padrão
Citoplasmático fibrilar linear	Anticorpo antiactina. Encontrado em hepatopatias (hepatite auto-imune, cirrose) Anticorpo antimiosina. Hepatite C, hepatocarcinoma, miastenia gravis. Títulos baixos ou moderados podem não ter relevância clínica
Citoplasmático fibrilar segmentar	Anti-actinina, antivinculina e antitropomiosina. Anticorpos encontrados na miastenia gravis, doença de Crohn e colite ulcerativa. Títulos baixos ou moderados podem não ter relevância clínica
Citoplasmático pontilhado polar	Anticorpo anti-golginas (cisternas do aparelho de Golgi). Raro no LES, síndrome de Sjogren primária e outras doenças auto-imunes sistêmicas. Relatada em ataxia cerebelar idiopática, degeneração cerebelar paraneoplásica e infecções virais pelo vírus Epstein Baar e HIV. Títulos baixos ou moderados podem não ter relevância clínica
Citoplasmático pontilhado fino	Anticorpo anti-Histidil t RNA sintetase (Jo1). Marcador de polimiosite no adulto. Descrito raramente na dermatomiosite. Outros anticorpos anti-tRNA sintetases podem gerar o mesmo padrão
Citoplasmático pontilhado com pontos isolados	Anticorpo Anti-EEA1 e antifosfatidilserina. Sem associações clínicas definidas. Anticorpo anti-GWB. Associado à síndrome Sjögren primária, também observado em outras condições clínicas
Citoplasmático pontilhado reticulado	Anticorpo antimitocôndria. Marcador da cirrose biliar primária (M2), também visto na Esclerose sistêmica. É comum o encontro deste padrão na ausência de anticorpos antimitocôndria
Citoplasmático pontilhado fino denso	Anti PL7/PL12. Este padrão raramente pode estar associado a anticorpos encontrados na polimiosite. Antiproteína P-ribossomal. Este padrão ocorre no LES se a associação é com anti-proteína P ribossomal

## Quadro 2 – Padrões de FAN HEp-2 e relevâncias clínicas mais freqüentes

(continua)

Padrões	Relevância clínica por auto-anticorpos
Citoplasmático fibrilar filamentar	Anticorpo antivimentina e antiqueratina. Importante em doença hepática alcoólica. Descritos em várias doenças inflamatórias e infecciosas. Títulos baixos ou moderados podem não ter relevância clínica
Aparelho mitótico tipo ponte intercelular	Anticorpo anti-tubulina. Podem ser encontrados no LES e na doença mista do tecido conjuntivo. Outros anticorpos ainda não bem definidos podem gerar o mesmo padrão
Aparelho mitótico tipo NuMa1	Anticorpo anticentrosfilina ou NuMa1. Mais associado à síndrome de Sjögren. Descrito também em diversas outras doenças auto-imunes
Aparelho mitótico tipo NuMa2	Anticorpo anti-HsEg5. Associado a diversas condições auto-imunes com baixa especificidade
Padrão negativo	Ocorre FAN negativo em 1% de pacientes com LES (HEp-2). Nesta situação, os pacientes devem ser avaliados de acordo com a suspeita clínica, quanto à presença de anti-SS-A/Ro, anticardiolipina e anti-P ribossomal, que algumas vezes pode resultar em FAN negativo

(Fonte: Dellavance *et al.*, 2003)

### Padrões nucleares

Os padrões nucleares são divididos em três grandes categorias: membrana nuclear, homogêneo e pontilhado, conforme a classificação (Figura 1).

Segue abaixo a descrição de cada padrão nuclear e o aspecto microscópico encontrado.

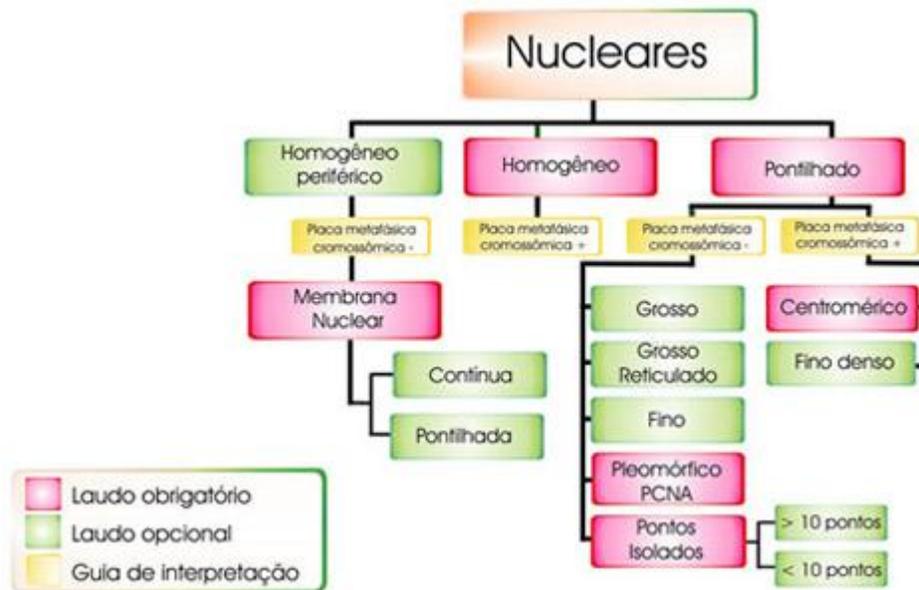


Figura 1 - Classificação esquemática de padrões nucleares (Fonte: Dellavance *et al.*, 2003)

### - Padrão tipo membrana nuclear

Esta denominação foi adotada para diferenciá-la do antigo padrão periférico utilizado quando do uso de *imprint* de fígado de rato, onde o DNA de dupla hélice se encontrava ancorado às proteínas da membrana nuclear, dando seu aspecto característico e que não encontra o mesmo significado quando do uso de células HEP-2. O período em que ocorre o ancoramento nestas células é muito curto e praticamente não encontrado na rotina laboratorial. O padrão é composto por uma fluorescência em toda a membrana nuclear (podendo ser emitida com informação adicional, em aspecto contínuo ou pontilhado). Não observamos fluorescência em nucléolos; a célula em divisão, em todos os estágios, e o citoplasma apresentam-se não-fluorescentes (Figura 2).

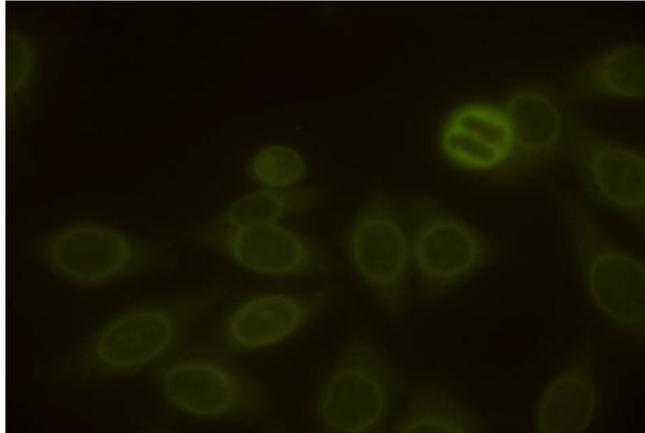


Figura 2 - Padrão de FAN do tipo membrana nuclear (Fonte: Dellavance *et al.*, 2003)

#### - Padrão homogêneo

Apresenta o nucleoplasma fluorescente. Não é possível distinguir a área de nucléolo. A célula em divisão, em todos os estágios, é fluorescente, com decoração homogênea dos cromossomos. Citoplasma normalmente não-fluorescente (Figura 3).

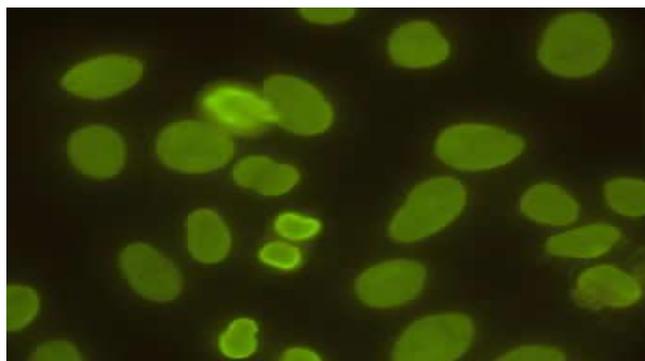


Figura 3 - Padrão de FAN do tipo homogêneo (Fonte: Dellavance *et al.*, 2003)

### - Padrão pontilhado

A dificuldade de diferenciação dos tamanhos e formas com que os grânulos se apresentam faz com que se considere obrigatório o laudo de padrão pontilhado. O grupo dos pontilhados é dividido em mitose fluorescente e não-fluorescente. No subgrupo da mitose não-fluorescente são considerados obrigatórios os padrões que se seguem:

#### **Pontilhado pleomórfico**

O nucleoplasma apresenta-se totalmente não-fluorescente na célula em fase G1 da interfase, passando a pontilhado com grânulos, variando de grosso, fino a fino denso na medida em que a célula evolui para as fases S e G2. Nucléolo, célula a partir da metáfase e citoplasma não-fluorescentes. Típico de PCNA (Figura 4).

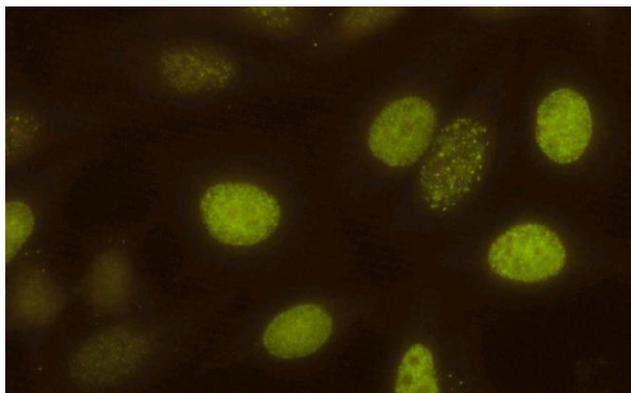
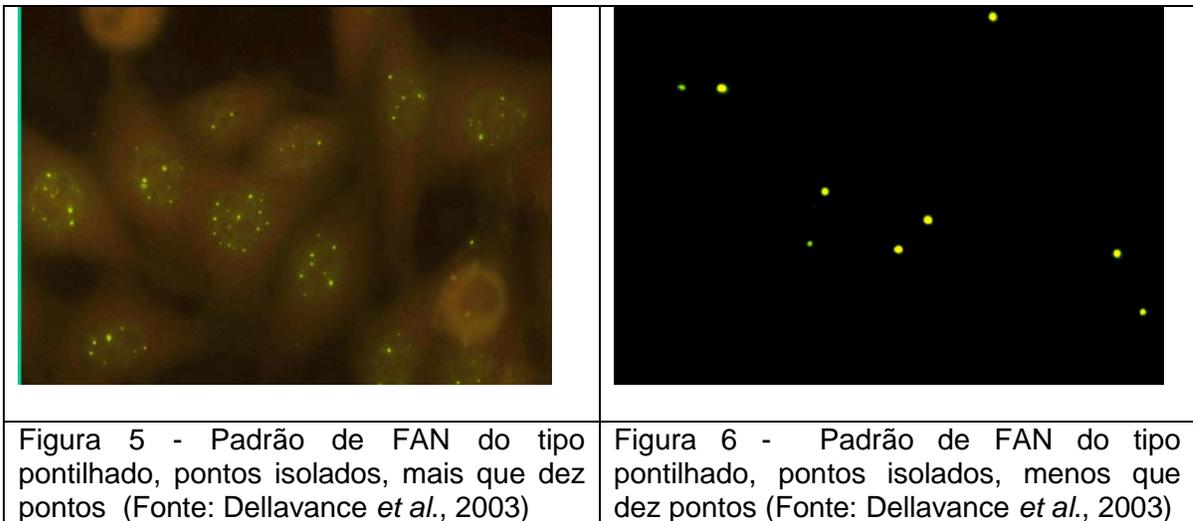


Figura 4 - Padrão de FAN do tipo pontilhado pleomórfico (Fonte: Dellavance *et al.*, 2003)

### **Pontilhado do tipo pontos isolados**

Nucleoplasma apresenta-se com pontos fluorescentes isolados, podendo ser fornecido, como informação adicional, o número de pontos maior ou igual a dez (Figura 5) ou menor do que dez pontos por núcleo (Figura 6). Nucléolo, célula em divisão e citoplasma não-fluorescentes.



### **Pontilhado grosso**

Nucleoplasma com grânulos de aspecto grosseiro. Nucléolo, célula em divisão e citoplasma não-fluorescentes (Figura 7).

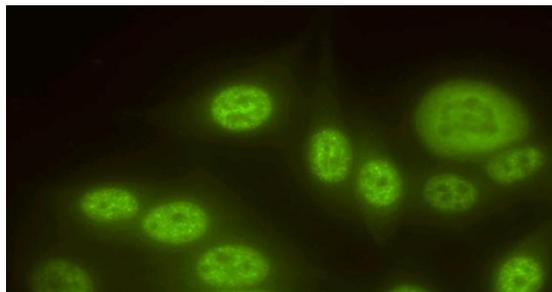


Figura 7 - Padrão de FAN do tipo pontilhado grosso (Fonte: Dellavance *et al.*, 2003)

### **Pontilhado grosso reticulado**

Nucleoplasma com grânulos de aspecto grosseiro que se organizam em retículos associados a antígenos da matriz celular. Nucléolo, célula em divisão e citoplasma não-fluorescentes (Figura 8).

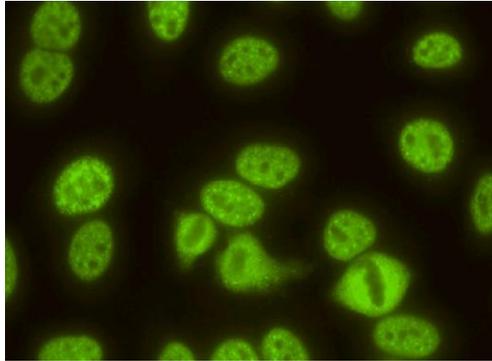


Figura 8 - Padrão de FAN do tipo pontilhado grosso reticulado (Fonte: Dellavance *et al.*, 2003)

### **Pontilhado fino**

Nucleoplasma com granulação fina. Nucléolo, célula em divisão e citoplasma não-fluorescentes (Figura 9).

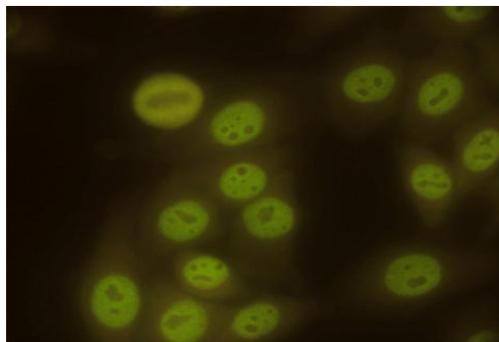


Figura 9 - Padrão de FAN do tipo pontilhado fino (Fonte: Dellavance *et al.*, 2003)

### **Pontilhado centromérico**

Nucleoplasma da célula apresenta-se em interfase, pontilhado com um número constante de 46 pontos. Nucléolo normalmente não-fluorescente, célula em divisão pontilhada e citoplasma não-fluorescente (Figura 10).

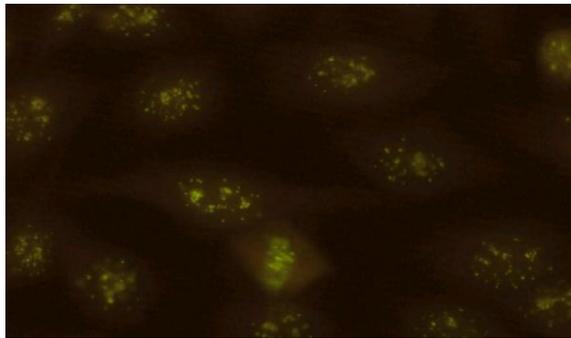


Figura 10 - Padrão de FAN do tipo pontilhado centromérico (Fonte: Dellavance *et al.*, 2003)

### **Pontilhado fino denso**

Nucleoplasma da célula em interfase apresenta-se como um pontilhado fino denso, de aspecto quase homogêneo, e nucléolo não-fluorescente. A célula em divisão também apresenta decoração em pontilhado fino denso, quase homogêneo, dos cromossomos, na placa metafásica, com citoplasma não-fluorescente (Figura 11).

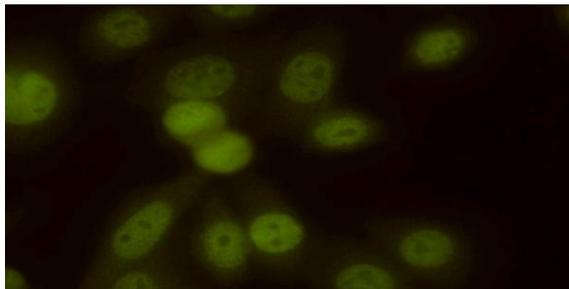


Figura 11 - Padrão de FAN do tipo pontilhado fino denso (Fonte: Dellavance *et al.*, 2003)

## Padrões nucleolares

São conhecidos três padrões nucleolares, conforme a classificação (Figura 12).

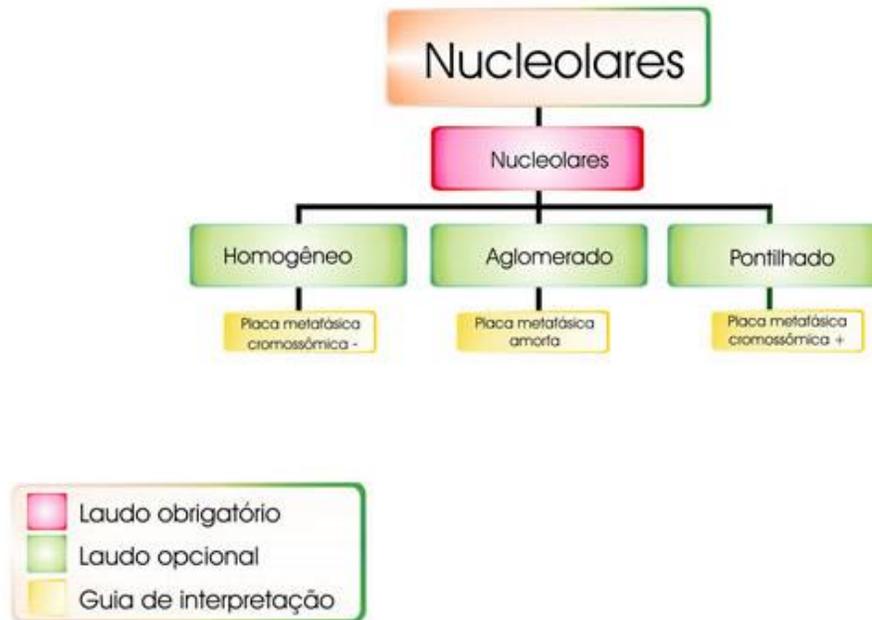


Figura 12 - Classificação esquemática de padrões nucleolares (Fonte: Dellavance *et al.*, 2003)

### - Nucleolar homogêneo

Nucléolo homogêneo, a célula em divisão e o citoplasma não-fluorescente (Figura 13).

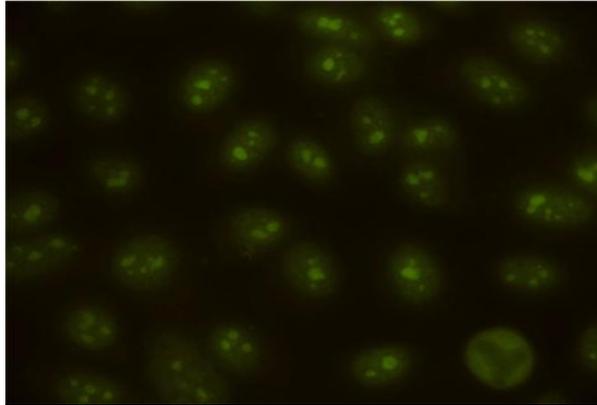


Figura 13 - Padrão de FAN do tipo nucleolar homogêneo (Fonte: Dellavance *et al.*, 2003)

#### - Nucleolar aglomerado

Coloração de forma indefinida nos cromossomos. O nucléolo se apresenta com grumos de intensa fluorescência. A célula em divisão mostra-se amorfa, com coloração indefinida dos cromossomos da placa metafásica. Citoplasma e núcleo não-fluorescentes (Figura 14).

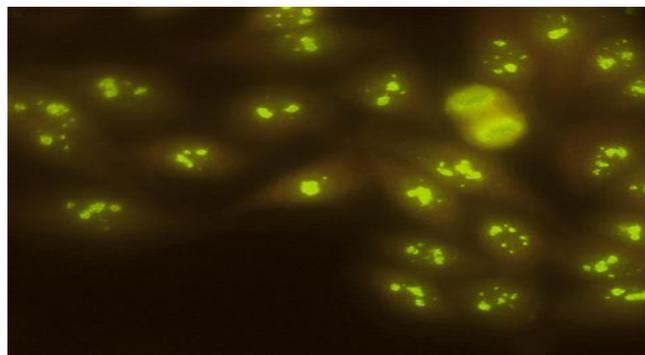


Figura 14 - Padrão de FAN do tipo nucleolar aglomerado (Fonte: Dellavance *et al.*, 2003)

## - Nucleolar pontilhado

O nucléolo apresenta-se com pontos isolados que tendem a confluir. A célula em divisão exhibe pontos isolados (máximo de dez) e brilhantes na placa de cromossomos em metáfase. Citoplasma normalmente não-fluorescente (Figura 15).

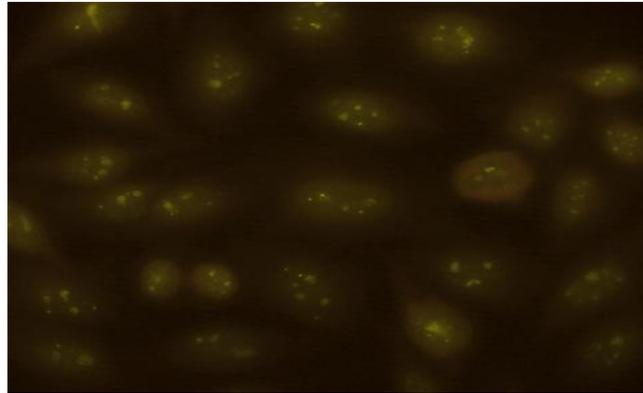


Figura 15 - Padrão de FAN do tipo nucleolar pontilhado (Fonte: Dellavance *et al.*, 2003)

Os padrões citoplasmáticos são divididos em dois grandes grupos: fibrilar e pontilhado, conforme a classificação (Figura 16).

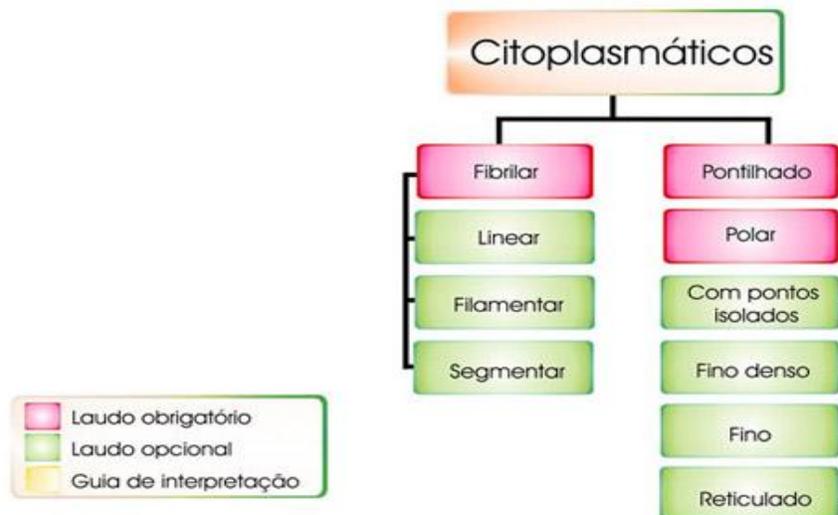


Figura 16 - Classificação esquemática dos padrões citoplasmáticos (Fonte: Dellavance *et al.*, 2003)

### - Citoplasmático fibrilar linear

Fibras de estresse que constituem o citoesqueleto decoradas de forma retilínea, cruzando toda a extensão da célula e não respeitando os limites nucleares. Núcleos e nucléolos não-fluorescentes (Figura 17).

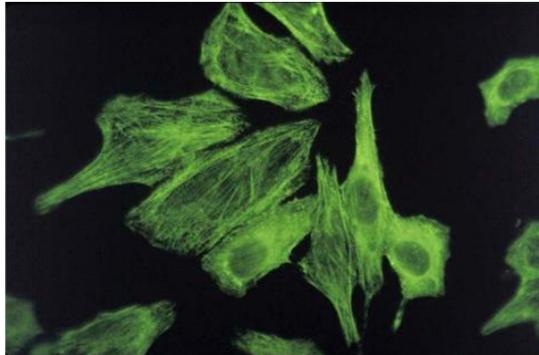


Figura 17 - Padrão de FAN do tipo citoplasmático fibrilar linear (Fonte: Dellavance *et al.*, 2003)

### - Citoplasmático fibrilar filamentar

Decoração de filamentos com acentuação uni ou bipolar em relação à membrana nuclear. Núcleos e nucléolos não-fluorescentes (Figura 18).

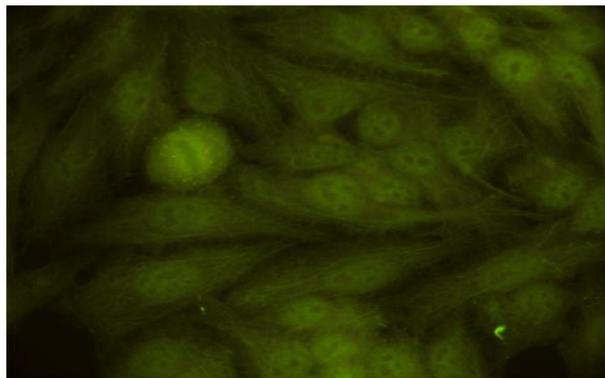


Figura 18 - Padrão de FAN do tipo citoplasmático fibrilar filamentar (Fonte: Dellavance *et al.*, 2003).

### **- Citoplasmático fibrilar segmentar**

Apenas segmentos curtos das fibras de estresse se encontram fluorescentes. Núcleo e nucléolos negativos. Nas células em divisão, podemos observar, eventualmente, grânulos intensamente fluorescentes que correspondem à forma globular das proteínas do citoplasma (Figura 19).

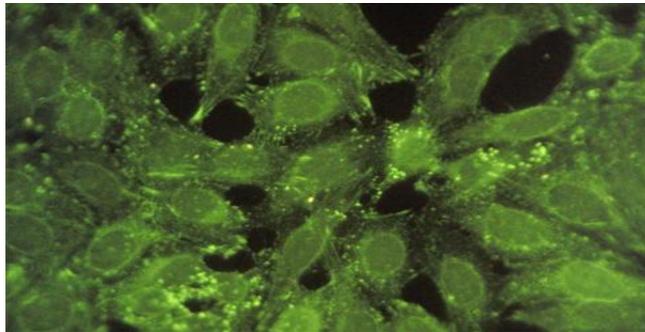


Figura 19 - Padrão de FAN do tipo citoplasmático fibrilar segmentar (Fonte: Dellavance *et al.*, 2003)

### **- Citoplasmático pontilhado polar**

Caracteriza-se por evidenciar cisternas do aparelho de Golgi. A decoração é apenas citoplasmática em pontos agrupados de situação perinuclear, normalmente em apenas um pólo nuclear. Núcleo, nucléolo e célula em divisão não-fluorescentes (Figura 20).

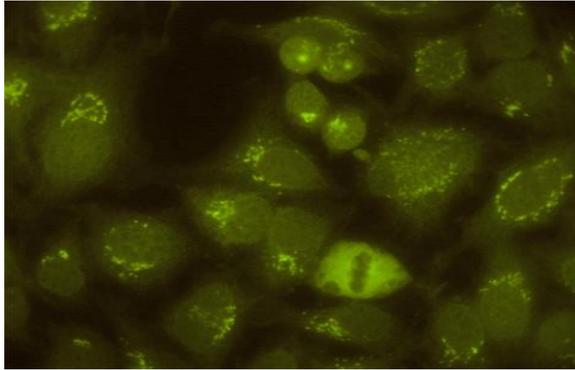


Figura 20 - Padrão de FAN do tipo citoplasmático pontilhado polar (Fonte: Dellavance *et al.*, 2003)

#### - Citoplasmático pontilhado com pontos isolados

Pontos definidos de número variável por toda a extensão do citoplasma. Núcleo, nucléolo e célula em divisão não-fluorescentes (Figura 21).

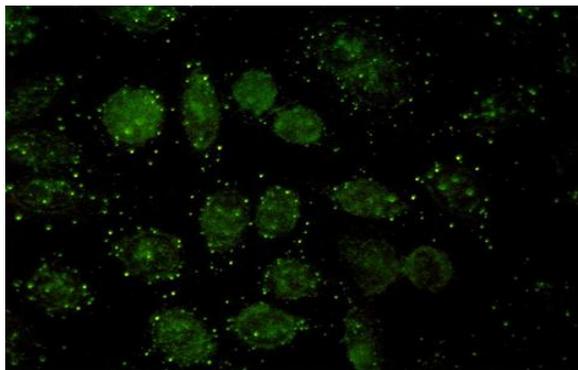


Figura 21 - Padrão de FAN do tipo citoplasmático pontilhado com pontos isolados (Fonte: Dellavance *et al.*, 2003)

#### - Citoplasmático pontilhado fino denso

Fluorescência de pontos finos, densos e confluentes, chegando à quase homogeneidade. O núcleo pode ou não apresentar uma leve decoração

homogênea na área do nucléolo. A célula em divisão é não-fluorescente (Figura 22).

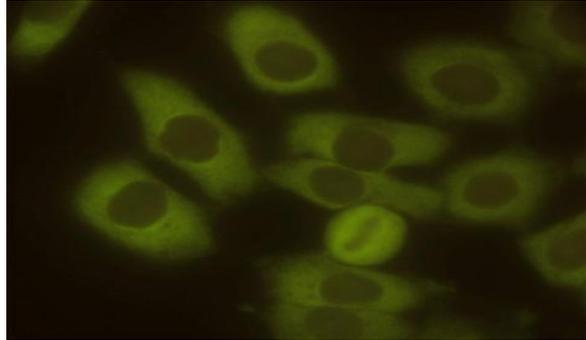


Figura 22 - Padrão de FAN do tipo citoplasmático pontilhado fino denso (Fonte: Dellavance *et al.*, 2003)

#### - Citoplasmático pontilhado fino

Pontos definidos em grande número e densidade; célula em divisão e nucléolo não-fluorescentes (Figura 23).

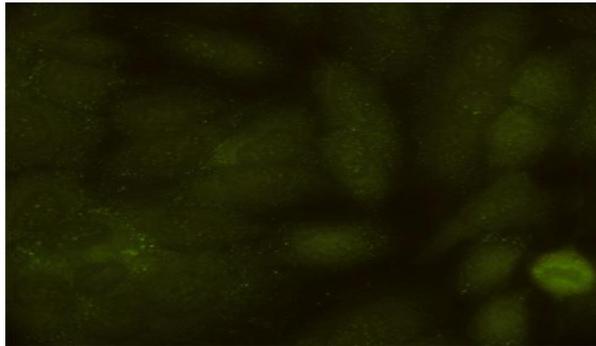


Figura 23 - Padrão de FAN do tipo citoplasmático pontilhado fino (Fonte: Dellavance *et al.*, 2003).

#### - Citoplasmático pontilhado reticulado

Fluorescência em retículo por todo o citoplasma. Núcleo, nucléolo e célula em divisão não-fluorescentes (Figura 24).

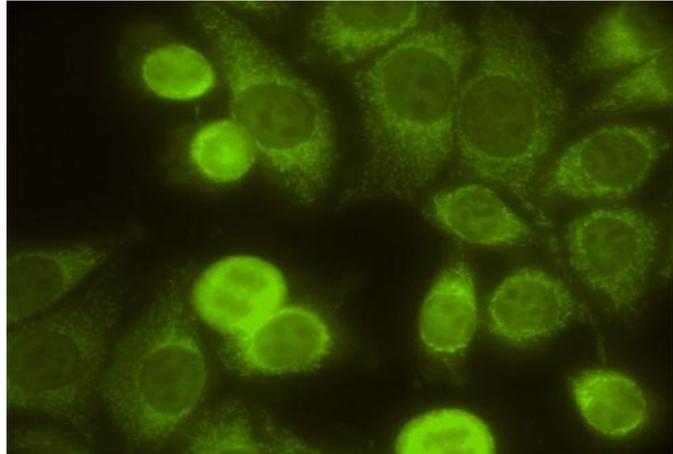


Figura 24 - Padrão de FAN do tipo citoplasmático pontilhado reticulado (Fonte: Dellavance *et al.*, 2003).

### Aparelho mitótico

O grupo de antígenos do aparelho mitótico é subdividido em três subgrupos de laudo, de acordo com a classificação (Figura 25).

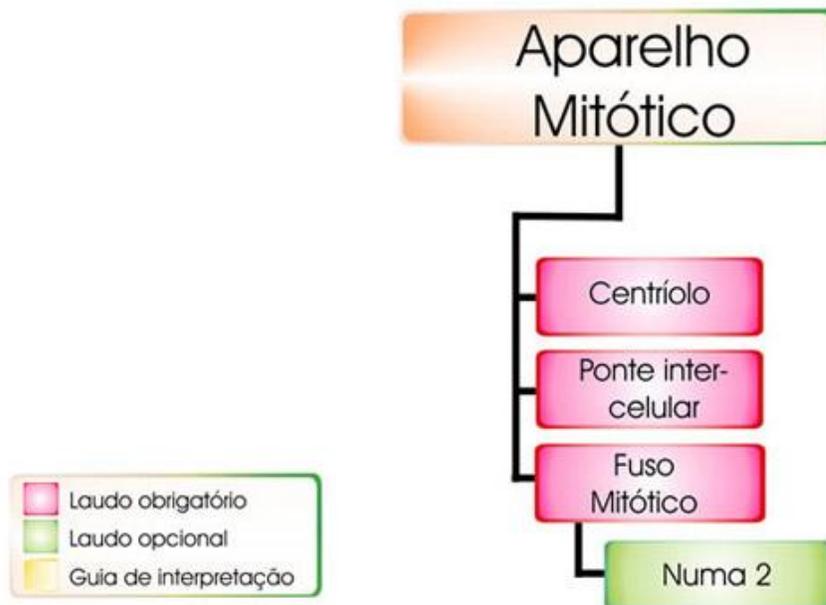


Figura 25 - Classificação esquemática de padrões do aparelho mitótico (Fonte: Dellavance *et al.*, 2003).

### - **Centríolo**

Ponto fluorescente isolado na célula em repouso (interfase) que se divide em dois e migra ao pólo oposto do núcleo à medida que a célula entra em divisão (Figura 26).

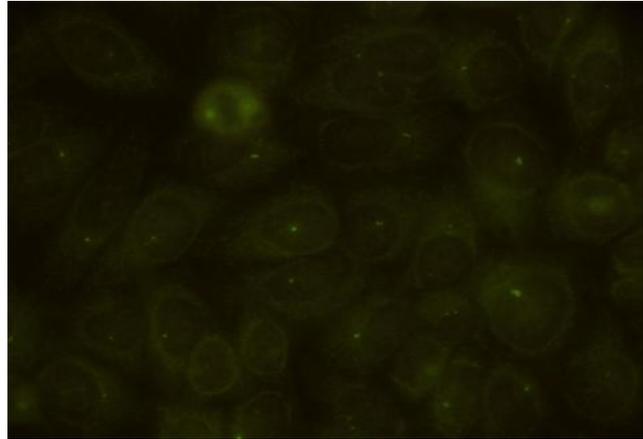


Figura 26 - Padrão centríolo (Fonte: Dellavance *et al.*, 2003)

### - **Ponte intercelular**

Antígenos que formam a união entre célula-mãe e célula-filha ao final da telófase. Podem ser observados com fluorescência intensa na ponte citoplasmática, que sofrerá clivagem ao final da divisão celular (Figura 27).

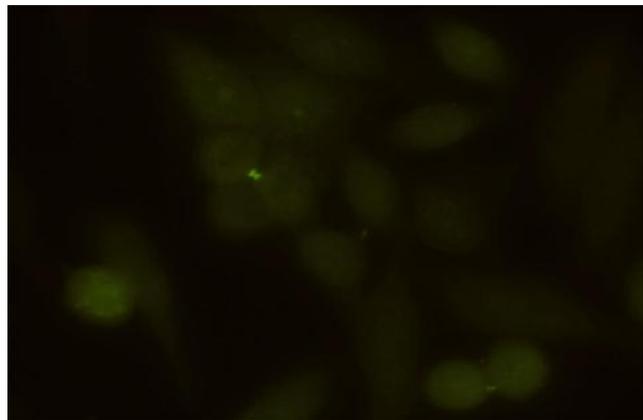


Figura 27 - Padrão de FAN do tipo ponte intercelular (Fonte: Dellavance *et al.*, 2003)

### - Fuso mitótico

O fuso mitótico poderá ser observado de forma diferenciada em duas situações: 1) na presença de anticorpos contra a proteína NuMa 1 (antígeno associado à mitose do tipo 1), encontramos intensa fluorescência do tipo pontilhado fino denso no nucleoplasma das células em repouso e decoração em cone dos pólos do fuso mitótico nas células que estão em mitose. Citoplasma não-fluorescente (Figura 28). 2) Na presença do antígeno NuMa 2, as células em repouso se encontram não-fluorescentes em todas as suas estruturas. Há decoração intensa e grosseira dos pólos mitóticos das células em divisão, e as pontes intercelulares são positivas em telófase. Citoplasma não-fluorescente (Figuras 29).

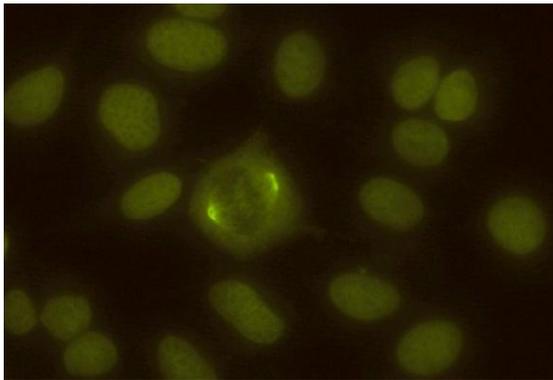


Figura 28 – Padrão de FAN do tipo aparelho mitótico-NuMa 1 (Fonte: Dellavance *et al.*, 2003)

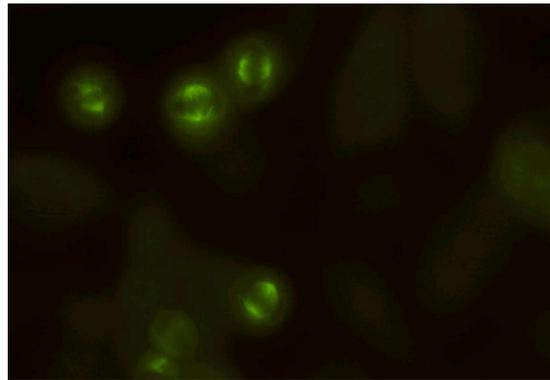


Figura 29 – Padrão de FAN do tipo aparelho mitótico-NuMa 2 (Fonte: Dellavance *et al.*, 2003)

## Padrões mistos

São padrões onde podemos observar associações de fluorescência de dois ou mais componentes relativos aos grupos principais (núcleo, nucléolo, citoplasma e aparelho mitótico), conforme a classificação (Figura 30) e as descrições abaixo.



Figura 30 - Classificação esquemática de padrões mistos (Fonte: Dellavance *et al.*, 2003)

- **Misto do tipo nucleolar homogêneo e nuclear pontilhado grosso com placa metafásica decorada em anel e cromossomos negativos** (Figura 31).

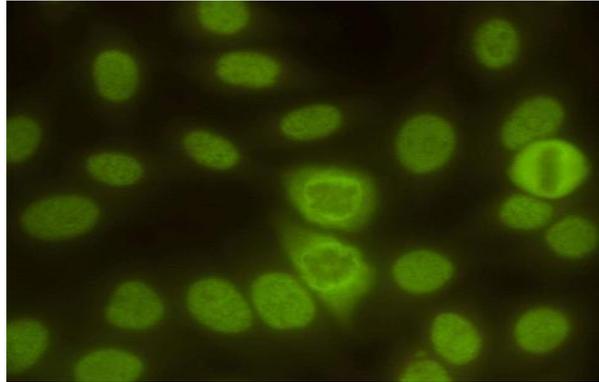


Figura 31 - Padrão de FAN do tipo misto nucleolar homogêneo e nuclear pontilhado grosso (Fonte: Dellavance *et al.*, 2003)

**- Misto do tipo nuclear e nucleolar pontilhado com placa metafásica positiva**

(Figura 32).

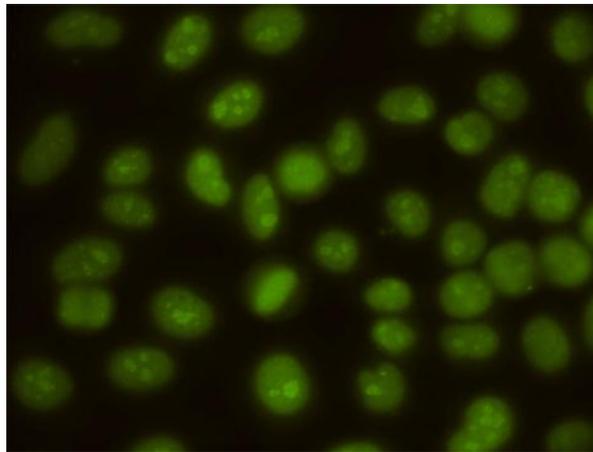


Figura 32 - Padrão de FAN do tipo misto nuclear e nucleolar pontilhado (Fonte: Dellavance *et al.*, 2003).

- **Misto do tipo citoplasmático pontilhado fino denso a homogêneo e nucleolar homogêneo** (Figura 33).

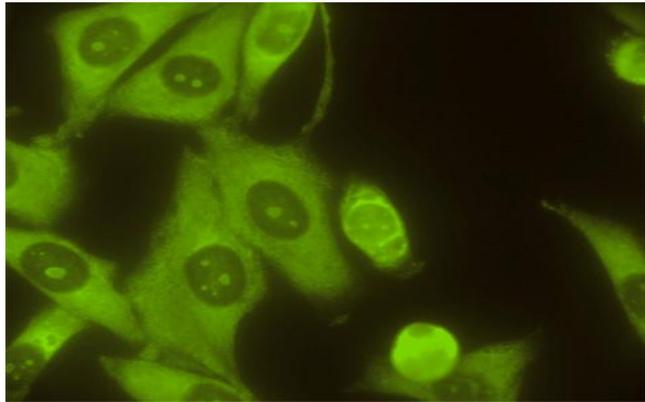


Figura 33 - Padrão de FAN do tipo misto citoplasmático pontilhado fino denso a homogêneo e nucleolar homogêneo (Fonte: Dellavance *et al.*, 2003).

- **Misto do tipo nuclear pontilhado fino com fluorescência do aparelho mitótico** (Figura 34).

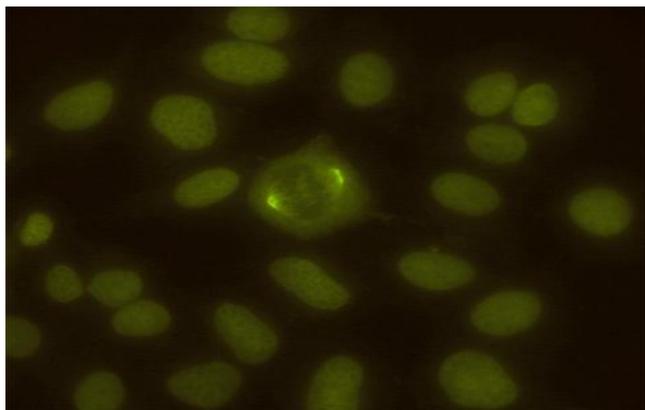


Figura 34 - Padrão de FAN do tipo misto nuclear pontilhado fino com fluorescência do aparelho mitótico (Fonte: Dellavance *et al.*, 2003).

## 1.6 OBJETIVOS

### 1.6.1 **Objetivo Geral**

Determinar a presença de auto-anticorpos contra antígenos celulares em pacientes com infecção pelo VD e HTLV - 1 e 2, procedentes do município de Belém-PA.

### 1.6.2 **Objetivos Específicos**

(I) Descrever a prevalência de auto-anticorpos contra antígenos celulares em pacientes com diagnóstico clínico e laboratorial de infecção pelo VD;

(II) Estabelecer possíveis correlações entre a prevalência de auto-anticorpos contra antígenos celulares e sorotipos de VD;

(III) Descrever a prevalência de auto-anticorpos contra antígenos celulares em pacientes, sintomáticos ou assintomáticos, com diagnóstico clínico e laboratorial de infecção pelo HTLV - 1 e 2;

(IV) Correlacionar a prevalência de auto-anticorpos contra antígenos celulares entre pacientes do grupo com infecção pelo VD e pacientes do grupo com infecção pelo HTLV - 1 e 2.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 GRUPOS POPULACIONAIS ESTUDADOS**

Foi realizado um estudo de prevalência, com seleção de duas amostras de pacientes, procedentes do município de Belém-PA, infectados pelos VD e HTLV - 1 e 2. Trata-se de uma amostra de conveniência, selecionada nos serviços de referência para a assistência destes casos. O tamanho da amostra foi estimado considerando informações, não publicadas, fornecidas pela Fundação HEMOPA, sobre a prevalência da infecção pelo HTLV - 1 e 2 e pela Secretaria de Saúde do Município de Belém (SESMA), sobre o número de casos de dengue no município. Obteve-se a informação de prevalência de 0,6 por 100 candidatos a doadores de sangue no caso do HTLV - 1 e 1.021 casos de dengue notificados no ano de 2006.

#### **2.1.1 Pacientes com diagnóstico clínico e laboratorial de HTLV - 1 e 2**

Este grupo foi composto por 30 pacientes procedentes do Hospital Universitário João de Barros Barreto e do Núcleo de Medicina Tropical da UFPA e confirmados laboratorialmente por sorologia (ELISA) e PCR, realizadas no Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará.

Todos foram submetidos a avaliação clínica, com ênfase ao exame neurológico e foram assim classificados: 23 infectados pelo HTLV - 1 e 7 pelo HTLV - 2, sendo que 16 eram assintomáticos. Dos 14 sintomáticos, 11 apresentavam distúrbio neurodegenerativo típico de Paraparesia Espástica

Tropical/Mielopatia Associada ao HTLV-1 (PET/MAH), e 3 com manifestações dermatológicas.

### **2.1.2 Pacientes com diagnóstico laboratorial para o vírus da dengue**

Este grupo foi formado por 30 pacientes atendidos no Laboratório de Arbovírus do Instituto Evandro Chagas (SVS/MS), onde foi realizada a obtenção das amostras sanguíneas e a confirmação laboratorial, sendo 08 amostras de pacientes com infecção pelo sorotipo DEN1, 2 pelo DEN2 e 20 pelo DEN3.

### **2.1.3 Grupo não infectado**

Foram utilizadas 100 amostras de indivíduos doadores de sangue com sorologia negativa para HTLV - 1 e 2, Sífilis, HIV, Doença de Chagas, Hepatite B e Hepatite C, procedentes da Fundação HEMOPA. Em todas as amostras foram realizadas sorologia para o VD, com resultados negativos.

## **2.2 PRECEITOS ÉTICOS**

O projeto foi submetido e aprovado obedecendo as Normas de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (Resolução CNS 196/96) do Conselho Nacional de Saúde, no Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação HEMOPA e após assinatura pelos pacientes ou respectivos responsáveis, do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXOS 1 e 2).

## 2.3 COLETA DE MATERIAL

As amostras de sangue foram obtidas com sistema de colheita a vácuo em dois tubos, sem anticoagulante, nos seguintes serviços: Fundação HEMOPA, Ambulatório de Doenças Neurológicas do Hospital Universitário João de Barros Barreto, Núcleo de Medicina Tropical da UFPA e na soroteca do Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, para as amostras referentes ao HTLV - 1 e 2 e no Ambulatório e soroteca do Laboratório de Arbovírus, do Instituto Evandro Chagas (SVS/MS), para as amostras de pacientes com infecção pelo VD.

As amostras de sangue foram transportadas ao Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, sendo processadas e congeladas à -20°C até o momento do uso.

## 2.4 MÉTODO LABORATORIAL

### **2.4.1 Técnica da pesquisa de auto-anticorpos anti-nucleares (FAN) em células HEp-2**

A pesquisa de auto-anticorpos contra antígenos celulares foi realizada pela técnica de imunofluorescência indireta que os identifica através da ligação destes auto-anticorpos aos antígenos do substrato, sendo esta ligação revelada pela adição de um soro com atividade anti-IgG conjugado à fluoresceína.

As amostras foram testadas utilizando-se um conjunto diagnóstico comercial Antinuclear Antibody HEp-2, da empresa Hemagen Diagnostics.

Na primeira fase da reação, os soros diluídos 1/40 foram colocados em contato com o substrato durante 20 minutos, em temperatura ambiente, seguido de lavagem com solução salina tamponada (PBS) por 10 minutos. Na segunda fase, aplicou-se a substância fluorescente, sendo o conjugado diluído 1/30 em PBS, deixando-se por 20 minutos em temperatura ambiente, seguida de nova lavagem de 10 minutos com PBS e montagem da lâmina com glicerina tamponada.

Em cada lâmina foi utilizado controle positivo e controle negativo.

A leitura das lâminas foi realizada em microscópio de imunofluorescência, marca Nikon, modelo Eclipse E-200, utilizando-se lentes oculares de 10X e objetiva de 40X.

Os critérios morfológicos observados durante a leitura foram: a) aspecto da matriz nuclear; b) aspecto do nucléolo; c) observação de todos os estágios de divisão celular; d) aspecto do fuso mitótico; e) aspecto do citoplasma.

## 2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram armazenados por meio de planilhas no programa Microsoft Excel 2003 e posteriormente submetidos à análise descritiva e de associações pelo Teste G e Teste Exato de Fisher, sob a forma de tabelas de freqüências, adotando o nível de significância de 0,05. Todas as análises foram processadas utilizando o programa Bioestat 5.0 (Ayres *et al.*, 2007).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 CARACTERÍSTICAS DOS GRUPOS EXAMINADOS

Foram examinados três grupos de pessoas quanto a presença de auto-anticorpos: Grupo 1 – pacientes com infecção pelo VD (n= 30); Grupo 2 – pacientes com infecção pelos HTLV - 1 e 2 (n= 30), Grupo 3 - doadores de sangue (n= 100) não infectados e sem manifestações clínicas aparentes.

O Grupo 1 foi constituído por 17 homens e 13 mulheres, sem diferença estatística, ( $p= 0,4652$ ), enquanto o Grupo 2 tinha 09 homens e 21 mulheres, predomínio significativo de mulheres ( $p= 0,0285$ ), e no Grupo 3 constavam 78 homens e 22 mulheres, predomínio significativo de homens ( $p= 0,0001$ ) (Tabela 1).

**Tabela 1** – Distribuição dos grupos populacionais estudados de acordo com o sexo

Gênero	Grupos					
	Grupo 1 <sup>a</sup>		Grupo 2 <sup>b</sup>		Grupo 3 <sup>c</sup>	
	n	%	n	%	n	%
Masculino	17	56,7	09	30,0	78	78,0
Feminino	13	43,3	21	70,0	22	22,0
Total	30	100	30	100	100	100

(a)  $p= 0,4652$ ; (b)  $p= 0,0285$ ; (c)  $p= 0,0001$

A informação sobre faixa etária só foi disponível para o Grupo 2 (Tabela 2), onde se observou uma predominância significativa ( $p= 0,0130$ ) de indivíduos entre 21 a 60 anos.

**Tabela 2** – Distribuição por faixa etária do grupo de pessoas infectadas pelos HTLV - 1 e 2

<b>Faixa etária (anos)</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
≤ 20	1	3,3
21 – 40	10	33,3
41 – 60	11	36,7*
> 60	3	10,0
Sem informação	5	16,7
Total	30	100

\*( $p= 0,0130$ )

### 3.2. PREVALÊNCIA DE AUTO-ANTICORPOS CONTRA ANTÍGENOS CELULARES ENTRE INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO VD

Os indivíduos do Grupo 1 estavam infectados por três espécies do VD com predominância ( $p= 0,002$ ) para o DEN 3 (66,7%) (Tabela 3).

**Tabela 3** – Distribuição dos indivíduos examinados de acordo com a espécie de VD infectante

<b>Sorotipo</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
DEN 1	8	26,7
DEN 2	2	6,7
DEN 3	20	66,7*
Total	30	100

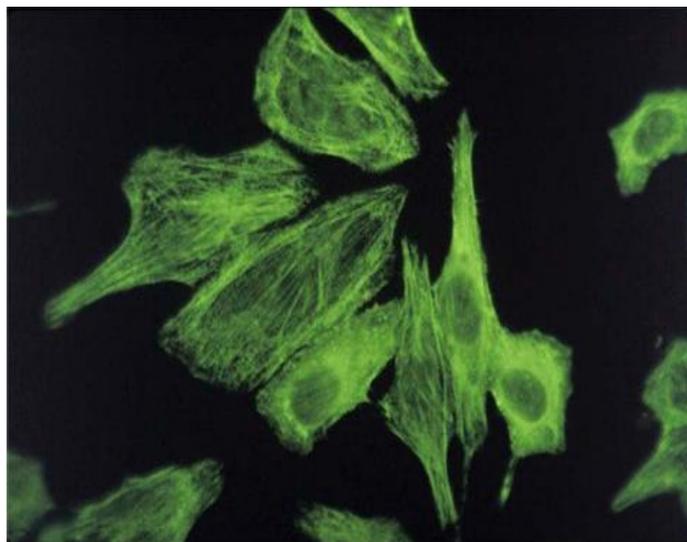
\*( $p= 0,002$ )

A pesquisa de ANA no Grupo 1 foi positiva em 40% (n=12) dos pacientes estudados, mostrando maior prevalência do padrão citoplasmático em relação ao padrão nuclear; no Grupo 3 a prevalência foi de 2% (2/100), com positividade apenas para o padrão citoplasmático. (Tabela 4, Figuras 35 e 36).

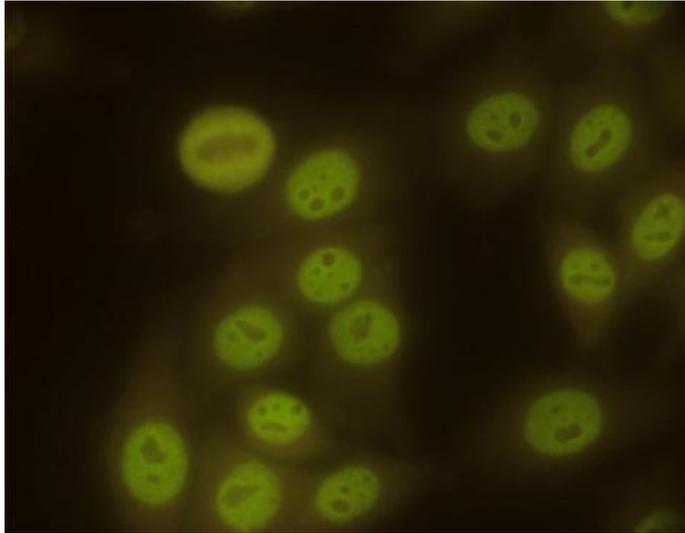
**Tabela 4** – Prevalência de auto-anticorpos de acordo com o padrão em pessoas infectadas pelo Vírus da dengue e grupo controle

Auto anticorpos	Grupo 1		Grupo 3	
	n	%	n	%
Citoplasmático	10	33,3	02	02
Nuclear	02	6,7	0	0
Negativo	18	60	98	98
Total*	30	100	100	100

\*Teste G (  $p < 0,0001$  )



**Figura 35** – Imunofluorescência indireta em células HEp-2, mostrando a presença de anticorpos contra antígenos celulares, com padrão citoplasmático, em um indivíduo infectado pelo VD1 (aumento 400X)



**Figura 36** – Imunofluorescência indireta em células HEp-2, mostrando a presença de anticorpos contra antígenos celulares, com padrão nuclear, em um indivíduo infectado pelo VD2 (aumento 400X).

A correlação tanto da prevalência quanto do padrão de ANA com o sexo, não foi significativa ( $p= 0,5474$  e  $p= 0,2175$ ) entre os indivíduos infectados pelo VD (Tabelas 5 e 6). Os dois indivíduos do Grupo 3, positivos para ANA, foram do sexo masculino.

**Tabela 5** – Prevalência de ANA, de acordo com o sexo, em pessoas infectadas pelo VD

Auto anticorpos	Sexo			
	Masculino		Feminino	
	n	%	n	%
Presente	6	35,3	6	46,2
Ausente	11	64,7	7	53,8
Total	17	100	13	100

Teste G ( $p = 0,5474$ )

**Tabela 6** – Distribuição dos padrões de ANA de acordo com o sexo, no grupo de indivíduos infectados pelo VD

Auto anticorpos	Sexo			
	Masculino		Feminino	
	n	%	n	%
Citoplasmático	6	35,3	4	30,8
Nuclear	0	0	2	15,4
Negativo	11	64,7	7	53,8
Total	17	100	13	100

Teste G ( $p = 0.2175$ )

A distribuição da frequência de ANA entre indivíduos infectados pelo VD, de acordo com a espécie, está descrita na Tabela 7. Foi possível mostrar uma diferença significativa ( $p= 0,0260$ ) entre as infecções pelo VD1 ( $p= 0,0644$ ) e VD2 ( $p= 0,0249$ ), em relação ao VD3. Entretanto, a comparação da frequência, de acordo com o padrão de ANA (Tabela 8) não mostrou diferença significativa ( $p= 0,2479$ ).

**Tabela 7** – Prevalência de ANA de acordo com a espécie de VD infectante

Auto anticorpos	Espécies de VD					
	DEN 1		DEN 2		DEN 3	
	n	%	n	%	n	%
Presente	5	62,5	2	100	5	25
Ausente	3	37,5	0	0	15	75
Total	8	100	2	100	20	100

Teste G ( $p= 0,0260$ ); DEN1 vs 2 ( $p=0,2014$ ); DEN1 vs 3 ( $p=0,0644$ ); DEN2 vs 3 ( $p= 0,0249$ )

**Tabela 8** – Distribuição dos padrões de ANA de acordo com a espécie de VD infectante

Auto anticorpos	Espécies					
	DEN 1		DEN 2		DEN 3	
	n	%	n	%	n	%
Citoplasmático	4	50	2	100	4	20
Nuclear	1	12,5	0	0	1	5
Negativo	3	37,5	0	0	15	75
Total	8	100	2	100	20	100

Teste G ( $p = 0,2479$ )

### 3.3. PREVALÊNCIA DE AUTO-ANTICORPOS CONTRA ANTÍGENOS CELULARES ENTRE INDIVÍDUOS INFECTADOS PELOS HTLV - 1 e 2

No Grupo 2 houve um predomínio ( $p= 0,0035$ ) de indivíduos infectados pelo HTLV-1 (76,7%), em relação aos infectados pelo HTLV-2 (Tabela 9). A maioria dos infectados, não apresentava sintomas clínicos ( $p= 0,0136$ ), e 36,7% mostrava doença compatível com PET/MAH (Tabela 10).

**Tabela 9** - Distribuição de indivíduos examinados de acordo com o tipo de HTLV infectante

Tipo de HTLV	N	%
HTLV - 1	23	76,7*
HTLV - 2	7	23,3
Total	30	100

\*( $p= 0,0035$ )

**Tabela 10** – Distribuição de indivíduos infectados pelos HTLV – 1 e 2, de acordo com as manifestações clínicas

<b>Manifestações clínicas</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Assintomáticos	16	53,3*
Neurológicas (PET/MAH)	11	36,7
Dermatológicas	3	10,0
Total	30	100

\*( $p= 0,0136$ )

A pesquisa de ANA no Grupo 2 foi positiva em 40% (n=12), predominando significativamente ( $p= 0,0055$ ) o padrão citoplasmático (n= 8) em relação ao padrão nuclear (n= 4). No Grupo 3 a prevalência foi de 2% (2/100), observando-se apenas o padrão citoplasmático (Tabela 11).

**Tabela 11** - Distribuição de prevalência de acordo com o padrão de ANA em indivíduos com HTLV - 1 e 2 e Grupo controle

<b>Auto anticorpos</b>	<b>Grupo 2</b>		<b>Grupo 3</b>	
	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Citoplasmático	08	26,7	02	2
Nuclear	04	13,3	0	0
Negativo	18	60	98	98
Total*	30	100	100	100

Teste G ( $p < 0,0001$ )

Entre os indivíduos do Grupo 2 não foram observadas diferenças significativas na correlação, tanto da prevalência quanto do padrão ( $p > 0,05$ ) de ANA com o sexo (Tabelas 12 e 13; Figuras 37 e 38). Os dois indivíduos do Grupo 3, positivos para ANA foram do sexo masculino.

**Tabela 12** – Distribuição da prevalência de ANA, de acordo com o sexo, em pacientes infectados pelos HTLV - 1 e 2

Auto anticorpos	Sexo			
	Masculino		Feminino	
	n	%	n	%
Presente	3	33,3	9	42,9
Ausente	6	66,7	12	57,1
Total	9	100	21	100

Teste G ( $p = 0,6233$ )

**Tabela 13** - Distribuição dos padrões de ANA de acordo com o sexo, em indivíduos infectados pelos HTLV - 1 e 2

Auto anticorpos	Sexo			
	Masculino		Feminino	
	n	%	n	%
Citoplasmático	2	66,7	6	66,7
Nuclear	1	33,3	3	33,3
Total	3	100	9	100

Exato de Fisher ( $p = 0,7636$ )

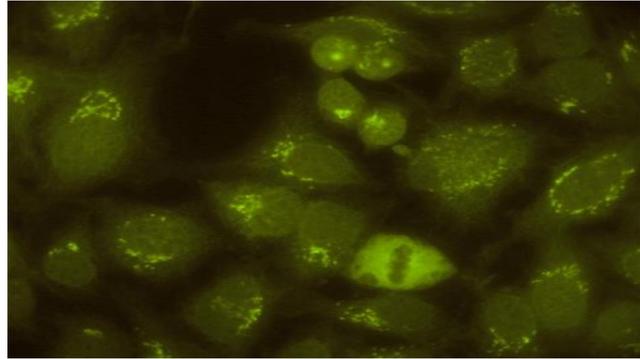


Figura 37 – Imunofluorescência indireta em células HEp-2, mostrando a presença de anticorpos contra antígenos celulares, com padrão citoplasmático, em um indivíduo infectado pelo HTLV-1 (aumento 400X).

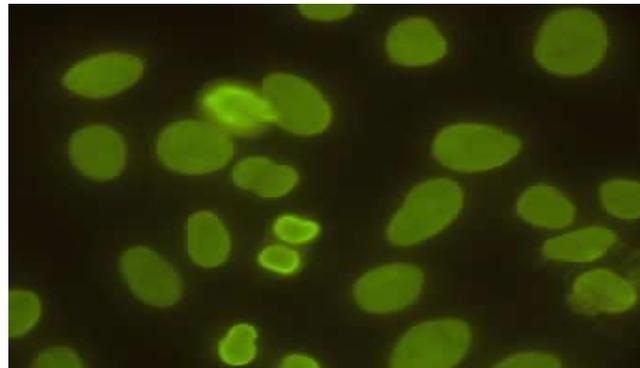


Figura 38 – Imunofluorescência indireta em células HEp-2, mostrando a presença de anticorpos contra antígenos celulares, com padrão nuclear, em um indivíduo infectado pelo HTLV-1 (aumento 400X).

A prevalência e o padrão de ANA não mostraram correlação com o sorotipo de HTLV ( $p= 0,4740$  e  $p= 0,3639$ ), como pode ser observado nas Tabelas 14 e 15, respectivamente.

**Tabela 14** – Distribuição da prevalência de ANA de acordo com o tipo de HTLV infectante.

Auto anticorpos	Tipo de HTLV			
	HTLV-1		HTLV-2	
	n	%	n	%
Presente	10	43,5	2	28,6
Ausente	13	56,5	5	71,4
Total	23	100	7	100

Teste G ( $p= 0,4740$ )

**Tabela 15** - Distribuição dos padrões de ANA de acordo com o tipo do HTLV infectante

Auto anticorpos	Tipo de HTLV			
	HTLV-1		HTLV-2	
	n	%	n	%
Citoplasmático	6	26,1	2	28,6
Nuclear	4	17,4	0	0
Negativo	13	56,5	5	71,4
Total	23	100	7	100

Teste G ( $p = 0.3639$ )

A presença de ANA ocorreu com frequência de 42,9% entre sintomáticos e 37,5% nos assintomáticos (Tabela 16), não sendo esta diferença considerada estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ), do mesmo modo quando se estratificou as manifestações clínicas neurológicas e dermatológicas dos indivíduos sintomáticos (Tabela 17).

**Tabela 16** – Distribuição de ANA entre indivíduos infectados pelos HTLV – 1 e 2, de acordo com a presença de sintomas

Autoanticorpos	Manifestações clínicas			
	Sintomáticos		Assintomáticos	
	N	%	n	%
Presente	6	42,9	6	37,5
Ausente	8	57,1	10	62,5
Total	14	100	16	100

Teste G ( $p = 0,7651$ )

**Tabela 17** – Distribuição de ANA entre indivíduos infectados pelos HTLV -1 e 2, de acordo com as manifestações clínicas

Auto anticorpos	Manifestações Clínicas					
	Assintomáticos (a)		Neurológicas (PET/MAH) (b)		Dermatológicas (c)	
	n	%	n	%	N	%
Presente	6	37,5	4	36,4	2	66,7
Ausente	10	62,5	7	63,6	1	33,3
Total	16	100	11	100	3	100

Teste G ( $p = 0,9710$ ); a vs b ( $p=0,9521$ ); a vs c ( $p=0,3496$ ); b vs c ( $p=0,3477$ )

3.4. CORRELAÇÃO DA PREVALÊNCIA DE AUTO-ANTICORPOS CONTRA ANTÍGENOS CELULARES ENTRE INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO VD E HTLV - 1 E 2.

A frequência de ANA e sua distribuição de acordo com o padrão citoplasmático ou nuclear não mostrou diferença significativa ( $p > 0,05$ ) quando os Grupos 1 e 2 foram comparados entre si. Entretanto, quando se estabeleceu a comparação com o Grupo 3 a frequência foi altamente significativa ( $p < 0,0001$ ), mas sem diferenças em relação ao padrão ( $p = 0,6699$ ) (Tabelas 18 e 19).

**Tabela 18** – Correlação da prevalência de ANA entre indivíduos dos três grupos estudados

Auto anticorpos	Grupos					
	Grupo 1 <sup>(a)</sup>		Grupo 2 <sup>(b)</sup>		Grupo 3 <sup>(c)</sup>	
	Dengue		HTLV - 1 e 2		Controle	
	n	%	n	%	n	%
Sim	12	40	12	40	2	2
Não	18	60	18	60	98	98
Total	30	100	30	100	100	100

Teste G: a vs b ( $p > 0,05$ ); a vs c ( $p < 0,0001$ ); b vs c ( $p < 0,0001$ ); a e b vs c ( $p < 0,0001$ )

**Tabela 19** – Correlação da prevalência de padrão de ANA entre indivíduos com infecção pelo VD e HTLV - 1 e 2

Auto anticorpos	Grupos					
	Grupo 1 <sup>(a)</sup>		Grupo 2 <sup>(b)</sup>		Grupo 3 <sup>(c)</sup>	
	Dengue (n=30)		HTLV 1/2 (n=30)		Controle (n= 100)	
	n	%	N	%	n	%
Frequência de ANA	12	40,0	12	40,0	2	2
Citoplasmático	10	33,3	8	26,7	2	2
Nuclear	2	6,7	4	13,3	0	0

Teste G ( $p = 0,6529$ ); a vs b ( $p=0,6536$ ); a vs c ( $p=0,7831$ ); b vs c ( $p=0,5941$ ); a e b vs c ( $p=0,6699$ )

#### 4. DISCUSSÃO

A imunofluorescência indireta em células HEP-2 (FAN HEP-2) é o teste de escolha para a pesquisa de auto-anticorpos contra antígenos celulares (Dellavance *et al.*, 2003) e um resultado interpretado como reagente não significa somente a presença de auto-anticorpos contra elementos do núcleo. A variabilidade de interpretação deve-se à multiplicidade de elementos intranucleares, nucleolares e intracitoplasmáticos, potencialmente capazes de se comportar como antígenos frente a condições diversas, o que nem sempre se traduz em doença (Andrade *et al.*, 1996).

Os resultados encontrados devem estar em associação com a clínica, os padrões de fluorescência observados na célula-alvo e os títulos alcançados com a diluição prévia do soro do paciente. Um resultado de ANA positivo pode significar desde um quadro de doença até uma característica familiar, com probabilidade ou não, de o portador vir a desenvolver determinada colagenose frente á estímulos variados ao longo dos anos, ou mesmo a real presença de doença auto-imune (Dellavance *et al.*, 2003). Segundo Bonfá *et al.* (1987) e Inokuchi *et al.* (2006), é possível ocorrer positividade em uma parcela da população normal e na presença de doenças crônicas, como a cirrose biliar, infecções virais diversas, o uso de medicamentos e neoplasias.

A pesquisa de anticorpos contra antígenos celulares requer permanente revisão das informações que norteiam a interpretação dos resultados obtidos, visto

que o aparecimento de auto-anticorpos anti-nucleares (ANA) é observado cada vez mais em doenças de natureza não imune.

Entre as possíveis interpretações de um resultado positivo do teste FAN-HEp-2 incluem-se: a associação com doença auto-imune, o traço incompleto de diátese autoimune familiar, o achado precoce de doença autoimune, distúrbio imunológico transitório ou uma manifestação mínima de doença auto-imune espectral (Dellavance & Andrade, 2007).

A infecção por agentes infecciosos pode atuar como um desencadeador de resposta autoimune, principalmente pelo mecanismo de mimetismo molecular. Assim sendo, o presente trabalho usou, dois agentes virais como modelos, as infecções pelos VD e HTLV - 1 e 2, com a finalidade de investigar o papel desses agentes como deflagradores de processos de autoimunidade, identificados por meio do FAN.

Os grupos populacionais examinados para a presença de ANA que mostravam infecção aguda pelos VD e infecção persistente pelos HTLV-1 e 2, mostraram algumas semelhanças quanto a sua composição, de acordo com o sexo, e com o que é observado na epidemiologia descritiva desses vírus. É comum a observação da frequência de infecção pelo VD ser parecido entre homens e mulheres em razão da semelhança de exposição ao vetor do vírus (Hung *et al.*, 2004; Teixeira *et al.*, 2003). Entretanto, para o HTLV, é comum a observação de um predomínio de mulheres acima de 20 anos infectadas pelo HTLV-1 em áreas urbanas, em contraposição às infecções pelo HTLV-2 em comunidades indígenas quando não se observam diferenças quanto ao sexo

(Ishak *et al.*, 1995; Vitek *et al.*, 1995; Kaplan *et al.*, 1996). Portanto, a formação dos grupos é um reflexo da distribuição dos vírus entre populações humanas.

O DEN 3 foi o mais prevalente entre os pacientes infectados pelo VD, o que corrobora a sua maior circulação no momento da coleta das amostras na epidemia em questão. Três espécies do vírus, DEN1, DEN2 e DEN3, estariam circulando em 25 Estados brasileiros (Ministério da Saúde, 2005) apresentando uma alta taxa de propagação e geração de pequenas e grandes epidemias seqüenciais (Pinheiro *et al.*, 2005), as quais variam de acordo com o período e a região geográfica (Figueiredo, 1999).

Entre os infectados pelo HTLV, os casos sintomáticos de PET/MAH, resultante da infecção pelo HTLV-1, mostraram também prevalência de doença compatível com o já descrito em outros locais do Brasil (Casseb & Penalva-de-Oliveira, 2000; Lima, 2006).

A infecção pelo VD ocasiona não apenas uma doença aguda febril, mas também duas complicações adicionais como a FHD e a SCD. Nas duas situações clínicas, existe uma participação direta do VD, assim como, uma resposta imunológica exacerbada e a produção de inúmeras citocinas associadas (Figueiredo, 1999). A resposta imunológica efetuada por meio de anticorpos direcionados à espécies heterotípicas, é, comumente, associada às complicações clínicas (Yang *et al.*, 1995; Figueiredo, 1999). A infecção e a doença revestem-se, assim, de um interesse especial para a busca de ANA como um possível fator de complicação, corroborando o quadro clínico, ou uma conseqüência do comprometimento clínico do paciente.

No grupo com VD houve uma correlação positiva significativa da presença destes auto-anticorpos com DEN2 (100%) e DEN1 (62,5%) em relação ao DEN3 (25%). Ao se conjecturar uma possível correlação entre gravidade de casos e auto-imunidade, esperava-se maior prevalência de ANA em indivíduos com DEN3, pois de acordo com Miagostovich *et al.* (2002), Figueiredo (2003) e Passos *et al.* (2004) o DEN3 tem sido associado aos casos mais graves que ocorreram no Brasil, sendo o sorotipo responsável pela maior ocorrência de FHD nas epidemias passadas.

De forma semelhante ao que ocorre com a dengue, é também comum a referência a infecção pelo HTLV-1 que resulta em quadros neurológicos de MAH associados a uma resposta inflamatória exacerbada (Shimoyama, 1991; Levine *et al.*, 1994; Sagawa *et al.*, 1995), assim como a quadros relacionados com doenças auto-imunes, por exemplo artrite (Nishioka *et al.*, 1989; Ijichi *et al.*, 1990), polimiosite (Morgan *et al.*, 1989) e síndrome de Sjögren (Eguchi *et al.*, 1992; Terada *et al.*, 1994), sugerindo ação direta do agente na auto-imunidade.

Ferraz-Chaoui *et al.* (2009) sugerem que o HTLV - 1 existente no Brasil e na Martinica teria características diferentes daquele existente no Japão, que permite a infiltração de glândulas salivares e lacrimais por populações de linfócitos com diferentes capacidades para produzir anticorpos.

Ohishi *et al.* (1996) investigando associação do HTLV - 1 com doenças auto-imunes pela prevalência de ANA e outros anticorpos, analisou 59 pacientes japoneses, assintomáticos, e encontraram positividade para ANA, mas não emitiram conclusões sobre a associação com doença auto-imune.

No Japão, entre pacientes infectados pelo HTLV-1 com diagnóstico clínico de PET/MAH, 65% apresentavam síndrome de Sjögren e destes, 61% mostraram a presença de ANA (Nakamura *et al.*, 2000), o que não foi observado entre pacientes com HTLV-1 que apresentavam ceratoconjuntivite seca e xerostomia na Jamaica (Merle *et al.*, 1999; 2002). O acompanhamento de três coortes em Salvador, de portadores de HTLV - 1 com ceratoconjuntivite, assim como entre indivíduos com síndrome de Sjögren, também não se mostrou a presença de ANA (Giozza *et al.*, 2008; Ferraz-Chaoui *et al.*, 2009).

O predomínio do padrão de FAN do tipo citoplasmático, em relação ao padrão nuclear incluindo os dois casos observados nos controles, indica que determinados padrões de fluorescência são mais específicos de doença auto-imune, enquanto outros ocorrem em indivíduos saudáveis ou com enfermidades não auto-imunes. Segundo alguns autores, por ser o citoplasma celular rico em proteínas para as quais auto-anticorpos naturais apresentam afinidade moderada, é comum observar positividade para ANA em indivíduos saudáveis, cujo significado ainda não é entendido completamente (Andrade, 2002; Dellavance *et al.*, 2005; Dellavance & Andrade, 2007).

Os achados de ANA em populações saudáveis ou sem doenças auto-imunes também já foi observado por Leser *et al.*(2004) que em 394 pacientes com FAN-HEp-2 positivo não encontraram nenhum paciente com doença auto-imune. Outro exemplo está no padrão citoplasmático de pontos isolados, estudado por Laurino *et al.*(2006), presente em indivíduos sem evidência de auto-imunidade, mas

também em indivíduos com acometimento de doenças auto-imunes sistêmicas e órgão-específicas.

Dellavance *et al.* (2005) analisaram resultados de 30.728 amostras reagentes para auto-anticorpos em FAN-HEp-2 e encontraram o padrão nuclear em 13.641 (44%), destes apenas 18,5% apresentavam algum tipo de doença reumática auto-imune. Watanabe *et al.* (2004) em 597 trabalhadores hígidos de um hospital no Japão encontrou 20% com ANA; Fernandez *et al.* (2003) encontrou 22,6% em 500 doadores de sangue no Hemocentro de São Paulo; na UNIFESP Santos *et al.* (1997) obteve 12,8% de 259 indivíduos com idade superior a 65 anos e Hilário *et al.* (2004) 12,6% em indivíduos de 6 meses a 20 anos.

Embora tenha sido obtida uma alta taxa de ANA nos grupos estudados (40%), não houve correlação significativa desta prevalência com gênero, sorotipos e padrão dos auto-anticorpos encontrados (Tabelas 7, 8, 10, 12 e 13). Estas observações são compatíveis com o consenso entre vários autores de que nos processos auto-imunes causados por infecção, o importante é o cenário inflamatório, que funciona como deflagrador das situações de auto-imunidade, ao estimularem a expansão de células T potencialmente ativadas, independente de outros fatores (Lehmann *et al.*, 1992; Miller *et al.*, 1987; Wucherpfennig, 2001; Barzilai, Ram & Shoenfeld, 2007; Stratton *et al.*, 2009).

No grupo de indivíduos infectados pelo HTLV, não houve correlação entre a prevalência e sorotipo de vírus, assim como na distribuição dos padrões dos auto anticorpos, embora o padrão nuclear tenha ocorrido, exclusivamente, nos pacientes com HTLV - 1.

Talarmin, Nizou & Kazanji (1997) na Guiana Francesa, comparando a prevalência de ANA em portadores do HTLV - 1 (sintomáticos ou não) e indivíduos negativos, através de IFI, encontraram ANA em 9,71% do grupo com HTLV - 1 e 3,43% do grupo controle ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença na distribuição de ANA, por idade, sexo, grupo étnico e manifestações clínicas, assim como no trabalho ora apresentado.

Outras doenças infecciosas também podem estimular fenômenos de autoimunidade, sobretudo as infecções virais (HIV, citomegalovírus, Epstein-Baar e parvovírus B19) e as micobacterianas (Dellavance *et al.*, 2005). Kominsky *et al.*, (2006) citam que a associação entre infecção pelo EBV e LES tem sido descrita por diferentes autores (Origgi *et al.*, 1988; Katz *et al.*, 2001; Ascherio *et al.*, 2001). Segundo Pina (2003) um terço dos pacientes com LES produzem anticorpos reativos com uma ou mais proteínas de retrovírus, incluindo o HIV 1 e HTLV - 1.

Bichara (2009) analisou a prevalência de ANA-HEp-2 em 3 grupos de pacientes: infectados pelo vírus HIV, com hanseníase e co-infectados Hanseníase/HIV, obteve, respectivamente, as seguintes taxas de prevalências 32%, 33,3% e 47,8%. Em todos os grupos houve o predomínio do padrão citoplasmático, e o padrão nuclear só foi observado entre os pacientes com hanseníase (9,1%) e co-infectados (23,7%).

Já foi encontrado elevação transitória de auto-anticorpos, incluindo fator reumatóide, ANA e anticorpo anti-DNA em outras doenças virais como: varicela, sarampo, influenza, caxumba, herpes zoster, exantema súbito e hepatite C (Niwa, Sakane & Kanoh, 1984; Utiyama *et al.*, 1999). Segundo Codes *et al.* (2002)

existem interações entre viroses hepatotrópicas e o sistema imunológico do hospedeiro que podem influenciar na patogenicidade da agressão hepática. Ramos-Casals *et al.* (2009) analisaram 1.020 pacientes, de vários países, com hepatite C associada a doença auto-imune, e observaram que ANA estava presente em 61% destes, o fator reumatóide em 57%, hipocomplementemia em 52%, e crioglobulinas em 52%.

Bonfá *et al.* (1987) realizaram estudo comparativo de prevalência de auto-anticorpos entre indivíduos com malária, hanseníase e LES, através da técnica de IFI em células HEp-2. Encontraram positividade em 20% dos indivíduos hansenianos, incluindo padrão citoplasmáticos (maioria) e nuclear; naqueles com malária a positividade foi de 75%, com os dois padrões citados, independente da espécie do plasmódio, mas sem a especificidade do LES.

Questiona-se na pesquisa de ANA-HEp-2 os achados positivos em indivíduos aparentemente sem doenças auto-imunes, assim como foi observado neste trabalho que alcançou elevada prevalência de ANA em pacientes infectados pelo VD e HTLV - 1 e 2, mostrando que ambos estimulam processos de auto-imunidade.

Um dos caminhos na busca de justificativas da correlação entre infecção e auto-imunidade vem sendo apontado desde 1998 com a publicação de Jovanovic *et al.* sugerindo o papel fundamental da interleucina 17 (IL-17) no início ou na manutenção da resposta inflamatória. Nos últimos 5 anos, o paradigma Th1/Th2 foi atualizado incluindo um terceiro subconjunto chamado Th17, com especificidade para antígenos próprios, que são altamente patogênicos e podem

levar ao desenvolvimento da inflamação e da auto-imunidade grave (Bettelli, Korn & Kuchroo, 2007). Molesworth-Kenyon *et al.* (2008) afirmam que ainda são limitadas as informações sobre o papel da IL-17 na imunidade de vírus e parasitas, mas a descoberta de que desempenham um papel crítico na patogênese de doenças auto-imunes, resultou em várias publicações abrindo a possibilidade de desenvolver novas abordagens terapêuticas para doenças auto-imunes em seres humanos, algumas envolvendo agentes infecciosos.

O papel preditivo de ANA nas doenças auto-imunes vem sendo discutido, há vários anos, e destacam-se dois trabalhos clássicos como o de Swaak & Smeenk (1985) que obteve ANA em 441 pessoas sem LES, e ao fazerem seguimento destes pacientes por nove anos, observaram que 87% desenvolveram a doença; e de Arbuckle *et al.* (2003), que avaliando 130 ex-recrutas com LES, encontraram no soro destes mesmos pacientes, estocados 30 anos antes, ANA para LES em 88% deles e em nenhum dos pacientes controles.

Os resultados obtidos neste trabalho permitem confirmar que ambos os agentes apresentam um importante potencial indutor de auto-imunidade. Entretanto, a análise criteriosa de todo o contexto clínico é fundamental para a correta valorização desse achado. Muitas vezes impõe-se monitoração prospectiva por algum tempo para se detectar uma possível evolução para auto-imunidade clínica. (Barzilai, Ram & Shoenfeld, 2007; Stratton *et al.*, 2009).

Por isso, é importante que se busque formar conceitos, protocolos e padrões, de modo que se encontrem características peculiares com possíveis significados do teste positivo de ANA em pacientes sem evidência objetiva de

doença auto-imune, daqueles com respostas aos agravos de natureza auto-  
imunes.

## 5. CONCLUSÕES

- A prevalência de auto-anticorpos contra antígenos celulares no grupo com infecção pelos vírus da dengue e pelo HTLV - 1 e 2 foi significativamente maior do que nos controles;
- Tanto o padrão citoplasmático como o nuclear foram encontrados, porém houve o predomínio do padrão citoplasmático dos auto-anticorpos contra antígenos celulares nos três grupos estudados;
- Os auto-anticorpos contra antígenos celulares apresentaram uma correlação positiva com as espécies do vírus da dengue, mostrando ser mais frequente nos DEN1 e DEN2;
- A prevalência dos auto-anticorpos contra antígenos celulares independe se o indivíduo está infectado pelo HTLV - 1 ou HTLV - 2, embora seja mais frequente entre aqueles infectados pelo HTLV - 1;
- A prevalência dos auto-anticorpos contra antígenos celulares independe da situação clínica dos pacientes infectados pelos HTLV - 1 e 2, se assintomático ou sintomático;
- A prevalência dos auto-anticorpos contra antígenos celulares no grupo de indivíduos sintomáticos infectados pelos HTLV, independe da forma clínica;
- Não houve diferença entre a prevalência de auto-anticorpos contra antígenos celulares entre o grupo de indivíduos infectados com vírus da dengue e infectados pelos HTLV - 1 e 2.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier, 3. reimpressão, 2005, p. 423-443.
- ANDRADE, L.E, CHAN, E.K., PEEBLES, C.L., TAN, E.M. Two major autoantigen-antibody systems of the mitotic spindle apparatus, **Arthritis & Rheumatism**, 39(10): 1643-53, October 1996.
- ANDRADE, L.E.C. Como valorizar os resultados de teste de FAN (anticorpos antinúcleo) e suas diferentes metodologias. **Sinopses em Reumatologia**, v. 4, p. 3-9, 2002.
- ARBUCKLE, M.R., MCCLAIN, M.T., RUBERTONE, M.V., SCOFIELD, R.H., DENNIS, G.J., JAMES, J.A., HARLEY, J.B. Development of Autoantibodies before the Clinical Onset of Systemic Lupus Erythematosus. **New England Journal of Medicine** 349:16, 16, 2003.
- ASCHERIO A, MUNGER KL, LENNETTE ET, SPIEGELMAN D, HERNAN MA, OLEK MJ, et al. Epstein-Barr virus antibodies and risk of multiple sclerosis: a prospective study. **JAMA** 2001;286(24):3083-8.
- AQUINO, V. H., ANATRIELLO, E., GONÇALVES, E.V.S., VASCONCELOS, P.F.C., VIEIRA, D.S., BATISTA, W.C., BOBADILLA, M.L., VAZQUEZ, C., MORAN, M., FIGUEIREDO, L.T.M. Molecular epidemiology of dengue type 3 virus in Brazil and Paraguay, 2002-2004. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 75(4): 710-715, 2006.

- AYRES, M., AYRES Jr, M., AYRES, D.L., SANTOS, A.S. **BioEstat 5.0 - Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas.** 2007, 364p.
- BARZILAI, O., RAM., M., SHOENFELD, Y. Viral infection can induce the production of autoantibodies. **Current Opinion in Rheumatology**, **19(6)**: 636-643, 2007.
- BETTELLI, E, KORN, T, KUCHROO, V. Th17: The third member of the effector T cell Trilogy. **Current Opinion in Immunology**. 2007 December ; 19(6): 652–657.
- BICHARA, C.N.C. **Prevalência de auto-anticorpos contra antígenos celulares em pacientes co-infectados HIV-Hanseníase.** Tese (Doutorado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários) – Belém, Universidade Federal do Pará, 2009. 125p.
- BONFÁ, E., GOLOMBEK, S.J., KAUFMAN, L.D., SKELLY, S., WEISSBACH, H., BROT, N., ELKON, K.B. Association between lupus psychosis and anti-ribosomal P protein antibodies. **New England Journal of Medicine**, 317: 265-71, 1987.
- BRADWELL, A.R., STOKES, R.P., JOHNSON, G.D. **Atlas of hep-2 patterns.** England: KNP Group Ltd. 1995.
- BRITO-MELO, G.E.A. **Perfil fenotípico e funcional dos leucócitos do sangue periférico de indivíduos infectados pelo HTLV-I.** Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2000, 105p.

- CARNEIRO-PROIETTI, A.B.F., RIBAS, J.G.R., CATALAN-SOARES, B., C., MARTINS, M.L., BRITO-MELO, G.E.A., MARTINS-FILHO, O.A., PINHEIRO, S.R., ARAÚJO, A.Q.C., GALVÃO-CASTRO, B., OLIVEIRA, M.S.P, GUEDES, A.C., PROIETTI, F.A. Infecção e doença pelos vírus linfotrópicos humanos de células T (HTLV-I/II) no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 35(5): 499-508, set-out, 2002.
- CARVALHO, M.M., CARVALHO, E.M., PORTO, M.A., ARAÚJO, M.I. Lúpus Eritematoso Sistêmico em portador de HTLV-1. **Jornal da Liga dos Reumatologistas do Norte-Nordeste** – V.2, n. 1, 2006.
- CASSEB, J, PENALVA-DE-OLIVEIRA, AC. The Tropical of spastic paraparesis/Human T cell leukemia type 1-associated myelopathy (TSP/HAM). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**.33:1395-1401, 2000.
- CATALAN-SOARES, B.C., PROIETTI, F. A, CARNEIO-PROIETTI, A.B. Os vírus linfotrópicos de células T humanos (HTLV) na última década (1999-2000) – Aspectos epidemiológicos. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, 4(2): 81-95, 2001.
- CHAMBERS, T.J., HAHN, C.S., GALLER, R., RICE, C.M. Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Annual Review of Microbiology**, 44: 649-688, 1990.
- CODES, L., JESUS, R.S., CUNHA, S., CRUZ, M., PARANÁ, R. Frequency and implications of autoantibodies in acute viral hepatitis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 35(5): 465-469, 2002.

COUTO, J.C.F., ANDRADE, G.M.Q., TONELLI, **Infecções Perinatais E**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 279-292.

CUNHA, R.V., NOGUEIRA, R.M.R. Dengue e Dengue Hemorrágico. In: Coura, J.R. **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2006.

DELLAVANCE, A., JÚNIOR, A. G., CINTRA, A.F.U., XIMENES, A.C., NUCCITELLI, B., VON MÜHLEN, C.A., BICHARA, C.D., YANO, C., CARVALHO, D.G., BONFÁ, E.S.D.O., GUIMARÃES, F.N.C., MUNDIM, H.M., PFRIMER, I.A.H., REGO, J., ANDRADE, L.E.C., MESQUITA, M.M., SANTIAGO, B., SILVA, N.A., MIRANDA, P.J., LESER, P., FRANCESCANTONIO, P.L.C., JARACH, R., LEVY, R. A., NEVES, S.P.F., CRUVINEL, W.M., SANTOS, W.S. II Consenso Brasileiro de Fator Anti-nuclear em Células HEp-2. Definições para a padronização da pesquisa de auto-anticorpos contra constituintes do núcleo (FAN HEp-2), nucléolo, citoplasma e aparelho mitótico e suas associações clínicas. **Revista Brasileira de Reumatologia**, 43(3): 129-40, mai. jun., 2003.

DELLAVANCE, A., ANDRADE, L.E.C. Como interpretar e valorizar adequadamente o teste de anticorpos antinúcleo. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 43(3): 157-168, 2007.

DELLAVANCE, A., VIANA, V.S., LEON, E.P., BONFA, E.S., ANDRADE, L.E., LESER, P.G. The clinical spectrum of antinuclear antibodies associated with

the nuclear dense fine speckled immunofluorescence pattern. **Journal of Rheumatology**, v. 32, n. 11, p. 2144-9, 2005.

DOI, M.E. O uso de diferentes substratos na investigação dos anticorpos anti-nucleares em doenças reumáticas sistêmicas. **Revista Brasileira de Reumatologia**. 35: 16-20,1995.

DUARTE, A.A. Lúpus Eritematoso. In: Duarte, A.A. **Colagenoses e a Dermatologia**. São Paulo: 2004, p. 12-38.

EGUCHI, K., MATSUOKA, N., IDA, H., NAKASHIMA, M., SAKAI,M., SAKITO,S., KAWAKAMI,A., TERADA,T., SHIMADA,H., KAWABE,Y., FUKUDA, T., SAWADA, T., NAGATAKI, S. Primary Sjogren's syndrome with antibodies to HTLV-I: clinical and laboratory features. **Annals of the Rheumatic Diseases**. 51(6):769–776, 1992.

FERNANDEZ, S.A.V. LOBO,A.Z.C., OLIVEIRA, Z.N.P., FUKUMORI, L.M.I, PERIGO, A.P., RIVITTI, E.A. Prevalence of antinuclear autoantibodies in the serum of normal blood donors. **Revista do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, v. 58, p. 315-9, 2003.

FERRAZ-CHAQUI, A.K., ATTA, A.M., ATTA, M.L., GALVÃO-CASTRO, B., SANTIAGO, M.B. Study of autoantibodies in patients with keratoconjunctivitis sicca infected by the human T cell lymphotropic virus type 1. **Rheumatology International**, 29 jul 2009

FERREIRA, W.A., ÁVILA, S.L.M. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes**. 2. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2001, p. 28-35.

- FIGUEIREDO, L. T. M. Patogenia das infecções pelos vírus do dengue. **Medicina**,  
Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 32: 15-19, 1999.
- FIGUEIREDO, L. T. M., SIMOES, M. C., CAVALCANTE, S. M. B. Enzyme  
immunoassay for the detection of dengue IgG and IgM antibodies using  
infected mosquito cells as antigen. **Transactions of The Royal Society of  
Tropical Medicine and Hygiene**, 83(5): 702-707, 1989.
- FIGUEIREDO, L.T.M. Dengue in Brazil: Past, Present and Future Perspective.  
**Dengue Bulletin**, vol 27:25-33, 2003.
- FRANCHINI, G. Molecular mechanisms of human T-cell leukemia/lymphotropic  
vírus type I infection. **Blood**, 86(10): 3619-3639, 1995.
- GEORGE, R., LIAM, C.K., CHUA, C.T., LAM, S.K., PANQ, T., GEETHAN, R.,  
FOO, L.S. Unusual clinical manifestations of dengue virus infection. **Southeast  
Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, 19(4): 585-90, 1988.
- GIOZZA, S.P., SANTOS, S.B., MARTINELLI, M., PORTO, M.A., MUNIZ, A.L.,  
CARVALHO, E.M. Salivary and lacrymal gland disorders and HTLV-1 infection.  
**Revue de Stomatologie et de Chirurgie Maxillo-Faciale**, 109(3):153–157,  
2008.
- GOLAN, T.D., ELKON, K.B., GHARAVI, A.E, KRUEGER, J.G. Enhanced  
membrane binding of autoantibodies to cultured keratinocytes of systemic lupus  
erythematosus patients after ultraviolet B/ultraviolet A irradiation. **Journal of  
Clinical Investigation**, 90(3): 1067-76, 1992.

- GROEN, J., VELZINQ, J., COPRA, C., BALENTIEN, E., DEUBEL, V., VORNDAM, V., OSTERHAUS, A.D. Diagnostic value of dengue virus-specific IgA and IgM serum antibody detection. **Microbes and Infection**, 1(13): 1085-1090, 1999.
- GUBLER, D.J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical Microbiology Reviews**, 11(3): 480-496, 1998.
- GUZMÁN, M.G., KOURÍ, G. Dengue: an update. **Lancet infectious diseases**, 2(1): 33-42, 2002.
- HALSTEAD, S.B., O'ROURKE, E.J. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. **Journal of Experimental Medicine**, 146: 201-217, 1977.
- HANON, E., STINCHCOMBE, J.C., SAITO, M., ASQUITH, B.E., TAYLOR, G.P., TANAKA, Y., WEBER, J.N., GRIFFITHS, G.M., BANGHAM, C.R. Fratricide among CD8(+) T Lymphocytes Naturally Infected with Human T Cell Lymphotropic Virus Type I. **Immunity**, 13(5): 657-664, 2000.
- HARGRAVES, M.M., RICHMOND, H., MORTON, R. Presentation of 2 bone marrow elements: "tart "cell and "LE" cell. **Proceedings of the Staff Meetings of the Mayo Clinic**, 23: 25-34, 1948.
- HARGRAVES, M.M. Production in vitro of the LE cell phenomenon: use of normal bone marrow elements and blood plasma from patients with acute disseminated lupus erythematosus. **Proceedings of the Staff Meetings of the Mayo Clinic**, 24: 234-7, 1949.

- HILÁRIO, M.O., LEN, C.A., ROJA, S.C., TERRERI, M.T., ALMEIDA, G., ANDRADE, L.E. Frequency of antinuclear antibodies in healthy children and adolescents. **Clinical Pediatrics**, v. 43, p. 637-42, 2004.
- HUNG, N.T, LEI, H., LAN, N.T, LIN, Y., HUANG, K., LIEN, L.B., LIN, C., YEH, T., HA, D.Q., HUONG, V.T.Q., CHEN, L., HUANG, J., MY, L.T., LIU, C., HALSTEAD, S.B. Dengue Hemorrhagic Fever in Infants: A Study of Clinical and Cytokine Profiles. **Journal of Infectious Diseases**, 189(2): 221-32, 2004.
- IJICHI, S., MATSUDA, T., MARUYAMA, I., IZUMIHARA, T., KOJIMA, K., NIIMURA, T., MARUYAMA, Y.,SONODA, S., YOSHIDA, A., OSAME, M. Arthritis in a human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) carrier. **Annals of the Rheumatic Diseases** 49(9):718–721, 1990.
- INOKUCHI, T., TAKIUCHI, H., MORIWAKI, Y., KA, T., TAKAHASHI, S., TSUTSUMI, Z., SHIMA, H.,HIROTA, S., YAMAMOTO, T. Retroperitoneal ancient schwannoma presenting as an adrenal incidentaloma: CT and MR findings. **Magnetic Resonance Imaging**, v. 24, p. 1389-93, 2006.
- INTERNATIONAL COMMITTEE ON THE TAXONOMY OF VIRUSES.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTV/db/>, acessado em 12 de dezembro de 2006.
- ISHAK, R., HARRIGTON, W.J. Jr, AZEVEDO, V.N., EIRAKU, N., ISHAK, M.O., GUERREIRO, J.F., SANTOS, S.B., KUBO, T., MONKEN, C., ALEXANDRE, S., *et al.* Identification of human T-Cell lymphotropic virus type IIa infection in the Kayapo, an indigenous population of Brazil. **AIDS Research and Human Retroviruses**, 11(7): 813-821, 1995.

ISHAK, R., CAVALCANTE, F., VALLINOTO, A.C.R., ISHAK, MO.G. HTLV-I associated myelopathy in the Northern region of Brazil (Belém-Pará): serological and clinical features of three cases. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 35: 243-246, 2002.

JOVANOVIC,D.V., DI BATTISTA, J.A., MARTEL-PELLETIER, J., JOLICOEUR, F.C., HE, Y., ZHANG, M., MINEAU, F., PELLETIER, J. IL-17 Stimulates the Production and Expression of Proinflammatory Cytokines, IL-6 and TNF- $\alpha$ , by Human Macrophages. **Journal of Immunology**, 1998, 160: 3513-3521.

KALYANARAMAN, V.S., SAMGADHARAN, M.G., NAKAO, Y., ITO, Y., AOKI, T., GALLO, R.C. Natural antibodies to the structural core protein (p24) of the human T-cell leukemia (lymphoma) retrovirus found in sera of leukemia patients in Japan. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 79: 1653-1657, 1982.

KALYANARAMAN, V.S., SAMGADHARAN, M.G., ROBERT-GUROFF, M., MIYOSHI, I., BLAYNEY, D., GOLDE, D., GALLO, R.C. (1982) A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. **Science** 218:571-573

KAPLAN, J.E., LHABBAZ, R.F., MURPHY, E.L., HERMANSEN, S., ROBERTS, C., LAL, R., HENEINE, W., WRIGHT, D., MATIJAS, L., THOMSON, R., RUDOLPH, D., SWITZER, W.M., KLEINMAN, S., BUSCH, M., SCHREIBER, G.B. 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** 1996; 12: 193-201.

- KATZ, B.Z., SALIM, I.B., KIM, S., NSIAH-KUMI, P., WEINEL, W. Epstein-Barr virus burde in adolescents with systemic lupus erythematosus. **Pediatric Infectious Disease Journal**, 20(2):148-53, 2001.
- KAVANAUGH, A., TOMAR, R., REVEILLE, J., SOLOMON, D.H., HOMBURGER, H.A. Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. American College of Pathologists. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, 124(1): 71-81, 2000.
- KLIKS, S.C., NIMMANITYA, S., NISALAK, A, BURKE, D.S. Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 38(2): 411-419, 1988.
- KOMINSKY, S., AMORIM, R., MONTEIRO, E., ABOUHANA, R., COÊLHO, M., DUARTE, R.C. O papel do vírus epstein barr na etiopatogenia do lúpus eritematoso sistêmico. **Revista Paraense de Medicina**, mar. 2006, vol.20, no.1, p.53-55.
- KUBOTA, R., KAWANISHI, T., MATSUBARA, H., MANNNS, A., JACOBSON, S. HTLV-I specific IFN-gamma+ CD8<sup>+</sup> lymphocytes correlate with the proviral load in peripheral blood of infected individuals. **Journal of Neuroimmunology**, 102(2): 208-215, 2000.
- KULLICK, K., PROVOST, T.T., REICHLIN, M. Antibodies to single stranded DNA in patients with discoid lupus erythe matosus. **Arthritis and Rheumatism**, 25(6): 639-46. 1982.

- KURANE, I., ENNIS, F.E. Immunity and immunopathology in dengue virus infections. **Seminars in Immunology**, 4(2): 121-127, 1992.
- LAHITA, R.G., CHIORAZZI, N., REEVES, W.H. Anti-nuclear antibodies. In: Harris ED Jr, editor. **Textbook of the Autoimmune Diseases**. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2000. p. 87-101.
- LAURINO, C.F.C., Fritzler, M.J., Mortara, R.A., Silva, N.P., Almeida, I.C., Andrade, L.E. Human autoantibodies to diacylphosphatidylethanolamine recognize a specific set of discrete cytoplasmic domains. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 143, n. 572-84, 2006.
- LEHMANN, P.V., FORSTHUBER, T., MILLER, A., SERCARZ, E.E. Spreading of T-cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen. **Nature**, **358**:155–157, 1992.
- LEITE, A.C., MENDONÇA, G.A., SERPA, M.J., NASCIMENTO, O.J., ARAÚJO, A.Q. Neurological manifestations in HTLV-I-infected blood donors. **Journal of the Neurological Sciences**, 214(1-2): 49-56, 2003.
- LESER, P.G., DELLAVANCE, A., BARBOSA, S.H., GUIZ, G., RODRIGUES, S.H., SATO, E.I. Distinctive features of antinuclear antibodies observed in health and in subjects with autoimmune rheumatic diseases. In: Conrad K, Bachmann MP, Chan EKL, Fritzler MJ, Humbel RL, Sack U, Shoenfeld Y, eds. (org.). **From animal models to human genetics: research on the induction and pathogenicity of autoantibodies**. Dresden: Pabst Science Publishers, p. 493-510, 2004.

- LEVINE, P.H., CLEGHORN, F., MANNS, A., JAFFE, E.S., NAVARRO-ROMAN, L., BLATTNER, W.A., HANCHARD, B., De OLIVEIRA, M.S., MATUTES, E., CATOVSKY, D., SHIMOYAMA, M., TAJIMA, K., SONODA, S., YAMAGUCHI, K., TAKATSUKI, K. Adult T-cell leukemia/lymphoma: a working point-score classification for epidemiological studies. **International Journal of Cancer**, 59(4): 491-493, 1994.
- LIMA, T. V.R. **Caracterização sorológica e detecção molecular do HTLV em amostras de pacientes com distúrbios neurológicos no Estado do Pará, Brasil (1996 – 2005)**. Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais) – Belém, Universidade Federal do Pará, 2006, 101p.
- MADDISON, P.J., REICHLIN, M. Quantitation of precipitating antibodies to certain soluble nuclear antigens in SLE. **Arthritis and Rheumatism**, 20(3): 819-24, 1977.
- MAHIEUX, R., IBRAHIM, F., MAUCLERE, P., HERVE, V., MICHEL, P., TEKAIA, F., CHAPPEY, C., GARIN, B., VAN DER RYST, E., GUILLEMAIN, B., LEDRU, E., DELAPORTE, E., DE THE, G., GESSAIN, A. Molecular epidemiology of 58 new African human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) strains: identification of a new and distinct HTLV-1 molecular subtype in Central Africa and in Pygmies. **Journal of Virology** 71: 1317-1333, 1997.
- MARTINS, F.S.V., SETÚBAL, S. **Dengue: Diagnóstico e Tratamento**. Rio de Janeiro, Secretaria de Estado de Saúde, 1990.

- MARTINS, M.A., AGUIAR, R.A.P.L. Dengue. In: **Infecções Perinatais**. COUTO, J.C.F., ANDRADE, G.M.Q., TONELLI, E. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 325-331.
- MERLE, H., CABRE, P., OLINDO, S., MERLE, S., SMADJA, D. Ocular lesions in 200 patients infected by the human T-cell lymphotropic virus type 1 in martinique (French West Indies). **American Journal of Ophthalmology**, 134(2):190–195, 2002.
- MERLE, H., CABRE, P., SMADJA, D., JOSSET, P., LANDAU, M., VERNANT, J.C. Sicca syndrome and HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Japanese Journal of Ophthalmology**, 43(6):509–512, 1999.
- MIAGOSTOVICH, M.P., SANTOS, F.B., DE SIMONE, T.S., COSTA, E.V., FILIPPIS, A.M.B., SCHATZMAYR, H.G., R.M.R. Nogueira. Genetic characterization of dengue virus type 3 isolates in the State of Rio de Janeiro, 2001. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 35:869–72, 2002.
- MILLER, R.A., WENER, M.H., HARNISCH, J.P., GILLILAND, B.C. The limited spectrum of antinuclear antibodies in leprosy. **Journal of Rheumatology**, 14(1): 108-110, 1987.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Dengue** – Boletim da semana 04/2005, Brasília 13 p, 2005.
- MOLDEN, D.P., NAKAMURA, R.M., TAN, E.M. Standardization of the immunofluorescence test for autoantibody to nuclear antigens (ANA): use of

reference sera defined antibody specificity. **American Journal of Clinical Pathology**, 82(1): 57-66, 1984.

MOLESWORTH-KENYON, S. J., YIN, R., OAKES, J. E. AND LAUSCH, R. N. IL-17 receptor signaling influences virus-induced corneal inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**. 83(2):401-8, 2008.

MONATH, T.P. Pathology of the Flaviviruses. In: Schlesinger, S. & Schlesinger, M., eds. **The Togaviridae and Flaviridae**, plenum Press, New York, 1986, p. 375-424.

MONATH, T.P., HEINZ, F. Flaviviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, eds. **Virology**, Lippincott – Raven, Philadelphia, 1996, p. 961-1034.

MONATH, T.P., TSAI, T.F. Flaviviruses. In: RICHMAN, D.D; WHITLEY, R.J., HAYDEN, F.G., eds. **Clinical Virology**, Churchill Livingstone, New York, 1997, p. 1113-1185.

MORENS, D.M., HALSTEAD, S.B. Disease severity related antigenic differences in dengue 2 strains detected by dengue 4 monoclonal antibodies. **Journal of Medical Virology**, 22(2): 169-174, 1987.

MORGAN OS, RODGERS-JOHNSON P, MORA C, CHAR G. HTLV-1 and polymyositis in Jamaica. **Lancet** 2(8673):1184–1187, 1989

NAGAI, M., JACOBSON, S. Immunopathogenesis of human T cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy. **Current Opinion in Neurology**, 14(3): 381-386, 2001

NAKAMURA, H., KAWAKAMI, A., TOMINAGA, M., HIDA, A., YAMASAKI, S., MIGITA, K., KAWABE, Y., NAKAMURA, T., EGUCHI, K. Relationship between

Sjogren's syndrome and human T-lymphotropic virus type I infection: follow-up study of 83 patients. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine** 135(2):139–144, 2000.

NARAIN, S., RICHARDS, H.B., SATOH, M., SARMIENTO, M, DAVIDSON, R., SHUSTER, J. SOBEL, E., HANN, P., REEVES, W.H. Diagnostic accuracy for lupus and other systemic autoimmune diseases in the community setting. **Archives of Internal Medicine**,164(2): 2435-41, 2004.

NAUCLÉR, C.S., LARSSON, S., MOLLER, E. A novel mechanism for virus-induced autoimmunity in humans. **Immunological Reviews**. 152:175-92, 1996.

NISHIOKA K, MARUYAMA I, SATO K, KITAJIMA I, NAKAJIMA Y, OSAME M Chronic inflammatory arthropathy associated with HTLV-I. **Lancet** 1(8635):441, 1989

NIWA, Y., SAKANE, T., KANO, T. Transient autoantibodies with elevated complement levels in common viral diseases. **Journal of Clinical and Laboratory Immunology**, 13:183-188, 1984.

OHISHI K.; SHIBATA Y.; NAKAMURA T.; TSUJIHATA M.; AKAHOSHI M.; MATSUO T.; TOMONAGA M.; NAGATAKI S.; SHIMAOKA K. Autoantibodies and immunoglobulins in atomic bomb survivors with human T-lymphotropic virus type I. **Internal medicine** ISSN 0918-2918 1996, vol. 35, n.8, pp. 624-628

ORIGGI, L., PEREGO, R., HU, C., BERTETTI, E., D'AGOSTINO, P., ASERO, R., RIBOLDI, P. Anti-Epstein-Barr virus antibodies in systemic lupus

erythematosus. **Bollettino dell' Istituto Sieroterapico Milanese**, 67(2):116-22, 1988.

PASSOS, M.N.P., SANTOS, L.M.J.G., PEREIRA, M.R.R., CASALI, C.G., FORTES, B.P.M.D., VALENCIA, L.I.O, ALEXANDRE, A.J., MEDRONHO, R.A. Diferenças clínicas observadas em pacientes com dengue causadas por diferentes sorotipos na epidemia de 2001/2002, ocorrida no município do Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 37(4):293-295, jul-ago, 2004

PENG, S.L., CRAFT, J. Anti-nuclear antibodies. In: Harris ED Jr, editor. **Kelley's Textbook of Rheumatology**. Philadelphia: Elsevier & Saunders, 2005. p. 311-31.

PINA, C. Patologia auto-imune na infecção pelo HIV. 2003. Aidscongress.net. Disponível em [www.aidscongress.net/article.php?id\\_comunicação](http://www.aidscongress.net/article.php?id_comunicação). Acesso em 23 de outubro de 2008.

PINHEIRO, SR., LANA, M.A., PROIETTI, A.B.F.C., ORÉFICE, F., MARTINS, M.V.C.L., PROIETTI, F.A. HTLV-I associated uveitis, myelopathy, rheumatoid arthritis and Sjögren's syndrome. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, 53: 777-781, 1995.

PINHEIRO, V.C.S., TADEI, W.P., BARROS, P.M.S., VASCONCELOS, P.F., CRUZ, A.C.R. Detection of dengue virus serotype 3 by reverse transcription-polymerase chain reaction in *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) captured in Manaus, Amazonas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 100(8): 833-839, December 2005

RAMOS-CASALS, MANUEL; MUÑOZ SANDRA; MEDINA FRANCISCO; JARA LUIS-JAVIER; ROSAS JOSÉ; CALVO-ALEN JAIME; BRITO-ZERÓN PILAR; FORNS XAVIER; SÁNCHEZ-TAPIAS JOSE-MARIA. Systemic autoimmune diseases in patients with hepatitis C virus infection: characterization of 1020 cases (The HISPAMEC Registry). **Journal of Rheumatology** 2009;36(7):1442-8.

RUSSEL, P.K. Immunopathologic mechanisms in the dengue shock syndrome. In: Amos B, ed. **Progress in Immunology**, Academic Press, New York, p. 831-838, 1971.

SAGAWA, K., MOCHIZUKI, M., MASUOKA, K., KATAGIRI, K., KATAYAMA, T., MAEDA, T., TANIMOTO, A., SUGITA, S., WATANABE, T., ITOH, K. Immunopathological Mechanisms of Human T Cell Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-I) Uveitis. Detection of HTLV-I-infected T Cells in the Eye and Their Constitutive Cytokine Production. **Journal of Clinical Investigation**, 95(2): 852-858, 1995.

SANTOS, L.M., MOREIRA, K.E.C.S., RODRIGUES, S.H., ALMADA FILHO, C.M., RAMOS, L.R., ANDRADE, L.E.C. Prevalência e valor prognóstico de anticorpos antinucleares em indivíduos idosos. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 37, p. 323-8,1997.

SCHMIDT-ACEVEDO, S., PÉREZ-ROMANO, B., RUIZ-ARGUELES, A. 'LE cells' result from phagocytosis of apoptotic bodies induced by Anti-nuclear antibodies. **Journal of Autoimmunity**, 15(1): 15-20, 2000.

- SHIMOYAMA, M. Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukemia-lymphoma. A report from the Lymphoma Study Group (1984-87). **British Journal of Haematology**, 79(3): 428-437, 1991.
- SOUZA, L.A., LOPES, I.G.L., MAIA, E.L., AZEVEDO, V.N., MACHADO, L.F.A., ISHAK, M.O.G., ISHAK, R., VALLINOTO, A.C.R. Molecular characterization of HTLV-1 among patients with tropical spastic paraparesis/HTLV-1 associated myelopathy in Belém, Pará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 39(5): 504-506, set-out, 2006.
- STRATTON, R., SLAPAK, G., MAHUNGU, T., LOES, S. KINLOCH-de. Autoimmunity and HIV. **Current Opinion in Infectious Diseases**, 22(1): 49-56, 2009.
- SWAAK, T., SMEENK, R. Detection of anti-dsDNA as a diagnostic tool: a prospective study in 441 non-systemic lupus erythematosus patients with anti-dsDNA antibody (anti-dsDNA). **Annals of the Rheumatic Diseases**, 44, 245-251, 1985
- TALARMIN, A., NIZOU, J.Y., KAZANJI, M. Antinuclear autoantibodies in human T-cell leukemia/lymphoma virus type I carriers in French Guiana. **Archives of Virology**, 142(8): 1713-8, 1997.
- TAN, E.M. Autoantibodies and autoimmunity: a three-decade perspective. A tribute to Henry G. Kunkel. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 815: 1-14, 1997.

- TEIXEIRA, M.G. BARRETO, M.L., FERREIRA, L.D.A., VASCONCELOS, P.F.  
Dinâmica de circulação do vírus da dengue em uma área metropolitana do Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, 12(2): 87-97, 2003.
- TERADA, K., KATAMINE, S., EGUCHI, K., MORIUCHI, R., KITA, M., SHIMADA, H., YAMASHITA, I., IWATA, K., TSUJI, Y., NAGATAKI, S. Prevalence of serum and salivary antibodies to HTLV-1 in Sjogren's syndrome. **Lancet** 344(8930):1116–1119, 1994.
- TSAI, T.F. Flaviviruses (Yellow fever, Dengue, Dengue Hemorrhagic Fever, Japanese Encephalitis, St. Louis Encephalitis, Tick-Borne Encephalitis) In: In: Mandell, G.L., Bennett, J.E., Dolin, R. Mandell, Douglas and Bennett's **Principles and Practice of Infectious Diseases**, 6 ed., Philadelphia, Elsevier-Churchill-Livingstone, 2005, p.1270-92.
- UTIYAMA, S.R.R., ZENI, M.P.B., MOCELIM, V., CUNHA, D.S., ONO, M., DOI, E.M. Perfil de auto-anticorpos em hepatites virais. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*;31(2):57-61, 1999.
- VALLINOTO, A.C.R. **Caracterização molecular, filogenia e origem do vírus linfotrópico de células humanas, tipo II (HTLV II), de populações humanas da Amazônia Brasileira**. Tese (Doutorado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários) – Belém, Universidade Federal do Pará, 2001. 120p.
- VALLINOTO, A.C., ISHAK, M.O., AZEVEDO, V.N., VICENTE, A.C., OTSUKI, K., HALL, W.W., ISHAK, R. Molecular epidemiology of human T-lymphotropic virus type II infection in Amerindian and urban populations of the Amazon region of Brazil. **Human Biology** 74: 633-644, 2002.

VASCONCELOS, P.F.C., TRAVASSOS DA ROSA, A.P.A., PINHEIRO, F.P., RODRIGUES, S.G., TRAVASSOS DA ROSA, E.S., CRUZ, A.C.R., TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S. *Aedes aegypti*, dengue and re-urbanization of yellow fever in Brazil and other South American Countries: Past and present, and future perspectives. **WHO Dengue Bulletin**, 23: 55-66, 1999.

VITEK, C.R., GRACIA, F.I., GIUSTI, R.A., FUKUDA, K., GREEN, D.B., CASTILLO, L.C., ARMIEN, B., KHABBAZ, R.F., LEVINE, P.H., KAPLAN, J.E.. Evidence for sexual and mother to child transmission of human T lymphotropic virus type II among Guaymi Indians, Panama. **Journal of Infectious Diseases** 1995; 171:1022 - 6.

VON MUHLEN, C.A, NAKAMURA, R. Guidelines for Selecting and Using Laboratory Tests for Autoantibodies to Nuclear, Nucleolar and Other Related Cytoplasmic Antigens. In: Nakamura RM, Keren DF, Bylund DJ (ed.): **Clinical and Laboratory Evaluation of Human Autoimmune Diseases**. Chicago, ASCP Press, 1. ed, 2002, p. 183-198.

WALLACE, D. J., HAHN, B.H. **Lupus Erythematosus**. 5th ed. Pennsylvania: Williams & Wilkins, 1997, p. 383-457.

WATANABE, A. KODERA, M., SUGIURA, K., USUDA, T., TAN, E. M., TAKASAKI, Y., TOMITA, Y., MURO, Y. Anti-DFS70 antibodies in 597 healthy hospital workers. **Arthritis & Rheumatism**, v. 50, p. 892-900, 2004.

**WORLD HEALTH ORGANIZATION**. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control, 2nd ed., p. 12–47. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1997.

WUCHERPFENNIG, KW. Mechanisms for the induction of autoimmunity by infectious agents **Journal of Clinical Investigation**, 108(8): 1097-104, 2001.

YANG, K.D., WANG, C.L., SHAIQ, M.F. Production of Cytokines and platelet activating factor in secondary dengue virus infections. **Journal of Infectious Diseases** 172: 604, 1995.