



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS**

GEORGE ALBERTO DA SILVA DIAS

**CORRELAÇÃO ENTRE A AVALIAÇÃO CLÍNICA E O PADRÃO DE RESPOSTA
IMUNOLÓGICA PERIFÉRICA DE PACIENTES ACOMETIDOS POR
PARAPARESIA ESPÁSTICA TROPICAL/MELOPATIA ASSOCIADA AO VÍRUS
LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T HUMANAS DO TIPO 1 (HTLV-1)**

**BELÉM
2012**

GEORGE ALBERTO DA SILVA DIAS

**CORRELAÇÃO ENTRE A AVALIAÇÃO CLÍNICA E O PADRÃO DE RESPOSTA
IMUNOLÓGICA PERIFÉRICA DE PACIENTES ACOMETIDOS POR
PARAPARESIA ESPÁSTICA TROPICAL/MELOPATIA ASSOCIADA AO VÍRUS
LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T HUMANAS DO TIPO 1 (HTLV-1)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Hellen Thais Fuzii

**BELÉM
2012**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS

GEORGE ALBERTO DA SILVA DIAS

**CORRELAÇÃO ENTRE A AVALIAÇÃO CLÍNICA E O PADRÃO DE
RESPOSTA IMUNOLÓGICA PERIFÉRICA DE PACIENTES
ACOMETIDOS POR PARAPARESIA ESPÁSTICA
TROPICAL/MIELOPATIA ASSOCIADA AO VÍRUS LINFOTRÓPICO
DE CÉLULAS T HUMANAS DO TIPO 1 (HTLV-1)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical/UFPA.

Aprovado em: ___/___/___

Conceito: _____

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Hellen Thais Fuzii
Orientadora – NMT/UFPA

Prof^a. Dr^a. Fabíola Elizabeth Villanova
Membro - NMT/UFPA

Prof^a. Dr^a. Rita Catarina Medeiros Sousa
Membro - NMT/UFPA

Prof. Dr. Juarez Antônio Simões Quaresma
Membro - NMT/UFPA

Prof^a. Dr^a. Luisa Caricio Martins
Suplente - NMT/UFPA

A minha família (minha mãe Telma, minha irmã Giselle, meu cunhado Fernando, minha sobrinha/afilhada Giovanna e meu irmão George André) por todo o carinho, orgulho e admiração que eles sentem por mim. Em especial a minha irmã, por ser minha incentivadora nas escolhas que faço e por estar sempre presente nestes momentos de conquistas. Todos os momentos marcantes de minha vida ela se faz presente, e, espero que nas futuras conquistas que almejo para minha vida, tanto profissional quanto pessoal, ela possa fazer parte.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Prof^a. Dr^a. Hellen Thais Fuzii

A minha diletta orientadora, pela oportunidade única em minha vida. Sempre almejei fazer o curso de mestrado e aperfeiçoar meus conhecimentos. O meu momento havia chegado quando conheci uma orientadora que simpatizei desde o primeiro instante. Percebi que ela faria com que meu sonho se tornasse realidade. No laboratório de Imunopatologia, deparei-me com um ambiente que não fazia parte do meu mitiê relacionado à fisioterapia. Mas, ela me fez acreditar que eu era capaz de aprender e fazer ciência utilizando a biologia molecular, um mundo que eu considerava distante. Acreditar nos seus alunos até o fim é uma das características marcantes em minha orientadora. Isso me orgulha muito. Eu posso dizer que ter entrado no curso de mestrado só me fez crescer. E, esse crescimento, eu sou grato a Dr^a. Hellen, que foi de fundamental importância neste aspecto. Agradeço profundamente pela confiança depositada em mim, pelo carinho, pelas conversas, pelos momentos de descontração, e, sem falar dos ensinamentos tanto de caráter técnico/laboratorial como de lições de vida. Hoje eu posso dizer que aquele mundo que era distante, tornou-se realidade em minha vida. Isso eu devo e serei eternamente grato a minha orientadora pela dedicação a me ensinar. Posso afirmar que fui muito abençoado em poder estar ao lado desta pessoa. Obrigado por tudo que fizestes por mim. Fostes mais do que uma orientadora, uma educadora, ou uma professora, fostes minha amiga, pois estive comigo sempre. Você é um exemplo de dedicação e competência! Foi uma honra poder estar ao seu lado.

Prof. Dr. Juarez Antônio Simões Quaresma

Ao meu estimado coordenador do Laboratório de Imunopatologia Dr. Juarez Quaresma, pela oportunidade de poder desenvolver meu trabalho em seu laboratório. Obrigado pela confiança. Tenho um profundo respeito e admiração pela pessoa e pelo professor que você é. Como dizia em seus “momentos de sabedoria” (frase de sua própria autoria), somos uma grande família. E, eu, me sentia fazendo parte desta família. Sou grato pelas oportunidades que você me deu, pelos conselhos, pela ajuda preciosa no meu crescimento científico para poder alcançar vãos mais altos (não me esquecerei disso). Sem falar em nossas conversas que eram sempre uma diversão. Obrigado em me deixar fazer parte de sua equipe. Uma grande equipe! Sinto-me privilegiado por isso.

AGRADECIMENTOS

A DEUS por me conceder mais esta vitória em minha vida, estando sempre presente em tudo que faço e por me proporcionar sonhar e fazer destes sonhos realidade.

À Universidade Federal do Pará (UFPA) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por viabilizarem a realização deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais pelos ensinamentos, os quais proporcionaram o meu engrandecimento acadêmico-profissional.

A equipe médica do ambulatório do Núcleo de Medicina Tropical (Dr^a. Rita Catarina Medeiros Sousa, Dr. Cezar Caldas e Dr. Gilberto Yoshikawa), pela confiança e ensinamentos a mim dedicados. E pela Letícia, acadêmica de medicina, que tive sua preciosa ajuda me proporcionando total viabilidade no desenvolvimento do projeto, e, também pelo companheirismo e pela amizade que formamos.

As minhas grandes amigas do laboratório de Imunopatologia Denise Pinto, Marizeli Araújo e Tinara Aarão. Grande parte do meu sucesso profissional eu devo aos meus amigos. E sabia que não seria diferente quando eu conheci três grandes pessoas no laboratório de Imunopatologia do NMT da UFPA. Fui carinhosamente acolhido por vocês desde o primeiro momento, e, formamos laços afetivos que eu me orgulho muito. Sei que torcem muito por mim e que muito fizeram para que eu pudesse crescer tanto pessoalmente quanto profissionalmente. Adorei fazer parte da “congregação” do laboratório. Formamos um time de verdade. E como tal, cada um se ajuda para poder sermos um time campeão. Sinto orgulho de cada uma pela pessoa que são. E procuro a cada dia ser uma pessoa melhor para que vocês também possam se orgulhar de mim. Se hoje eu estou conseguindo obter meu título de Mestre, eu também devo a vocês. Obrigado pela paciência, pelas orientações, pelas palavras de carinho, pelas “cumanditagens”, pelo incentivo e ajuda na nova carreira profissional a qual eu quero seguir. Obrigado pelos diversos momentos divertidos que tivemos juntos. Ter conhecido vocês foi um presente de Deus, pois poder conviver grande parte do tempo com pessoas como vocês, me fez tornar uma pessoa melhor. Agradeço mais uma vez por toda a torcida que tinham e tem por mim para o meu engrandecimento profissional. Obrigado por serem minhas amigas de verdade!

A equipe do laboratório de Imunopatologia, Prof^a. Dr^a. Fabíola Villanova, pelos conselhos e ensinamentos a mim dedicados durante estes anos. Ao Rodrigo Barros, o qual engrandeceu meu conhecimento, me ensinando também nas técnicas laboratoriais além de discussões acadêmicas pertinentes aos assuntos com que estávamos trabalhando, e, que

posteriormente, foi meu parceiro de projeto. A Flora Balbi, pela ajuda imprescindível na coleta de amostras quando precisei. E a todas as outras pessoas que fizeram parte do laboratório durante o desenvolvimento de minha dissertação. Obrigado, aos colegas do laboratório, por fazerem parte de minha vida durante estes anos, pelos favores, pela compreensão, dedicação, e pelo ambiente de trabalho, no mínimo, agradável.

Ao laboratório de Análises Clínicas do Núcleo de Medicina Tropical, em especial a Prof^a. Dr^a. Luisa Caricio, pela permissão de usar seu laboratório para a coleta dos materiais biológicos; Ao Andrei, Kemper, Adenilson, Marcela e Amanda por terem me ajudado na coleta das amostras dos pacientes.

A todos os pacientes que participaram deste estudo, por confiarem no projeto. Sem vocês este projeto não seria viável.

A todos que contribuíram de forma direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

*“Nunca deixe que lhe digam que não vale à pena
Acreditar no sonho que se tem
Ou que seus planos nunca vão dar certo
Ou que você nunca vai ser alguém... Quem acredita sempre alcança!”*

Renato Russo.

RESUMO

O vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1) é um retrovírus endêmico em várias regiões do mundo infectando cerca de 10 a 20 milhões de pessoas. Está associado a duas principais manifestações clínicas: a leucemia/linfoma de células T do adulto (LLcTA) e a paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1 (PET/MAH). Apenas 2 a 5% dos indivíduos infectados desenvolvem doenças associadas ao vírus, enquanto a maioria permanece assintomática. A PET/MAH é a manifestação clínica associada ao vírus mais comum. É uma doença inflamatória do sistema nervoso central e o mecanismo pelo qual o HTLV-1 induz o surgimento da PET/MAH ainda não está totalmente esclarecido. Esse vírus infecta preferencialmente as células CD4⁺, que possuem uma participação importante na resposta imunológica. Essa interação vírus-hospedeiro pode levar a um desequilíbrio da resposta imunológica, com produção aumentada de citocinas inflamatórias. Essa alteração na produção dessas citocinas está relacionada ao desenvolvimento da PET/MAH. Tendo em vista compreender melhor a fisiopatologia da PET/MAH, este trabalho visa analisar a resposta imunológica periférica e correlacioná-la com os sintomas clínicos desenvolvidos por esses pacientes, como espasticidade e fraqueza muscular, e, conseqüentemente, necessidade de auxílio na marcha. No presente estudo, avaliou-se 28 pacientes infectados por HTLV-1, sendo 8 indivíduos com PET/MAH e 20 indivíduos sem PET/MAH. A expressão gênica relativa das citocinas IFN- γ , IL-4, IL-5 e IL-10 para esses pacientes foram realizadas através de PCR em tempo real. De cada paciente foi coletada amostra de sangue periférico para a separação de células linfomononucleares, para posterior extração de RNA total utilizando o reagente Trizol. Em seguida o mRNA foi submetido a transcrição reversa para obtenção do cDNA. A quantificação das citocinas foi realizada no *StepOnePlus (Applied Biosystem)* com o reagente *SybrGreen (Applied Biosystem)*. O cálculo da expressão foi feita com a fórmula $2^{-\Delta CT}$, onde ΔCT é $CT_{\text{gene}} - CT_{\text{gene constitutivo}}$, sendo os genes constitutivos utilizados o GAPDH e β -actina. Os pacientes também foram avaliados clinicamente para espasticidade muscular através da escala de Ashworth Modificada, além do grau de força muscular e do auxílio na marcha. Os pacientes com PET/MAH apresentaram maior expressão gênica de IFN- γ (Mediana: $2,9 \times 10^{-3}$) em relação aos pacientes sem PET/MAH (Mediana: $1,1 \times 10^{-3}$), sendo o $p = 0,0710$. Essa expressão aumentada de IFN- γ está positivamente relacionada com espasticidade ($r = 0,2795$), grau de fraqueza muscular ($r = 0,6580$) e auxílio de marcha ($r = 0,7216$). Outro dado importante foi que os pacientes com PET/MAH que utilizam cadeira de rodas apresentaram maior expressão de IFN- γ quando comparados aos indivíduos com PET/MAH que não utilizam cadeira de rodas ($p = 0,0371$). Os pacientes infectados por HTLV-1 que desenvolvem PET/MAH apresentam aumento da resposta Th1 em relação aos pacientes que não desenvolveram PET/MAH, e esse aumento de expressão de IFN- γ está relacionado com o desenvolvimento e progressão da doença.

Palavras-chave: HTLV-1. Resposta imunológica periférica. Espasticidade. Fraqueza muscular. Marcha.

ABSTRACT

Human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) is an exogenous retrovirus that persistently infects 20–30 million people worldwide. This virus is etiologically related to the development of adult T-cell leukemia (ATL) and HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) a chronic disease of the central nervous system. The majority of HTLV-1-infected individuals remain lifelong asymptomatic carriers (ACs) of the virus. However, about 3-5% can develop ATL or HAM/TSP. The virus preferentially infects CD4+ T cells – main host cell of HTLV-1 – and rapidly induces cell activation and proliferation and expression of many host genes, including IFN- γ . The exact mechanism underlying these immunological and clinical events still remains unknown. In the current study, we evaluated the peripheral immune response and correlated with clinical symptoms like spasticity and weakness of the lower extremities, and gait abnormalities. 28 HTLV-1 infected patients were studied. Eight of them developed HAM/TSP and 20 were ACs. Total RNA was extracted from peripheral lymphomononuclear cells using the Trizol® reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The quantitative real-time PCR was performed to quantify IFN- γ , IL-4, IL-5 and IL-10. Total RNA (1 μ g) of each sample was subjected to reverse transcription with Superscript III (Invitrogen). Real-time PCR was performed in StepOne Plus (Applied Biosystems, Foster City, CA) and signal detection was obtained with the Sybr Green reagent (Applied Biosystems). The amount of mRNA in the sample was expressed as the relative amount to the GAPDH and β -actin genes, according to the formula $2^{-\Delta CT}$, where ΔCT is CTgene – CThousekeeping. The clinical symptoms of each patient were examined. Spasticity was assessed on the Modified Ashworth Scale, the weakness of the lower limb was measured using a manual scale, and the gait was given scores to the devices that assist in gait. The HAM/TSP patients showed higher expression of IFN- γ (Median: $2,9 \times 10^{-3}$) than ACs (Median: $1,1 \times 10^{-3}$), with $p = 0,0710$. The IFN- γ expression was positively correlated to spasticity ($r = 0,2795$), weakness ($r = 0,6580$) and gait ($r = 0,7216$). Interestingly, patients who need wheelchairs had a higher IFN- γ expression than those who don't need wheelchair ($p = 0,0371$). The HAM/TSP patients showed higher Th1 response than ACs. The higher IFN- γ expression is correlated with the development and progression of the HAM/TSP.

Key-words: HTLV-1. Peripheral immune response. Spasticity. Muscle weakness. Gait.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Distribuição geográfica da infecção pelo HTLV-1.....	20
Figura 2 - Representação esquemática da estrutura morfológica do HTLV-1.....	21
Figura 3 - Representação esquemática da organização genômica do HTLV-1.....	21
Figura 4 - Infecção celular através da formação de sinapse entre célula infectada e não infectada indicada pelo quadrado branco.....	22
Figura 5 - Representação esquemática do complexo neurológico do HTLV-1: o modelo do iceberg.....	25
Figura 6 - Potenciais mecanismos imunológicos envolvidos na mielopatia associada ao HTLV-1. Três supostos mecanismos neurológicos associados à infecção pelo HTLV-1 e o desenvolvimento de PET/MAH: (1) o mecanismo de dano direto (resposta imunológica patogênica, a infecção das células do cérebro residente e excitotoxicidade de neurônios); (2) o mecanismo de dano circundante; e (3) o mecanismo auto-imune de mimetismo molecular. ...	26
Figura 7 - (A) - Ressonância magnética da coluna torácica (indicada pela seta) de um paciente com PET/MAH no início da doença. (B) – Atrofia medular após cinco meses de curso da doença, indicada pela seta.	27
Figura 8 – (A) Desenho ilustrando os principais tratos da medula espinhal: (1) Fascículo grácil e cuneiforme; (2) Trato corticoespinhal lateral; (3) Trato espinocerebelar dorsal; (4) Trato espinotalâmico lateral; (5) Trato espinocerebelar ventral. (B) Medula espinhal torácica de um paciente com PET/MAH com 2,5 anos de doença.....	28
Figura 9 - Corrida eletroforética em gel de agarose com formaldeído para RNA, evidenciando as bandas de RNAs ribossômicos 28S e 18S.....	37
Tabela 1 – Distribuição clínica e demográfica dos pacientes infectados pelo HTLV-1 atendidos no ambulatório do NMT da UFPA no período de Agosto de 2010 a Dezembro de 2011, Belém - Pará.....	42
Tabela 2 – Distribuição do grau de espasticidade segundo a escala de Ashworth Modificada nos pacientes com PET/MAH atendidos no ambulatório do NMT da UFPA, baseadas nas principais articulações, músculos e movimentos dos membros inferiores.	44
Gráfico 10 – Correlação da expressão dos genes constitutivos dos pacientes infectados pelo HTLV-1, de acordo com o CT em escala linear, $r = 0,9223$, $p < 0,0001$. Correlação de Pearson, $p \leq 0,05$	45
Tabela 3 – Correlação entre $2^{-\Delta CT}$ dos genes constitutivos, GAPDH e β -actina, e a expressão gênica das citocinas nos pacientes infectados pelo HTLV-1.	46
Gráfico 11 – Correlação entre os valores de $2^{-\Delta CT}$ de cada gene das citocinas estudadas segundo os CTs de GAPDH e β -actina, representada em escala linear. (A) Correlação do gene	

de IFN- γ , $r = 0,6002$, $p = 0,0007$. (B) Correlação do gene de IL-4, $r = 0,9322$, $p < 0,0001$. (C) Correlação do gene de IL-5, $r = 0,9801$, $p < 0,0001$. (D) Correlação do gene de IL-10, $r = 0,7998$, $p < 0,0001$. Correlação de Pearson, $p \leq 0,05$46

Gráfico 12 – Perfil da expressão relativa dos genes das citocinas estudadas nos pacientes com PET/MAH em escala de Log10.47

Tabela 4 – Análise comparativa da expressão gênica relativa das citocinas estudadas nos pacientes com PET/MAH.48

Gráfico 13 – Diferença de expressão gênica relativa das citocinas estudadas nos pacientes com PET/MAH em escala de Log10. (A) IFN- γ e IL-4 ($p = 0,0011$). (B) IFN- γ e IL-5 ($p = 0,4418$). (C) IFN- γ e IL-10 ($p = 0,0002$). (D) IL-4 e IL-5 ($p = 0,0011$). (E) IL-4 e IL-10 ($p = 0,2786$). (F) Diferença entre IL-5 e IL-10 ($p = 0,0002$). Teste de Mann-Whitney, $p \leq 0,05$48
Posteriormente foram realizadas comparações entre as citocinas nos indivíduos sem PET/MAH, totalizando também seis análises comparativas, como mostra o gráfico 14.49

Gráfico 14 – Perfil da expressão relativa dos genes das citocinas estudadas nos pacientes sem PET/MAH em escala de Log10.49

Tabela 5 – Análise comparativa da expressão gênica relativa das citocinas estudadas nos pacientes sem PET/MAH.49

Gráfico 15 - Expressão gênica relativa das citocinas IFN- γ , IL-4, IL-5 e IL-10 nos pacientes sem PET/MAH em escala de Log10. (A) Diferença de expressão gênica entre IFN- γ e IL-4 ($p < 0,0001$). (B) Diferença de expressão gênica entre IFN- γ e IL-5 ($p = 0,8817$). (C) Diferença de expressão gênica entre IFN- γ e IL-10 ($p < 0,0001$). (D) Diferença de expressão gênica entre IL-4 e IL-5 ($p = 0,0005$). (E) Diferença de expressão gênica entre IL-4 e IL-10 ($p = 0,5250$). (F) Diferença de expressão gênica entre IL-5 e IL-10 ($p = 0,0001$). Teste de Mann-Whitney, $p \leq 0,05$50

Tabela 6 – Análise comparativa da expressão gênica relativa das citocinas estudadas em relação aos indivíduos com e sem PET/MAH.51

Gráfico 16 – Diferença de expressão gênica relativa das citocinas IFN- γ , IL-4, IL-5 e IL-10 nos pacientes com e sem PET/MAH em escala de Log10. (A) Diferença de expressão gênica de IFN- γ ($p = 0,0710$). (B) Diferença de expressão gênica de IL-4 ($p = 0,9797$). (C) Diferença de expressão gênica de IL-5 ($p = 0,1620$). (D) Diferença de expressão gênica de IL-10 ($p = 0,5250$). Teste de Mann-Whitney, $p \leq 0,05$52

Gráfico 17 – Correlação de expressão gênica relativa das citocinas IFN- γ , IL-4, e IL-10 nos pacientes com e sem PET/MAH em escala de Log10. (A) Correlação da expressão gênica de IFN- γ e IL-4 com PET/MAH ($r = -0,3752$ e $p = 0,3597$). (B) Correlação da expressão gênica de IFN- γ e IL-4 sem PET/MAH ($r = 0,3719$ e $p = 0,1064$). (C) Correlação da expressão gênica de IFN- γ e IL-10 com PET/MAH ($r = 0,1101$ e $p = 0,7953$). (D) Correlação da expressão gênica de IFN- γ e IL-10 sem PET/MAH ($r = 0,1892$ e $p = 0,4244$). (E) Correlação da expressão gênica de IL-4 e IL-10 com PET/MAH ($r = -0,4987$ e $p = 0,2084$). (F) Correlação da expressão gênica de IL-4 e IL-10 sem PET/MAH ($r = 0,3719$ e $p = 0,1064$). Correlação de Pearson, $p \leq 0,05$53

Gráfico 18 – Diferença na expressão gênica relativa entre as razões das citocinas antagônicas (IFN- γ , IL-4 e IL-10 nos pacientes com e sem PET/MAH em escala de Log10. (A) Razão de IFN- γ /IL-4 em pacientes com e sem PET/MAH, ($p = 0,12525$). (B) Razão de IFN- γ /IL-10 em pacientes com e sem PET/MAH, ($p = 0,1209$). (C) Diferença de IL-4/IL-10 em pacientes com e sem PET/MAH, ($p = 0,7029$). Teste de Mann-Whitney, $p \leq 0,05$54

Gráfico 19 – Correlação entre a escala de Ashworth Modificada e a expressão gênica relativa das citocinas IFN- γ , IL-4, IL-5 e IL-10 nos pacientes com PET/MAH em escala linear. (A) Correlação de IFN- γ e a escala de Ashworth modificada ($r = 0,2795$, $p = 0,5026$). (B) Correlação de IL-4 e a escala de Ashworth modificada ($r = 0,1533$, $p = 0,7170$). (C) Correlação de IL-5 e a escala de Ashworth modificada ($r = 0,0611$, $p = 0,8857$). (D) Correlação de IL-10 e a escala de Ashworth modificada ($r = 0,3431$, $p = 0,4054$). Correlação de Pearson, $p \leq 0,05$55

Gráfico 20 – Correlação entre o grau de fraqueza muscular e a expressão gênica relativa das citocinas IFN- γ , IL-4, IL-5 e IL-10 nos pacientes com PET/MAH em escala linear. (A) Correlação de IFN- γ e fraqueza muscular ($r = 0,6580$, $p = 0,0761$). (B) Correlação de IL-4 e fraqueza muscular ($r = -0,5141$, $p = 0,1925$). (C) Correlação de IL-5 e fraqueza muscular ($r = 0,5855$, $p = 0,1273$). (D) Correlação de IL-10 e fraqueza muscular ($r = 0,2561$, $p = 0,5404$). Correlação de Pearson, $p \leq 0,05$56

Gráfico 21 – Correlação entre o grau de auxílio na marcha e a expressão gênica relativa das citocinas IFN- γ , IL-4, IL-5 e IL-10 nos pacientes com PET/MAH em escala linear. (A) Correlação da expressão de IFN- γ e o auxílio na marcha ($r = 0,7216$, $p = 0,0433$). (B) Correlação da expressão de IL-4 e o auxílio na marcha ($r = -0,3615$, $p = 0,3789$). (C) Correlação da expressão de IL-5 e o auxílio na marcha ($r = 0,3601$, $p = 0,3809$). (D) Correlação da expressão de IL-10 e o auxílio na marcha ($r = 0,3268$, $p = 0,4298$). Correlação de Pearson, $p \leq 0,05$57

Gráfico 22 – Diferença de expressão gênica de IFN- γ e IL-4 nos indivíduos com e sem cadeira de rodas em escala de Log10. (A) Diferença de IFN- γ em pacientes com e sem cadeira de rodas ($p = 0,0357$). (B) Diferença de IL-4 em pacientes com e sem cadeira de rodas ($p = 0,5714$). Teste de Mann-Whitney, $p \leq 0,05$58

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AP-1	<i>Activated protein 1</i>
° C	Graus centígrados
CD	Cluster of differentiation Grupamento de diferenciação
cDNA	DNA complementar
CEP	Comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos
CREB	<i>Cyclic AMP response element-binding protein</i>
CT	<i>Cycle threshold</i>
CTL	Linfócitos T citolíticos
DEPC	Dietil pirocarbonato
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (ácido desoxirribonucléico)
dNTP	<i>Deoxyribonucleotide triphosphate</i> (Desoxirribonucleotídeos Trifosfato)
E2F-1	<i>Transcription factor E2F1</i>
EDTA	<i>Ethylene Diamine TetrAcetic Acid</i> .(ácido etilenodiamino tetra-acético)
ELISA	Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay
Foxp3	Forkhead/winged helix transcription factor
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
HBZ	<i>HTLV-1 b-ZIP factor</i>
HTLV	Vírus linfotrópico de células T humanas
IFN-γ	Interferon- γ
IgM	Imunoglobulinas de classe M
IL	Interleucina
LLcTA	Leucemia/linfoma de células T de adultos
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i> (terminal de longa repetição nucleotídica)

MAD-1	<i>Mitotic arrest deficient-1</i>
MgCl₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa B</i>
ng	Nanograma
NMT	Núcleo de Medicina Tropical
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Tampão fosfato-salino)
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i> – reação em cadeia da polimerase
PET/MAH	Paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV
pmol	Picomol
qsp	Quantidade suficiente para
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (ácido ribonucléico)
rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	<i>Real time PCR</i> (PCR em tempo real)
SNC	Sistema nervoso central
SRF	<i>Serum responsive factor</i>
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TGF-β	<i>Transforming growth factor-beta</i> (fator de transformação de crescimento – beta)
Th	<i>T helper cell</i>
μg	Micrograma
μL	Microlitro

TNF- α *Tumor necrosis factor* (fator de necrose tumoral)

Treg Células T regulatórias

UFPA Universidade Federal do Pará

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1	HTLV-1	20
2.2	RESPOSTA IMUNOLÓGICA CONTRA O VÍRUS	23
2.3	ASPECTOS CLÍNICOS DA PET/MAH.....	25
2.4	ALTERAÇÕES IMUNOLÓGICAS DA PET/MAH	29
2.5	AVALIAÇÃO CLÍNICA DA ESPASTICIDADE.....	30
3	OBJETIVOS.....	32
3.1	GERAL	32
3.2	ESPECÍFICOS	32
4	MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO	33
4.2	SELEÇÃO DOS CASOS.....	33
4.3	ANÁLISE CLÍNICA	34
4.3.1	Avaliação médica	34
4.3.2	Avaliação da espasticidade.....	34
4.3.3	Avaliação do grau de auxílio na marcha	35
4.4	QUANTIFICAÇÕES DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA PERIFÉRICA	35
4.4.1	Coleta de sangue, separação e contagem das células linfomononucleares	35
4.4.2	Isolamento e quantificação do RNA.....	36
4.4.3	Síntese de cDNA	38
4.4.4	Quantificação das citocinas para o perfil de resposta imunológica do tipo Th1, Th2 e Treg.....	38
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	39

4.6	ASPECTOS ÉTICOS	39
5	RESULTADOS	41
5.1	CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES	41
5.2	VALIDAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DA EXPRESSÃO GÊNICA DAS CITOCINAS IFN- γ , IL-4, IL-5 E IL-10.....	44
5.3	PERFIL CITOCÍNICO DOS PACIENTES INFECTADOS PELO HTLV-1.....	47
5.4	ANÁLISE COMPARATIVA DO PERFIL CITOCÍNICO ENTRE OS PACIENTES COM PET/MAH E PACIENTES SEM PET/MAH.....	51
5.5	CORRELAÇÃO DA EXPRESSÃO CITOCÍNICA NOS PACIENTES COM E SEM PET/MAH.....	52
5.6	RAZÃO ENTRE OS PERFIS DE RESPOSTA IMUNOLÓGICA.....	54
5.7	CORRELAÇÃO DOS PERFIS DE RESPOSTA IMUNOLÓGICA E PERFIL CLÍNICO DOS PACIENTES COM PET/MAH	54
6	DISCUSSÃO.....	59
7	CONCLUSÕES.....	67
	REFERÊNCIAS.....	69
	APÊNDICES	74
	APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	75
	ANEXOS.....	76
	ANEXO A – FICHA DE AVALIAÇÃO CLÍNICA.....	77
	ANEXO B – ESCALA DE AVALIAÇÃO DA ESPASTICIDADE.....	81
	ANEXO C – PARECER DE ÉTICA DE PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS	82

1 INTRODUÇÃO

O vírus linfotrópico de células T humanas (*Human T-cell leukemia virus – HTLV*) é o agente responsável pela Leucemia/Linfoma de células T do adulto (LLcTA) e da paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1 (PET/MAH). No entanto, a PET/MAH é considerada uma das alterações mais comuns destes indivíduos, na qual o portador apresenta alterações motoras importantes, principalmente nos membros inferiores e disfunção autonômica associada. Com a evolução da doença, haverá limitações funcionais consideráveis, e, por conseguinte, uma mudança em sua qualidade de vida. Este vírus infecta 10 a 20 milhões de pessoas no mundo, o que representa um sério problema de saúde pública. Aproximadamente 95% dos pacientes infectados por HTLV-1 são assintomáticos, enquanto uma pequena porcentagem dos indivíduos (2 a 5%) desenvolvem LLcTA ou PET/MAH (ROMANELLI; CARAMELLI; PROIETTI, 2010).

Os portadores do HTLV-1 são distribuídos em focos de caráter endêmico por todo o mundo. Na América Latina há elevada endemicidade da infecção pelo vírus em populações de ancestrais africanos e entre alguns descendentes japoneses. No Brasil, foi inicialmente descrito por Kitagawa et al. (1986), e o estado do Pará foi considerado um dos estados com maior prevalência para o HTLV-1 em um estudo desenvolvido entre os doadores de sangue das 27 capitais realizado por Catalan-Soares, Carneiro-Proietti e Proietti (2005). A primeira associação entre o vírus e a PET/MAH realizada no Brasil foi feita em São Paulo por Castro et al. (1989). Em Belém do Pará, Ishak et al. (2002), associaram 3 casos de PET/MAH com o HTLV-1.

PET/MAH é uma doença neurológica inflamatória na qual as células T CD4⁺ infectadas pelo HTLV-1 e as células T CD8⁺ HTLV-específicas possuem um papel importante na patogênese. Uma das mais importantes observações imunológicas na infecção pelo HTLV-1 é a observação de proliferação celular espontânea *in vitro*, sem estímulo. Foi demonstrado a presença de infiltrado de células T CD4⁺ e CD8⁺ no sistema nervoso central (SNC), tendo destaque as células CD4⁺ por produzirem citocinas neurotóxicas. Além disso, estudos mostram a produção de citocinas como interferon-gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral (do inglês *tumor necrose factor* - TNF- α) e interleucina (IL) – 6 no sangue periférico. Estas citocinas são consideradas importantes mediadores da lesão tecidual na PET/MAH (MATSUURA; YAMANO; JACOBSON, 2010; SAITO, 2010).

A fisiopatologia da PET/MAH ainda não está bem esclarecida. As alterações na resposta imunológica dos pacientes acometidos pelo HTLV-1 estão relacionadas com o

desenvolvimento desta patologia. Com isso, a análise da resposta imunológica correlacionando com o quadro clínico da espasticidade pode trazer novas interpretações sobre a fisiopatologia da PET/MAH.

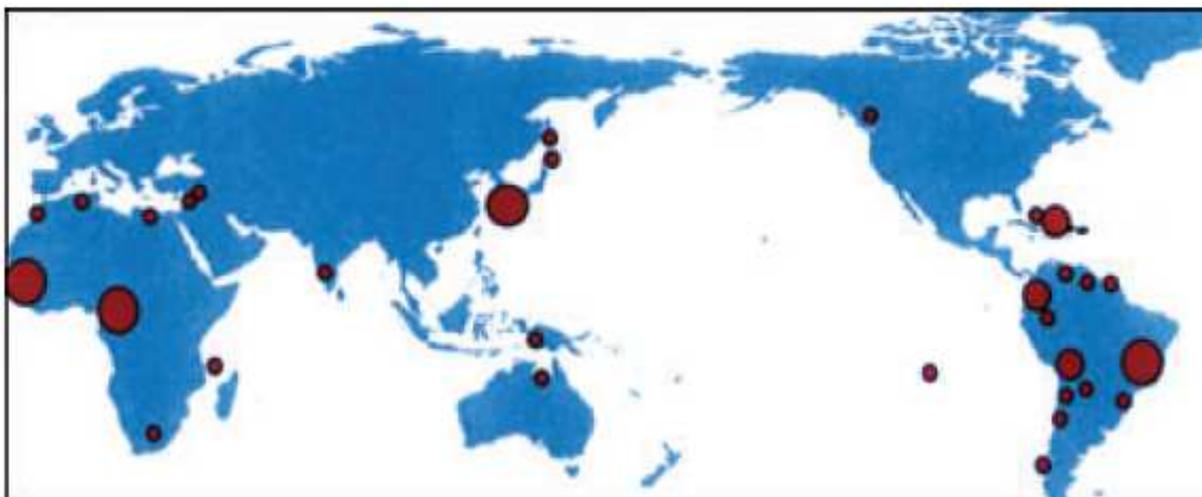
2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 HTLV-1

O HTLV-1 é classificado como um complexo retrovírus pertencente ao gênero *Deltaretrovirus* da subfamília Orthoretrovirinae e infecta cerca de 10 a 20 milhões de pessoas no mundo todo. Atualmente existem quatro tipos virais descritos na literatura. O HTLV-1 foi descrito como o primeiro retrovírus humano isolado de um paciente com linfoma cutâneo de células T. Dois anos mais tarde, o HTLV-2 foi identificado em uma linhagem de células T de um paciente com tricoleucemia. Mais recentemente, dois outros tipos de HTLV foram descritos, HTLV-3 e HTLV-4, ambos identificados em indivíduos africanos. Estes últimos vírus estão sobre caracterização molecular e por uma possível associação com doenças humanas (CHAMPS et al., 2010; RIBEIRO et al., 2010; SAITO, 2010).

Muitas são as áreas endêmicas para o HTLV-1, dentre elas, pode-se citar o sul do Japão, o Caribe, América Central e do Sul, Oriente Médio, África, Ilhas da Melanésia e três focos pequenos encontrados na população aborígine da Austrália, Papua Nova Guiné e Norte do Japão (Figura 1). No Brasil, a infecção pelo HTLV-1 é considerada endêmica, e, um estudo realizado em doadores de sangue das 27 capitais brasileiras demonstrou uma distribuição heterogênea, destacando-se como os Estados de maior prevalência o Pará, Maranhão, Pernambuco e Bahia (MATSUURA; YAMANO; JACOBSON, 2010; OLIÉRE et al., 2011; ROMANELLI; CARAMELLI; PROIETTI, 2010; SAITO, 2010; SONODA; LI; TAJIMA, 2011).

Figura 1 - Distribuição geográfica da infecção pelo HTLV-1.

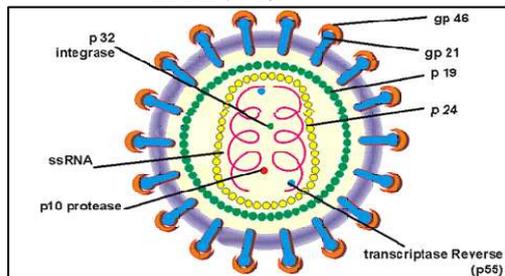


Fonte: Adaptado de Sonoda, Li e Tajima, 2011.

Os portadores, em sua maioria, permanecem assintomáticos por toda a vida. Fatores genéticos e imunológicos do hospedeiro são os principais responsáveis pelo aparecimento das doenças associadas. Dos indivíduos infectados, somente 2% a 3% desenvolvem LLcTA e cerca de 0,25% a 3,8% desenvolvem uma doença inflamatória crônica que envolve o SNC, como é o caso da PET/MAH. A transmissão viral entre os indivíduos pode ocorrer por via vertical através do aleitamento materno, transmissão intra-uterina ou perinatal, e por via horizontal, por meio do contato sexual, com maior frequência do homem infectado em relação à mulher, além do uso de drogas injetáveis ou por transfusão sanguínea (MATSUURA; YAMANO; JACOBSON, 2010; OLIVEIRA; AVELINO, 2007; ROMANELLI; CARAMELLI; PROIETTI, 2010; SAITO, 2010).

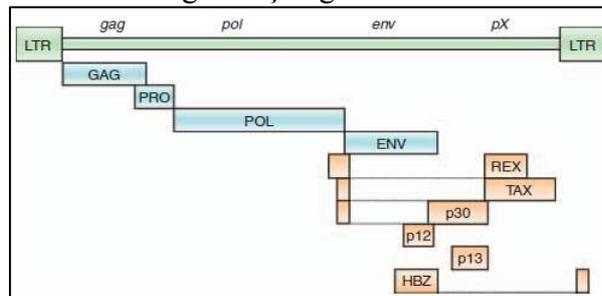
A estrutura do HTLV-1 é semelhante à de outros retrovírus, a partícula viral é envelopada e o seu genoma é constituído por duas fitas simples de RNA de polaridade positiva (Figura 2). Contém genes estruturais e não estruturais, como os genes *gag*, *pro*, *pol* e *env* que estão flanqueadas por duas regiões LTR (*long terminal repeat*). Além disso, na região entre o gene *env* e a região 3'-LTR também foi descrita a região *pX* (Figura 3) (BOXUS; WILLEMS, 2009; MATSUURA; YAMANO; JACOBSON, 2010).

Figura 2 - Representação esquemática da estrutura morfológica do HTLV-1.



Fonte: Adaptado de Casseb e Oliveira, 2011.

Figura 3 - Representação esquemática da organização genômica do HTLV-1.

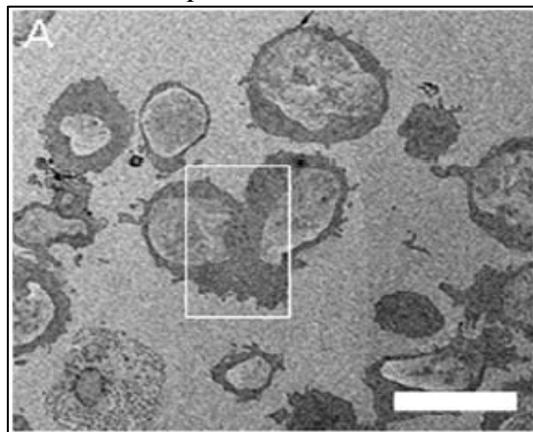


Fonte: Adaptado de Boxus e Willems, 2009.

O gene *gag* codifica as proteínas estruturais p19, p25 e p15; o gene *pro* codifica a protease viral; o gene *pol* codifica as enzimas transcriptase reversa e integrase; o gene *env* codifica as glicoproteínas do envelope externo gp21 e gp46; o gene *pX*, é responsável em codificar as proteínas regulatórias TAX (p40) e REX (p27), p12, p13, p21, p30, que estão envolvidas no processo de infecção e proliferação deste vírus. Outra proteína recentemente identificada foi HBZ (*HTLV-1 b-ZIP factor*), que, junto com a TAX, estão implicadas na patogênese viral (BOXUS; WILLEMS, 2009; MATSUURA; YAMANO; JACOBSON, 2010; OLIVEIRA; AVELINO, 2007; SATOU; MATSUOKA, 2010).

O vírus HTLV-1 pode infectar vários tipos celulares, como células T, B, dendríticas e células sinoviais, mas possui tropismo por células T CD4⁺, as quais são as células reguladoras centrais da resposta imunológica adquirida. A infecção da célula pelo vírus ocorre através de sinapse entre células infectadas e não infectadas, sendo a infecção por virion livre ineficiente (Figura 4) (MAJOROVITS et al., 2008; SATOU; MATSUOKA, 2010).

Figura 4 - Infecção celular através da formação de sinapse entre célula infectada e não infectada indicada pelo quadrado branco.



Fonte: Majorovits et al., 2008.

Após a penetração do vírus na célula, o RNA genômico viral é transcrito em cDNA pela transcriptase reversa e o provírus é incorporado ao DNA do hospedeiro de forma aleatória. O aumento do número de cópias do genoma viral ocorre através da expansão clonal das células infectadas e transmissão de células infectadas para célula não infectadas. Para isso, a proteína TAX apresenta papel importante por estimular o número de cópias de provírus e a proliferação celular, além de inibir apoptose (MAJOROVITS et al., 2008; SATOU; MATSUOKA, 2010).

O gene *tax* codifica a proteína mais estudada do vírus HTLV-1, a proteína TAX. Ela influencia a expressão de genes virais e celulares, através das regiões LTRs. Sua ação sobre os genes celulares se dá, não por ligação direta a promotores ou estimuladores, mas sim via sinalização celular, através de NF- κ B (*nuclear factor kappa B*), SRF (*serum responsive factor*), CREB (*cyclic AMP response element-binding protein*) e AP-1 (*activated protein 1*). Além disso, TAX também pode inativar p53, p16^{INK4A} e MAD-1 (*mitotic arrest deficient-1*). Especula-se que TAX tenha grande importância na proliferação das células infectadas pelo HTLV-1 durante o estado assintomático, que o fenótipo “mutador” de TAX possa acumular alterações genéticas e epigenéticas no genoma do hospedeiro que mantém a proliferação independente de TAX e o escape do sistema imunológico por inativação de TAX. O gene HBZ, recentemente descrito, situa-se na região 3'-LTR, que, ao contrário da 5'-LTR, apresenta-se hipometilada. Esta proteína foi inicialmente descrita ligando-se a CREB-2 e inibindo a transcrição de TAX. Estudos mostraram que esta proteína é importante para a transformação da célula, pois estimula a proliferação celular em sua forma RNA, através de E2F-1 e sua proteína inibe a transcrição de TAX (BOXUS; WILLEMS, 2009; HIGUCHI; FUJII, 2009; JEANG, 2010; YASUNAGA; MATSUOKA, 2007).

2.2 RESPOSTA IMUNOLÓGICA CONTRA O VÍRUS

Inicialmente, achava-se que o vírus HTLV-1 apresentava-se silenciado nas células infectadas, mas vários estudos começaram a demonstrar que isso não era verdade. Indivíduos infectados por HTLV-1 apresentam atividade crônica de resposta citotóxicas por células CD8⁺ HTLV-específicas, principalmente contra a proteína TAX, além de apresentarem altos títulos de anticorpos anti-HTLV, incluindo IgM. Estes dois fatores mostram que há a expressão de proteínas virais. Então qual seria o motivo desses antígenos se apresentarem fracamente ou não detectáveis no sangue de pacientes infectados? (BOXUS; WILLEMS, 2009; MACNAMARA et al., 2010).

Apesar de a proteína TAX ser de grande importância para a manutenção viral, ocorre à inativação do gene *tax* e isso pode ocorrer de três maneiras diferentes: a perda da região 5'-LTR, que é a região promotora do vírus para seus genes, incluindo *tax*, mutação do gene *tax* e a ocorrência de alterações epigenéticas, como hipermetilação de DNA da região 5'-LTR, silenciando a transcrição dos genes virais. E isso ocorre mesmo em pacientes assintomáticos, mostrando que TAX é importante nos estágios iniciais da infecção e não em etapas finais da transformação celular, e como ela também é alvo da resposta imunológica celular, a inibição

de sua expressão confere vantagens às células infectadas (ASQUITH; BANGHAM, 2008; BOXUS; WILLEMS, 2009; MACNAMARA et al., 2010; SAITO, 2010; SUEMORI et al., 2009).

Assim, em um estudo desenvolvido por Boxus e Willems (2009) foi demonstrado também que a proteína HBZ, como foi citada anteriormente, confere um fator importante na proliferação da célula infectada, escapando da resposta imunológica, uma vez que esta proteína não consegue ser eliminada pelas células CTL (Linfócitos T citolíticos) HBZ-específicas. Além do mais, foi demonstrado que entre as proteínas TAX e HBZ, ocorre um *feedback*, uma vez que a TAX ativa a produção de HBZ que, por sua vez, reprime a transativação mediada de TAX. Deste modo, a HBZ controla a produção exagerada de TAX e assim faz com que a célula infectada escape da resposta do sistema imunológico, permitindo a proliferação das células infectadas de forma contínua (ASQUITH; BANGHAM, 2008; BOXUS; WILLEMS, 2009; MACNAMARA et al., 2010; SAITO, 2010; SUEMORI et al., 2009).

Sabe-se que quanto maior é a carga viral em indivíduos infectados maior é a chance de desenvolvimento de doenças HTLV-associadas. Além disso, o número de CTL específicas contra células infectadas com HTLV se correlaciona positivamente com a carga de provírus de HTLV tanto nos indivíduos assintomáticos quanto em indivíduos com PET/MAH. Mas a razão pela qual a carga viral se mantém baixa e o porquê existe um equilíbrio ainda não estão bem esclarecidos (ASQUITH; BANGHAM, 2008; IRISH et al., 2009; MATSUURA; YAMANO; JACOBSON, 2010).

Outra célula importante no desenvolvimento das doenças relacionadas ao HTLV-1 é o linfócito T CD4⁺. Esta é uma das principais células encontradas no infiltrado do SNC em pacientes com PET/MAH. Além disso, quando infectadas pelo HTLV-1 produzem espontaneamente citocinas neurotóxicas como IFN- γ e TNF- α , que são encontradas em altos níveis em fluido espinhal de pacientes com PET/MAH. Mas, utilizando a técnica de ELISPOT de curta duração, Goon et al. (2002) mostraram alta frequência de células CD4⁺ específicas contra TAX e ENV em pacientes com PET/MAH em comparação a pacientes assintomáticos, além de apresentarem predomínio significativo do perfil de resposta imunológica para o fenótipo do tipo Th1 (MATSUURA; YAMANO; JACOBSON, 2010; SAITO, 2010).

Este achado pode ser sustentado por trabalhos realizados por Matsuura, Yamano e Jacobson (2010) e Saito (2010), uma vez que eles também encontraram um perfil de resposta do tipo Th1 com produção elevada de citocinas proinflamatórias como o IFN- γ , TNF- α e IL-

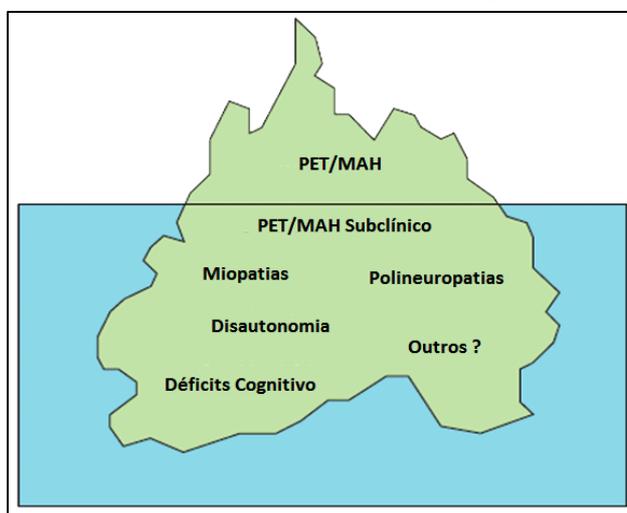
2, principalmente em PET/MAH quando comparado com indivíduos assintomáticos de mesma carga viral, e uma diminuição na regulação do fenótipo Th2 através de baixos níveis de citocina IL-4 nestes pacientes.

Outro fato importante é que estas células $CD4^+$ não apresentavam expressão de TAX, não sendo susceptíveis à lise por células $CD8^+$ específicas contra HTLV-1. Isso poderia ter implicações no desenvolvimento das doenças inflamatórias relacionadas ao vírus. Outro trabalho também desenvolvido por Goon et al. (2004) mostrou que pacientes com PET/MAH apresentavam um número 25 vezes maior de células $CD4^+$ responsivas ao HTLV-1 em relação aos pacientes assintomáticos, sendo que ambos os grupos apresentavam a mesma carga viral. Assim, essas células $CD4^+$ respondem mais a proteína ENV do vírus HTLV, ao contrário do encontrado em células $CD8^+$. Portanto, a grande frequência de células $CD4^+$ específicas contra o HTLV-1 está relacionada à doença PET/MAH, uma vez que a ativação destas células é considerada como o principal contribuinte para a inflamação induzida pelo HTLV-1, o que pode ser confirmado também no estudo realizado por Satou e Matsuoka (2010) (MATSUURA; YAMANO; JACOBSON, 2010; SAITO, 2010).

2.3 ASPECTOS CLÍNICOS DA PET/MAH

A PET/MAH é a manifestação neurológica mais comum associada ao vírus. O HTLV-1 tem um amplo espectro de manifestações neurológicas, denominado de complexo neurológico (Figura 5) (ARAÚJO; SILVA, 2006).

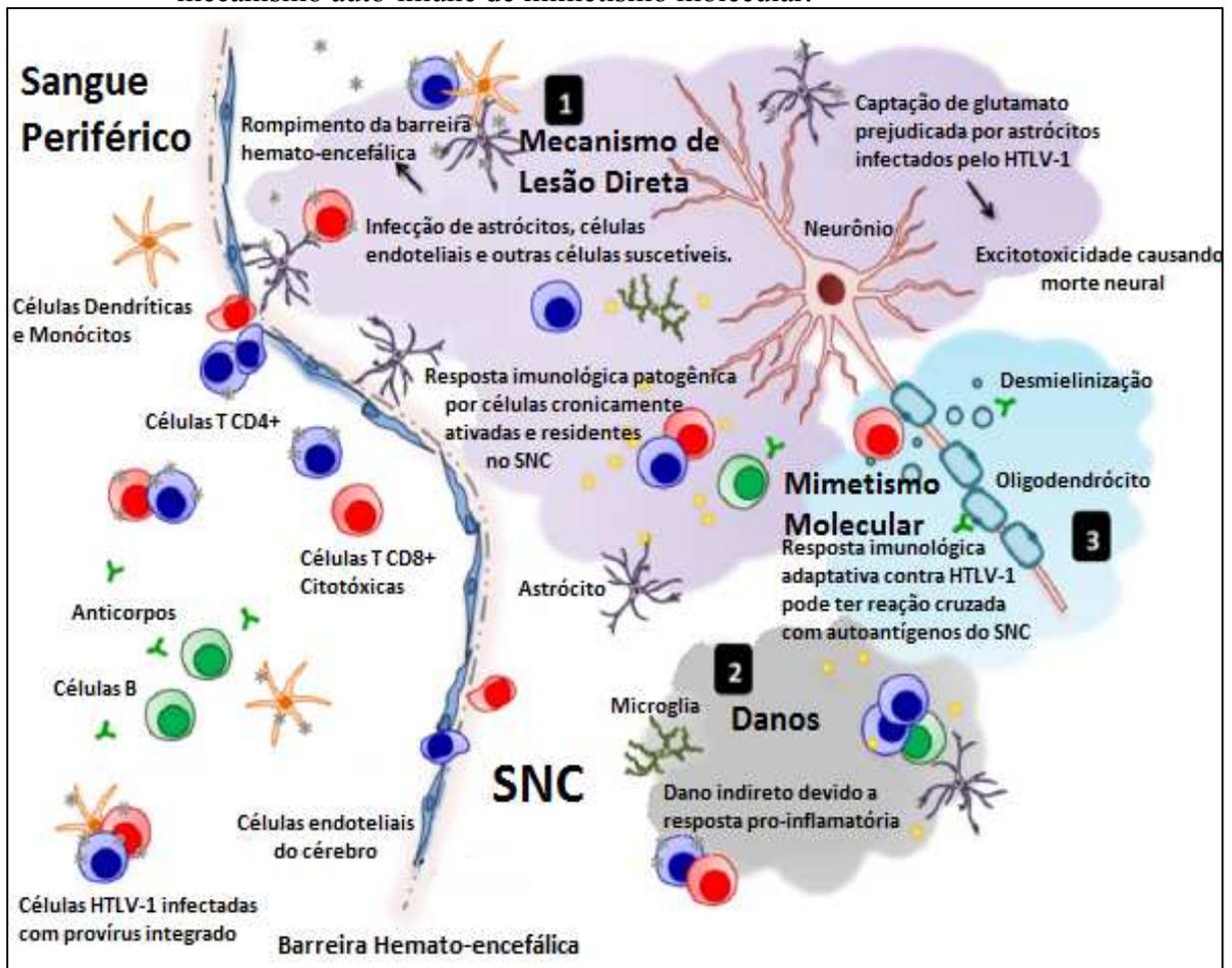
Figura 5 - Representação esquemática do complexo neurológico do HTLV-1: o modelo do iceberg.



Fonte: Adaptado de Araujo e Silva, 2006.

De acordo com os critérios da Organização Mundial da Saúde (OMS), a PET/MAH é caracterizada clinicamente por paraparesia espástica com sinais piramidais, evolução lenta e progressiva, comprometimento da função esfinteriana e distúrbios sensitivos, além de sorologia positiva para o HTLV-1. Há várias teorias relacionadas ao desenvolvimento da PET/MAH, sendo a mais aceita atualmente como um processo inflamatório de desmielinização e citotóxico vírus-induzida, de caráter crônico e progressivo. Os linfócitos são ativados na paraparesia espástica tropical, e quando atravessam a barreira hemato-encefálica, dão início ao processo inflamatório no SNC que resulta em lesão celular (Figura 6) (ARAÚJO et al., 2009; CASTRO-COSTA et al., 2009; LANNES et al., 2006; SAITO, 2010; YAMANO et al., 2009).

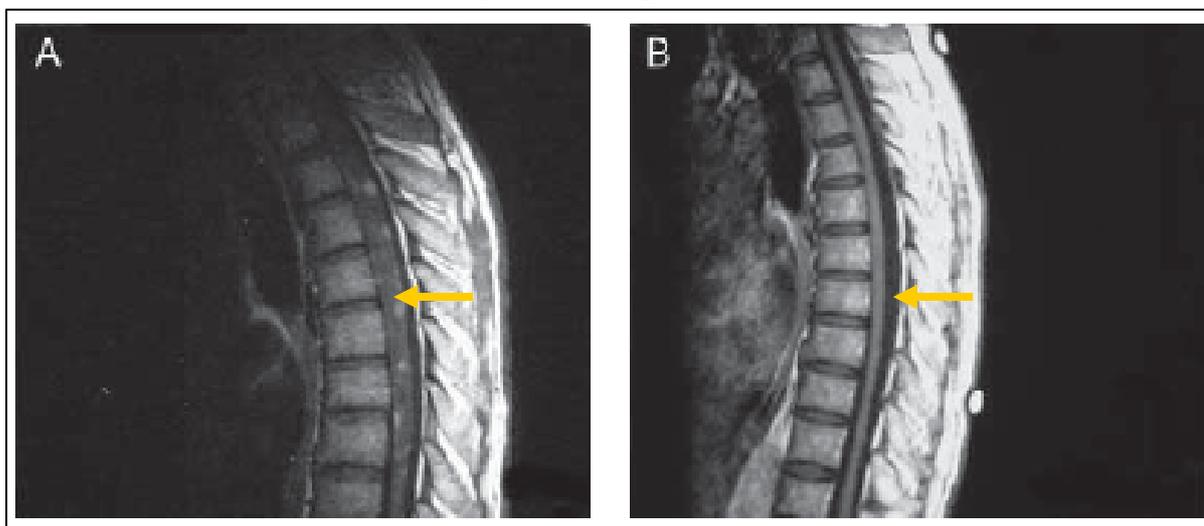
Figura 6 - Potenciais mecanismos imunológicos envolvidos na mielopatia associada ao HTLV-1. Três supostos mecanismos neurológicos associados à infecção pelo HTLV-1 e o desenvolvimento de PET/MAH: (1) o mecanismo de dano direto (resposta imunológica patogênica, a infecção das células do cérebro residente e excitotoxicidade de neurônios); (2) o mecanismo de dano circundante; e (3) o mecanismo auto-imune de mimetismo molecular.



Fonte: Adaptado de Olière et al., 2011.

As descrições patológicas da PET/MAH indicam principalmente o acometimento da medula espinhal ao nível torácico inferior, apresentando como característica a perda de mielina e axônio no corno anterior, posterior e lateral (Figura 7), com associação de infiltração linfocitária perivascular e parênquimal, macrófagos, proliferação de astrócitos, e gliose fibrilar. A inflamação causada na medula ocasiona comprometimentos motores (fraqueza e espasticidade em membros inferiores), sensitivos (parestesias e dores neuropáticas), distúrbios esfínterianos vesicais e intestinais, além de disfunção erétil no homem (ARAÚJO et al., 2009; CASTRO-COSTA et al., 2009; LANNES et al., 2006; SAITO, 2010; YAMANO et al., 2009).

Figura 7 - (A) - Ressonância magnética da coluna torácica (indicada pela seta) de um paciente com PET/MAH no início da doença. (B) – Atrofia medular após cinco meses de curso da doença, indicada pela seta.

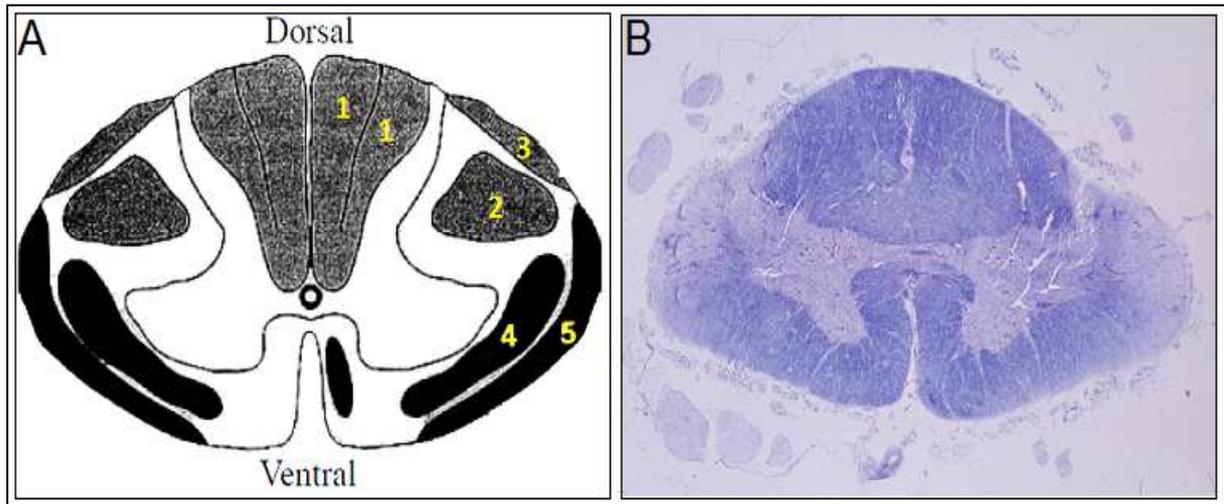


Fonte: Adaptado de Araujo e Silva, 2006.

Embora a alteração do tecido parenquimático não esteja confinada a nenhum trato específico (Figura 8), a degeneração simétrica do trato cortico-espinhal lateral é evidente em todos os casos, sendo o principal agente etiológico da paraparesia espástica. Aliada ao sinal de Babinski há hiperreflexia patelar, muitas das vezes acompanhadas por clônus. O envolvimento das colunas posteriores, principalmente do fascículo grácil, resulta em alterações da propriocepção consciente além de déficits relacionados ao trato epicrítico e sensibilidade vibratória abaixo do nível da lesão. Pode haver, em alguns casos, o acometimento dos tratos espino-cerebelar anterior e posterior, ocasionando uma perda da propriocepção inconsciente, e do trato espino-talâmico lateral, provocando distúrbios relacionados à dor e temperatura. Vale ainda ressaltar o possível comprometimento da

substancia gelatinosa, o que pode agravar o quadro álgico (ARAÚJO et al., 2009; CASTRO-COSTA et al., 2009; LANNES et al., 2006; SAITO, 2010).

Figura 8 – (A) Desenho ilustrando os principais tratos da medula espinhal: (1) Fascículo grácil e cuneiforme; (2) Trato corticoespinhal lateral; (3) Trato espinocerebelar dorsal; (4) Trato espinotalâmico lateral; (5) Trato espinocerebelar ventral. (B) Medula espinhal torácica de um paciente com PET/MAH com 2,5 anos de doença.



Fonte: Adaptado de Defino, 1999; Izumo, 2010.

No que diz respeito à espasticidade, é uma alteração motora caracterizada por hipertonia e hiperreflexia, secundárias a um aumento da resposta do reflexo de estiramento, diretamente proporcional à velocidade de estiramento muscular. É um dos distúrbios motores mais frequentes e incapacitantes observados nos indivíduos com lesão do SNC, que compromete o neurônio motor superior, afetando milhões de pessoas em todo mundo. O quadro clínico da espasticidade é caracterizado por aumento do tônus muscular, que se manifesta por aumento da resistência do músculo ao estiramento, sinal do canivete, predomínio de sua distribuição na musculatura antigravitacional, e por exacerbação dos reflexos tendinosos profundos, que em repouso ocorre excesso de resposta deste reflexo. (REKAND, 2010; YELNIK et al., 2010).

Nos indivíduos que desenvolvem PET/MAH, os grupamentos musculares da cintura pélvica e dos membros inferiores são acometidos de maneira a tornar a marcha espástica, com diminuição da velocidade, do equilíbrio dinâmico e aumento do dispêndio energético (fadiga). O padrão, na maioria dos casos, é o da marcha “em tesoura” característica da presença de hipertonia bilateral nos membros inferiores, com severo encurtamento e fraqueza dos músculos pélvico, adutores e da cadeia anterior e posterior dos membros inferiores. Os passos tornam-se arrastados e lentos, comprometendo as fases da marcha. Os movimentos perdem

sua seletividade, provocando uma deficiência no sinergismo funcional entre as cinturas escapular e pélvica, com acentuada imobilidade da articulação sacro-iliaca. O grau de espasticidade e fraqueza tornam-se, portanto, os principais fatores limitantes da marcha (ARAÚJO et al., 2009; CAROD-ARTAL et al., 2007; LANNES et al., 2006; ROMANELLI; CARAMELLI; PROIETTI, 2010; SANTOS; MUNIZ; CARVALHO, 2009).

2.4 ALTERAÇÕES IMUNOLÓGICAS DA PET/MAH

Os pacientes infectados pelo HTLV-1 que desenvolvem PET/MAH, como já foi descrito, apresentam manifestações clínicas específicas. No entanto, para o desenvolvimento destes sintomas, os pacientes apresentam alterações na resposta imunológica, dentre elas, a proliferação de linfócitos T CD4⁺ infectados pelo HTLV-1, com característica de proliferar-se de forma espontânea, expressão do gene viral intensificada, altos títulos de anticorpos contra HTLV-1, que são encontrados tanto no soro quanto no fluido cérebro espinhal, resposta imunológica vírus-específica, incluindo produção aumentada de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , TNF- α , IL-1 e IL-6 (ARAÚJO et al., 2009; BEST et al., 2009; CASTRO-COSTA et al., 2009; ROMANELLI; CARAMELLI; PROIETTI, 2010).

Estes indivíduos possuem uma resposta imunológica específica que é característica para o fenótipo do tipo Th1, apresentando uma produção aumentada de citocinas como IFN- γ e TNF- α , que estão hiperexpressas nos linfócitos de sangue periférico. Isso pode levar a uma maior circulação destas células entre o sangue periférico e o SNC e, propiciando a inflamação e lesão tecidual local. Em seu estudo, Matsuura, Yamano e Jacobson (2010) confirmaram que, em indivíduos com PET/MAH, havia um predomínio de citocinas para o perfil de resposta imunológica para o fenótipo Th1 e uma diminuição para o perfil Th2, na qual os níveis de IL-4, que é a citocina característica deste último fenótipo, apresentavam-se baixos (AHUJA et al., 2007; TOULZA et al., 2008; YAMANO et al., 2009).

Outro aspecto importante a ser discutido é o fato de que a resposta imunológica possui também células que são capazes de impedir a reação exarcebada contra um determinado antígeno, que poderia causar lesão ao organismo. Estas células são denominadas de células T reguladoras (Treg), que inicialmente foram descritas com os marcadores CD4⁺CD25⁺ e identificadas pela expressão intracelular Foxp3⁺ (do inglês *forkhead/winged helix transcription factor*), sendo este fator de transcrição crucial na diferenciação, função e homeostase das células Treg. Defeitos na expressão de Foxp3 podem levar a perda da

tolerância imunológica, e, provavelmente, desenvolvimento de doenças auto-imunes. (BRITO-MELO et al., 2007; SATOU ; MATSUOKA, 2010; TOULZA et al., 2008; YAMANO et al., 2009).

Nos pacientes com PET/MAH, ocorre uma exacerbação da resposta imunológica, uma vez que nestes pacientes as células T com o fenótipo $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ são os principais reservatórios do HTLV-1 no sangue periférico. Estudos têm mostrado que a infecção pelo HTLV-1 pode modificar os níveis de expressão de Foxp3. Em pacientes com PET/MAH foi relatado a diminuição da expressão de Foxp3 e também a produção de citocinas IL-10 e TGF- β (do inglês *transforming growth factor beta*) que são responsáveis pela função supressora da resposta imunológica. Essa perda de função supressora é capaz de exacerbar o processo da doença, uma vez que a inflamação não é controlada e o processo inflamatório se mantém (SANTOS; MUNIZ; CARVALHO, 2009; TOULZA et al., 2008; YAMANO et al., 2009).

Em um estudo desenvolvido por Toulza et al. (2008), os autores verificaram que em indivíduos com PET/MAH, os níveis citocínicos para a IL-10 estavam iguais aos de indivíduos sadios e os níveis de TGF- β estavam significativamente baixos quando comparados ao grupo controle, o que poderia refletir em diminuição da função supressora mediada pelas células Treg. Isso pode contribuir com a exacerbação do quadro infamatório na PET/MAH (BEWICK; YANG; ZHANG, 2009; HERAUD et al., 2007; MICHAËLSON et al., 2008; MONTES et al., 2009; SAITO, 2010).

Estudo desenvolvido por Yamano et al. (2009) demonstrou que em pacientes com PET/MAH, a ativação persistente da resposta imunológica induzida por TAX, estaria associada a uma diminuição da expressão de células T $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ com função supressora e a um acúmulo da população de células T $CD4^+CD25^+FOXP3^-$, capazes de exacerbar o processo patogênico da PET/MAH. Estes autores demonstraram que nos pacientes com mielopatia associada ao HTLV-1 ocorreu aumento da sub-população de células T com o fenótipo de $CD4^+CD25^+CCR4^+FOXP3^-$ produtoras de IFN- γ e que se correlacionava com a severidade da PET/MAH (TOULZA et al., 2008).

2.5 AVALIAÇÃO CLÍNICA DA ESPASTICIDADE

A avaliação da espasticidade é de fundamental importância para procedimento terapêutico. Um dos métodos que têm sido propostos para medir espasticidade muscular envolve mover manualmente um membro através da amplitude de movimento passivo para

alongar grupos musculares específicos. Na avaliação da espasticidade, são utilizados indicadores quantitativos e qualitativos. Estes são para identificar a intensidade e sua influência no desempenho da função, sendo úteis na indicação de intervenções terapêuticas e análise de resultados. Neste contexto, a escala de Ashworth Modificada, é a ferramenta mais indicada na clínica semiológica pelo Fisioterapeuta. É uma escala ordinal bastante utilizada como ferramenta de avaliação de pacientes portadores de lesão medular (BOHANNON; SMITH, 1987; FRANZOI et al., 2009; MINUTOLI et al., 2007; YELNIK et al., 2010).

Esta escala se aplica com mais precisão e confiabilidade quando comparada a escala original proposta por Brayn Ashworth em 1964 e apresenta algumas vantagens como não ser necessária a utilização de equipamentos, apresenta-se como uma técnica simples e rápida, podendo ser aplicada sem gastos materiais, além desta escala estar de acordo com as diretrizes para o uso de escalas ordinais propostas por MacKenzie e Charlson, o que também pode ser comprovado por estudos realizados por Nakhostin-Ansari et al. (2006) onde eles verificaram que a escala de Ashworth Modificada quando comparada a escala original, obteve melhores resultados (BOHANNON; SMITH, 1987; MACKENZIE; CHARLSON, 1986; MINUTOLI et al., 2007).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Correlacionar às manifestações clínicas e o perfil de resposta imunológica periférica de pacientes infectados pelo HTLV-1.

3.2 ESPECÍFICOS

- Caracterizar clinicamente os pacientes infectados pelo HTLV-1;
- Quantificar a expressão gênica da citocina INF- γ para o perfil de resposta imunológica do tipo Th1 dos pacientes infectados pelo HTLV-1;
- Quantificar a expressão gênica das citocinas IL-4 e IL-5 para o fenótipo Th2 dos pacientes infectados pelo HTLV-1;
- Quantificar a expressão gênica da citocina IL-10 para o fenótipo Treg dos pacientes infectados pelo HTLV-1;
- Avaliar clinicamente a espasticidade através da escala de Ashworth Modificada os pacientes com PET/MAH;
- Avaliar clinicamente o grau de fraqueza muscular dos pacientes com PET/MAH;
- Caracterizar o grau de auxílio da marcha nos pacientes com PET/MAH;
- Correlacionar os dados da resposta imunológica periférica com os dados clínicos dos pacientes acometidos por PET/MAH.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

O estudo caracterizou-se como analítico do tipo transversal, realizado no período de Agosto de 2010 a Dezembro de 2011.

4.2 SELEÇÃO DOS CASOS

Os participantes que compuseram a amostra do estudo foram selecionados por conveniência composta pelos pacientes atendidos e matriculados no ambulatório do Núcleo de Medicina Tropical (NMT) que estavam em atendimento médico, respeitando a ordem de chegada no serviço e o preenchimento dos critérios de inclusão propostos pela pesquisa, com diagnóstico confirmado da infecção pelo HTLV-1 realizado pela Fundação Centro de Hemoterapia e Hematologia do Pará (HEMOPA).

Foram estabelecidos dois grupos: o primeiro grupo composto de oito (8) indivíduos infectados pelo HTLV-1 acometidos pela PET/MAH e outro grupo composto de vinte (20) indivíduos infectados pelo vírus e sem acometimento da PET/MAH.

Foram considerados critérios de inclusão:

a – Grupo de indivíduos infectados pelo HTLV-1 acometidos pela PET/MAH: diagnóstico confirmado de infecção pelo HTLV-1 através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR); pacientes de ambos os gêneros e maioridade; diagnóstico confirmado de PET/MAH; que não estivessem co-infectados com outros vírus que levassem a imunossupressão; concordância do indivíduo na participação do estudo e que fossem atendidos no ambulatório do NMT da Universidade Federal do Pará (UFPA).

b – Grupo de indivíduos infectados pelo HTLV-1 sem acometimento da PET/MAH: diagnóstico confirmado da infecção pelo HTLV-1 (PCR positivo); pacientes de ambos os gêneros e maioridade; diagnóstico negativo de PET/MAH; que não estivessem co-infectados com outros vírus imunossupressores; concordância do indivíduo na participação do estudo e que fossem atendidos no ambulatório do NMT da UFPA.

A não observância de um dos critérios acima implicou na exclusão do indivíduo da pesquisa.

4.3 ANÁLISE CLÍNICA

4.3.1 Avaliação médica

Os dados clínicos foram obtidos a partir de informações contidas nas fichas de avaliação médica (Anexo A) do ambulatório do NMT da UFPA, sendo esta avaliação realizada de forma conjunta por uma médica Infectologista e um médico Reumatologista.

A partir destas fichas, foram coletados dados clínicos referentes à sintomatologia reumatológica, síndrome sicca e função muscular. Na questão reumatológica, foram coletados dados referentes ao diagnóstico de artrose e/ou artrite que possivelmente estariam envolvidos na patogênese do HTLV-1. Além destas características, foi avaliada a sintomatologia da síndrome sicca (xerofthalmia e xerostomia), que são indicativos de inflamação.

Em relação à função muscular, foi avaliada a presença de mialgia, bem como a graduação da força muscular dos pacientes infectados pelo vírus. Esta graduação foi composta por uma escala progressiva da seguinte forma: o número um (1) significa nenhuma anormalidade ao exame; (2) nenhuma anormalidade ao exame, fadigabilidade fácil ou diminuição da tolerância ao exercício; (3) discreto grau de atrofia de um ou mais grupos musculares; (4) marcha alterada; incapacidade para correr, mas hábil para subir escadas sem suporte para as mãos; (5) marcha muito alterada; lordose acentuada, incapacidade para subir escadas ou se levantar da cadeira sem apoio; e (6) incapacidade para andar sem assistência.

4.3.2 Avaliação da espasticidade

Após as consultas médicas, os pacientes eram encaminhados para a avaliação fisioterapêutica. Esta avaliação baseou-se principalmente na função muscular deste indivíduo, buscando informações a respeito da espasticidade. Tomou-se como referência de avaliação a escala de Ashworth Modificada (Anexo B), onde a movimentação passiva da extremidade inferior foi realizada avaliando o momento da amplitude articular em que surge a resistência ao movimento. Todos os pacientes foram mensurados em decúbito dorsal para que se pudesse obter uma padronização da avaliação e homogeneidade na coleta dos dados.

Esta escala apresentou como característica o fato de ser uma escala ordinal que varia de 0 a 4, descrita da seguinte forma: o número zero (0) significa nenhum aumento no tônus muscular; o número um (1) é caracterizado como leve aumento do tônus muscular, manifestando-se como um resistir e ceder ou por mínima resistência no final da amplitude de

movimento quando a parte afetada é movido em flexão ou extensão; o número um/mais (1+) é um leve aumento do tônus muscular, manifestando-se como uma resistência, que persiste de maneira discreta através do movimento passivo remanescente (menos da metade deste); o número dois (2) significa o aumento do tônus durante a maior parte do movimento, mas o segmento é facilmente mobilizado passivamente; o número três (3) é o aumento considerável do tônus, com dificuldade na movimentação passiva e por fim o número quatro (4) informa que o segmento afetado encontra-se rígido em flexão ou extensão.

Os músculos adutores de quadril, extensores de joelho (quadríceps) e dorsoflexores de tornozelo (Tríceps sural) são os principais músculos acometidos na espasticidade levando a um padrão extensor de membro inferior. Estes músculos foram usados como referência para a classificação geral dos pacientes com espasticidade. Utilizou-se como critério de pontuação o músculo cuja graduação de espasticidade foi considerada maior.

4.3.3 Avaliação do grau de auxílio na marcha

Foi também avaliado pela fisioterapia o grau de auxílio na deambulação destes pacientes. Identificou-se quais dispositivos eram utilizados por eles durante a realização da marcha. Estes dispositivos foram classificados em ordem crescente segundo o grau de necessidade do auxílio. Criou-se assim uma escala progressiva, onde o número zero (0) seria aquele indivíduo cuja deambulação seria sem auxílio; o número um (1) seria com auxílio de terceiros; o número dois (2) com o uso de bengala; o três (3) com o uso de muletas; o quatro (4) seria com o uso de andador e o cinco (5) por cadeira de rodas. Sabendo que alguns pacientes apresentavam diferentes mecanismos que os auxiliavam na deambulação, foi adotado um critério para a padronização da pontuação nesta escala. Este critério incluiu a pontuação do auxílio dominante durante a realização da marcha pelo paciente.

4.4 QUANTIFICAÇÕES DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA PERIFÉRICA

Para a quantificação da resposta imunológica periférica, foram utilizadas técnicas de biologia molecular as quais foram desenvolvidas no laboratório de Imunopatologia do NMT da UFPA.

4.4.1 Coleta de sangue, separação e contagem das células linfomononucleares

Após a avaliação clínica, de cada paciente selecionado, foi coletada amostra de 5mL de sangue em tubo com EDTA (Ácido Etilenodiamino Tetra-acético). Em seguida, todo o sangue foi transferido para um tubo tipo Falcon (Labcon) de 50mL, para ser diluído em 5mL de PBS (Tampão Fosfato-salino), com volume final de 10mL. Em outro tubo tipo falcon de mesma proporção, adicionou-se 5mL de Ficoll-paque™ Plus (GE Healthcare), transferido-se cuidadosamente para este tubo todo o sangue diluído anteriormente. Após este procedimento, o conteúdo foi centrifugado para a separação das células linfomononucleares a 2000 rpm por 30 minutos e a 15°C, utilizando a centrífuga Heltich Zentrifugen Universal 320 R. Após esta primeira centrifugação, foram retiradas estas células, e, transferidas para outro tubo tipo falcon. Em seguida foram lavadas em 5mL de PBS e centrifugadas a 4000 rpm por 20 minutos e a 15°C. Ao término desta centrifugação, foi desprezado o sobrenadante, restando apenas um pellet de células no fundo do tubo. A estas células restantes, foram acrescentados 1mL de PBS e em seguida, foram transferidas para o microtubo (Labcon) de 1,5mL. Deste microtubo, foi retirada amostra de 10µL para a contagem de células linfomononucleares. O restante da amostra foi congelado em refrigerador (Ultra Low Sanyo) a -80°C.

Para a contagem celular foi utilizada a câmara de Neubauer. Este procedimento utilizou-se os 10µL de células (retirados anteriormente) que foram diluídas em 90µL de PBS (diluição de 1:10). A contagem foi realizada utilizando os quatro quadrantes maiores laterais e após este procedimento, o número total de células foi dividido por quatro (número de quadrantes existentes), multiplicado por dez (fator de diluição) e seguido da multiplicação por 10.000. Obteve-se assim o número de células/mL de cada paciente.

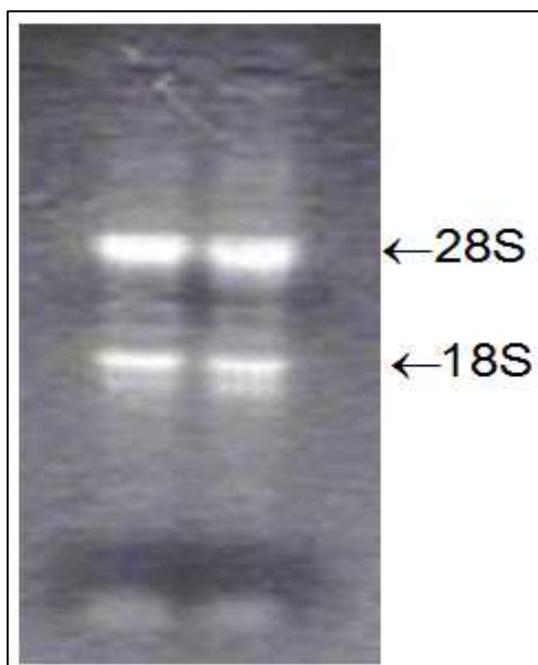
4.4.2 Isolamento e quantificação do RNA

De cada paciente, o RNA total, foi extraído de 10^6 células linfomononucleares, previamente calculadas. A extração de RNA foi realizada pelo método do Trizol, de acordo com o protocolo do fabricante. Em microtubo de 1,5mL, foi acrescentado às células linfomonucleares 1000µL de Trizol (Trizol® Reagent – Invitrogen) e 200µL de clorofórmio (Merk) a cada tubo. Após homogeneização por 2 minutos em Agitador Vortex Quimis, o conteúdo foi centrifugado na centrífuga Eppendorf Centrifuge 5415R a 12.000 rpm por 10 minutos a 6°C. Após este período, o sobrenadante de cada tubo foi transferido para outro microtubo de 1,5mL, contendo 500µL de isopropanol (Merk) e em seguida homogeneizado manualmente. Este microtubo foi armazenado em refrigerador a -20°C para precipitação por

um período de 24 horas. Decorrido este período, uma nova centrifugação a 12.000 rpm, por 20 minutos a 6^oC, foi realizada. Após centrifugação, foi retirado o sobrenadante, restando o pellet de RNA no lado e no fundo do tubo, e a este RNA precipitado foi acrescentado 1000µL de etanol 70% (Merk) em água DEPC (dietil pirocarbonato) onde foi centrifugado a 12.000 rpm, por 20 minutos a 6^oC, para ser realizada a lavagem do RNA. Após esta lavagem, o pellet de RNA foi desidratado por evaporação a 37^oC, e diluído em 30µL de água DEPC.

A análise de qualidade do RNA foi realizada em gel de agarose e formaldeído (Figura 9). Neste gel pode-se avaliar a contaminação por DNA genômico e verificar se ocorreu degradação da amostra. No gel devem estar presentes duas bandas, 28S e 18S, sendo que a banda de 28S deve estar mais intensa que a de 18S. A ocorrência de outra banda, de tamanho superior a de 28S, denota contaminação por DNA genômico. Neste caso a amostra deve ser submetida à re-extração por Trizol.

Figura 9 - Corrida eletroforética em gel de agarose com fomaldeído para RNA, evidenciando as bandas de RNAs ribossômicos 28S e 18S.



Após este procedimento, as amostras foram quantificadas utilizando o equipamento Invitrogen Qubit® Fluorometer e o Q32852 Quant-iT RNA Assay Kit, 100 assays *5-100ng* (250pg/uL-100ng/uL) para a leitura das amostras, seguindo as instruções do fabricante.

4.4.3 Síntese de cDNA

A transcrição reversa, das amostras, foi realizada para a obtenção do cDNA a ser utilizado na reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR). Deste modo, este procedimento foi realizado utilizando o *kit Superscript III (Superscript® III Reverse Transcriptase – Invitrogen)* de acordo com o protocolo do fabricante. Na reação foram acrescentados 1µg da amostra de RNA de cada paciente (previamente quantificadas), oligo dT 500 pmol/mL e dNTP a 10mM, com volume final de 13µL. A reação foi incubada a 65°C por 5 minutos no termociclador (Eppendorf Mastercycler) e transferida imediatamente para o gelo. Foram adicionados, então, tampão 5x (*first strand buffer*), DTT (ditiotreitól) 10mM, MgCl₂ a 50mM e *Super script III* 10.000U – 200U/µL, com volume final de 20 µL, levando-se a reação a 50°C por 50 minutos. Depois a enzima foi inativada, aquecendo-se a solução a 85°C por 5 minutos. Após o término da reação, em cada amostra, foi acrescentado 10µL de água destilada ultra pura Gibco (Invitrogen), totalizando um volume final de 30µL.

4.4.4 Quantificação das citocinas para o perfil de resposta imunológica do tipo Th1, Th2 e Treg

No presente estudo, foi feita a quantificação relativa. Para a detecção dos amplicons foi utilizado o agente fluorescente *Sybr Green*. As amostras foram feitas em duplicata.

Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados para as reações de RT-PCR foram os *primers* para a citocina IFN-γ que é característica para o perfil de resposta imunológica do tipo Th1, *primers* para as citocinas IL-4 e IL-5 que são característicos para o perfil de resposta imunológica do tipo Th2 e *primers* para a citocina IL-10 que é característica para o perfil de resposta imunológica para as células Treg.

A reação de RT-PCR foi realizada no *StepOne Plus (Real Time PCR Systems - Applied Biosystems)* com o reagente *Sybr Green (Applied Biosystems)*. A partir da reação de transcrição reversa, foi utilizado cDNA, *SYBR Green pcr master mix (2x)*, *primers* (18uM) sentido e reverso, e água Milli Q autoclavada qsp 20µL. Após um período de 10 minutos a 50°C para ativação da enzima e desnaturação de 5 minutos a 95°C, foram executados 45 ciclos de 95°C por 30 segundos e 60°C por 1 minuto. Ao final, foi realizado o protocolo de dissociação térmica, para controle da especificidade da reação.

Os resultados foram analisados pelo *StepOne™ Software* v2.0. Para a quantificação relativa, foi realizado o seguinte cálculo: inicialmente determinou-se o *cycle threshold* (CT), dado pelo número do ciclo em que o sinal de fluorescência atingiu a linha limiar (*threshold line*), ou seja, a linha em que a emissão de fluorescência está acima do ruído de fundo (*background*). O CT encontra-se invariavelmente na região correspondente à fase exponencial da amplificação, o que torna mais acurada a estimativa de quantificação dos transcritos na amostra original. Os valores de CT dos genes de interesse foram normalizados em relação ao CT dos genes constitutivos, o GAPDH (do inglês *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) e a β -actina, resultando o Δ CT, que é o $CT_{\text{gene}} - CT_{\text{constitutivo}}$. Por fim, foi calculado o $2^{-\Delta CT}$, sendo este o valor a ser trabalhado como representante da expressão relativa para cada gene.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O *software* Excel 2007 foi utilizado para entrada dos dados, bem como para a confecção das tabelas. A análise estatística foi realizada por meio dos *softwares* BioEstat 5.0 e o *GraphPad Prism 5.0*. Na confecção dos gráficos utilizou-se o *software* *GraphPad Prism 5.0*.

Antes da realização dos testes estatísticos previamente estipulados, verificou-se a normalidade dos dados obtidos dos perfis citocínicos entre os grupos estudados. Foi utilizado o teste D'Agostino-Pearson para esta finalidade, e, verificou-se que os dados coletados não apresentavam uma distribuição normal. A partir desta constatação, foi utilizado teste não paramétrico, como o de Mann-Whitney para a comparação entre as diferenças de expressão gênica das citocinas entre os grupos estudados. Para a correlação entre os achados dos perfis de resposta imunológica periférica e os achados clínicos, foi utilizado o Teste de Correlação de Pearson. Foi adotado um p valor $\leq 0,05$ como nível de significância.

4.6 ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (CEP) do NMT sob parecer número 038/2010-CEP/NMT (Anexo C), seguindo as normas da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, relativa à pesquisa

em seres humanos. O termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Apêndice A) foi explicado de forma verbal a cada paciente e aplicado antes da coleta de dados.

No TCLE, foram esclarecidos a utilização do material biológico, dados clínicos da avaliação, as características do exame, o sigilo dos dados obtidos e a livre decisão de participação do indivíduo. Foi exigido que, todos os participantes da amostra, autorizassem a sua participação no estudo através da assinatura.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES

Os pacientes incluídos neste estudo foram todos provenientes do serviço ambulatorial do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará. Inicialmente foram avaliadas e coletadas amostras de 32 pacientes, sendo que quatro amostras foram excluídas do estudo por problemas técnicos. Assim, a análise final incluiu 28 pacientes.

Os pacientes atendidos no estudo seriam inicialmente classificados em dois grupos cuja denominação seria o grupo de PET/MAH e o outro grupo de Assintomáticos. Entretanto, verificou-se que não havia indivíduos infectados pelo HTLV-1 que pudessem ser considerados assintomáticos, como mostra na tabela 1, uma vez que todos os pacientes apresentavam alguma manifestação clínica que pode ou não estar relacionado com o vírus. Além disso, os pacientes participantes do estudo estavam sendo submetidos a tratamento medicamentoso, com uso de antiespásticos (Baclofeno), antiinflamatórios não hormonais (Diclofenaco, Nimesulida e Naproxeno) e os antiinflamatórios hormonais (Corticóides). A partir destes dados, e, utilizando o critério neurológico como referência, os pacientes foram reclassificados em dois grupos, sendo aqueles indivíduos com PET/MAH e sem PET/MAH.

De acordo com essa classificação, este estudo constou de oito pacientes (28,5%) com PET/MAH, sendo cinco do sexo feminino (62,5%) e três do sexo masculino (37,5%), a média e a mediana de idade foram $50 \pm 10,37$ anos e 49 anos (35 a 61 anos), respectivamente. Em relação às sintomatologias reumatológicas apresentadas por estes pacientes, houve uma maior porcentagem para o diagnóstico de artrose nesses indivíduos (62,5%). Em relação à síndrome sicca, 75% dos pacientes apresentaram esta manifestação, e, no que diz respeito à mialgia 50% destes pacientes apresentaram esta sintomatologia. Analisando a função muscular, os indivíduos com PET/MAH apresentaram uma fraqueza proximal de membros inferiores, sendo que cinco indivíduos apresentaram fraqueza proximal em diversos graus (62,5%) e três não apresentaram este sintoma (37,5%). No que diz respeito à marcha, os indivíduos com PET/MAH apresentaram mecanismos que os auxiliavam durante a deambulação. Neste contexto, apenas um (1) paciente realizava a marcha sem auxílio (12,5%), um (1) realizava a marcha com auxílio de terceiros (12,5%), um (1) utilizava bengala (12,5%), dois (2) possuíam auxílio de muletas (25%) e três (3) com auxílio de cadeira de rodas (37,5%). Os indivíduos sem PET/MAH constituiu-se de 20 pacientes (71,5%), sendo 17 pacientes do sexo feminino (85%) e 3 do sexo masculino (15%). A média e a mediana de idade nestes indivíduos foram

49,20 \pm 11,80 anos e 49,5 anos (18 a 71 anos), respectivamente. Às sintomatologias reumatológicas apresentadas pelos pacientes foi diagnosticado 35% de artrose nestes indivíduos. No que diz respeito à síndrome sicca, 75% apresentaram esta manifestação, e, em relação à mialgia apenas três pacientes (15%) apresentaram este sintoma. Em relação à fraqueza proximal, apenas dois pacientes (10%) apresentaram alteração de força. A tabela 1 apresenta a distribuição clínica e demográfica dos 28 pacientes infectados pelo HTLV-1 presentes no estudo.

Tabela 1 – Distribuição clínica e demográfica dos pacientes infectados pelo HTLV-1 atendidos no ambulatório do NMT da UFPA no período de Agosto de 2010 a Dezembro de 2011, Belém - Pará.

Variáveis	Geral		Com PET/MAH		Sem PET/MAH	
	N = 28		N = 8		N = 20	
	N	%	N	%	N	%
Idade						
Mínimo		18		35		18
Máximo		71		61		71
Mediana		49,5 anos		49 anos		49,5 anos
Média \pm DP		49,42 \pm 11,23 anos		50 \pm 10,37 anos		49,20 \pm 11,80 anos
Sexo						
Masculino	6	21,5%	3	37,5%	3	15%
Feminino	22	78,5%	5	62,5%	17	85%
Neurologia						
Sim	8	28,5%	8	28,5%	20	71,5%
Não	20	71,5%				
Reumatologia						
Artrose	11	39,3%	5	62,5%	7	35%
Artrite	-	-	-	-	-	-
Ambos	2	7,15%	-	-	1	5%
Síndrome sicca						
Xerostomia	3	10,72%	2	25%	1	5%
Xeroftalmia	10	35,72%	2	25%	8	40%
Ambos	8	28,58%	2	25%	6	30%

DP = Desvio Padrão.

(-) Dado numérico igual a zero.

Tabela 1 - Continuação

Variáveis	Geral		Com PET/MAH		Sem PET/MAH	
	N = 28		N = 8		N = 20	
	N	%	N	%	N	%
Mialgia						
Sim	6	21,42%	4	50%	3	15%
Não	22	78,58%	4	50%	17	85%
Fraqueza proximal (Graduação)						
1	21	75%	2	25%	18	90%
2	1	3,57%	-	-	1	5%
3	1	3,57%	1	12,5%	-	-
4	1	3,57%	1	12,5%	-	-
5	1	3,57%	-	-	1	5%
6	3	10,71%	3	37,5%	-	-
Auxílio na marcha						
Sem auxílio	21	75%	1	12,5%	20	100%
Auxílio de terceiros	1	3,57%	1	12,5%	-	-
Bengala	1	3,57%	1	12,5%	-	-
Muleta	2	7,15%	2	25%	-	-
Cadeira de rodas	3	10,71%	3	37,5%	-	-

(-) Dado numérico igual a zero.

Em relação à manifestação clínica neurológica apresentada pelos pacientes, utilizou-se para avaliação do grau de espasticidade a escala de Ashworth Modificada, conforme descrito nos materiais e métodos anteriormente. De um total de oito (8) indivíduos com PET/MAH, dois pacientes (G1 e G11) apresentaram uma graduação leve da espasticidade localizada apenas nos músculos adutores do quadril. Dois indivíduos (G4 e G12) apresentaram leve aumento do tônus muscular nas três articulações avaliadas e em cada músculo correspondente; um indivíduo (G24) teve um leve aumento do tônus nos músculos dos quadris e joelhos, mas o membro era passível de movimento, e, aumento considerável do tônus nos músculos dos tornozelos, o qual, neste paciente, observou-se um aumento progressivo do tônus muscular (de proximal para distal); e, por fim, três pacientes (G10, G17 e G35) apresentaram aumento considerável do tônus muscular nos músculos dos quadris,

joelhos e tornozelos. A tabela 2 apresenta a distribuição desta escala em relação a cada paciente, segundo os principais músculos envolvidos na espasticidade relacionada ao membro inferior direito e esquerdo, bem como as articulações envolvidas e os movimentos testados para a classificação destes pacientes.

Tabela 2 – Distribuição do grau de espasticidade segundo a escala de Ashworth Modificada nos pacientes com PET/MAH atendidos no ambulatório do NMT da UFPA, baseadas nas principais articulações, músculos e movimentos dos membros inferiores.

Pacientes	ESCALA DE ASHWORTH MODIFICADA					
	Articulações/Principais Músculos/Movimentos					
	Quadril D (Adutores)	Quadril E (Adutores)	Joelho D (Quadríceps)	Joelho E (Quadríceps)	Tornozelo D (Tríceps sural)	Tornozelo E (Tríceps sural)
*G1	Abdução (1)	-	-	-	-	-
*G4	Abdução(1+)	Abdução(1)	Flexão(1)	Flexão(1)	Dorsoflexão(1)	Dorsoflexão(1)
*G10	Abdução(3)	Abdução(3)	Flexão(2)	Flexão(2)	Dorsoflexão(3)	Dorsoflexão(3)
*G11	Abdução(1)	Abdução(1)	-	-	-	-
*G12	Abdução(1)	Abdução(1)	Flexão(1)	Flexão(1)	Dorsoflexão(1)	Dorsoflexão(1)
*G17	Abdução(2)	Abdução(2)	Flexão(2)	Flexão(2)	Dorsoflexão(3)	Dorsoflexão(3)
*G24	Abdução(1)	Abdução(1+)	Flexão(1)	Flexão(1+)	Dorsoflexão(2)	Dorsoflexão(3)
*G35	Abdução(2)	Abdução(3)	Flexão(2)	Flexão(3)	Dorsoflexão(2)	Dorsoflexão(3)

* Identificação para análise laboratorial de cada paciente envolvido no estudo.

(D) Direito e (E) Esquerdo.

(-) Dado numérico igual a zero.

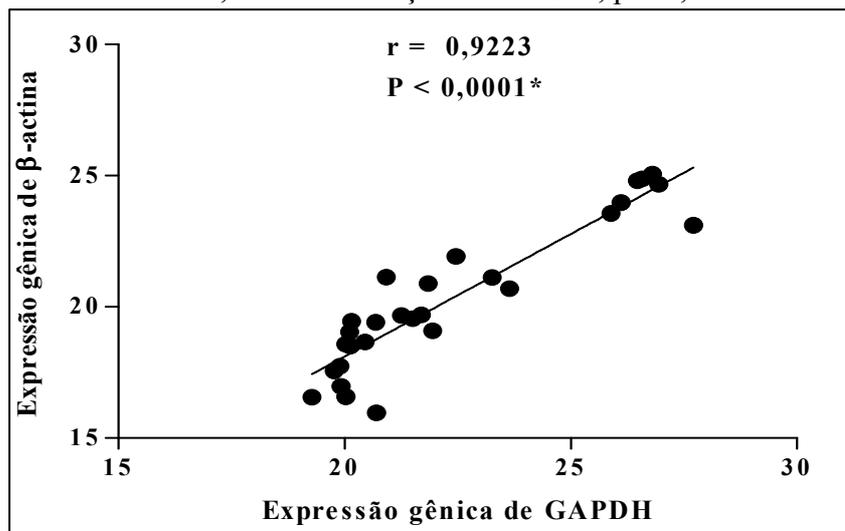
5.2 VALIDAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DA EXPRESSÃO GÊNICA DAS CITOCINAS IFN- γ , IL-4, IL-5 E IL-10.

Nesta metodologia foi realizada a quantificação relativa dos genes pesquisados. Para a validação desta técnica e fidedignidade nos resultados apresentados por ela, as quantificações foram realizadas utilizando dois genes constitutivos para os cálculos de $2^{-\Delta CT}$, o GAPDH e a β -actina. Isto se fez necessário porque o cálculo leva em consideração que os genes ditos

constitutivos apresentam expressão semelhante em todos os tecidos, o que já foi descrito que existem algumas diferenças nessas expressões (VANDESOMPELE et al., 2002). Então, para minimizar os possíveis erros, adota-se a prática de utilização de mais de um gene constitutivo.

Inicialmente foram comparados os valores de CT destes genes constitutivos para cada amostra, conforme descrito nos materiais e métodos anteriormente. A partir desta análise, pôde-se verificar se havia compatibilidade entre a expressão relativa calculada a partir destes dois genes. Como mostra no gráfico 10, houve forte correlação entre os valores de CT destes dois genes ($r = 0,9223$) e com valor de p estatisticamente significativo ($p < 0,0001$), evidenciando valor conjugado de ambos, o que valida o seu comportamento como genes constitutivos nos indivíduos em questão.

Gráfico 10 – Correlação da expressão dos genes constitutivos dos pacientes infectados pelo HTLV-1, de acordo com o CT em escala linear, $r = 0,9223$, $p < 0,0001$. Correlação de Pearson, $p \leq 0,05$.



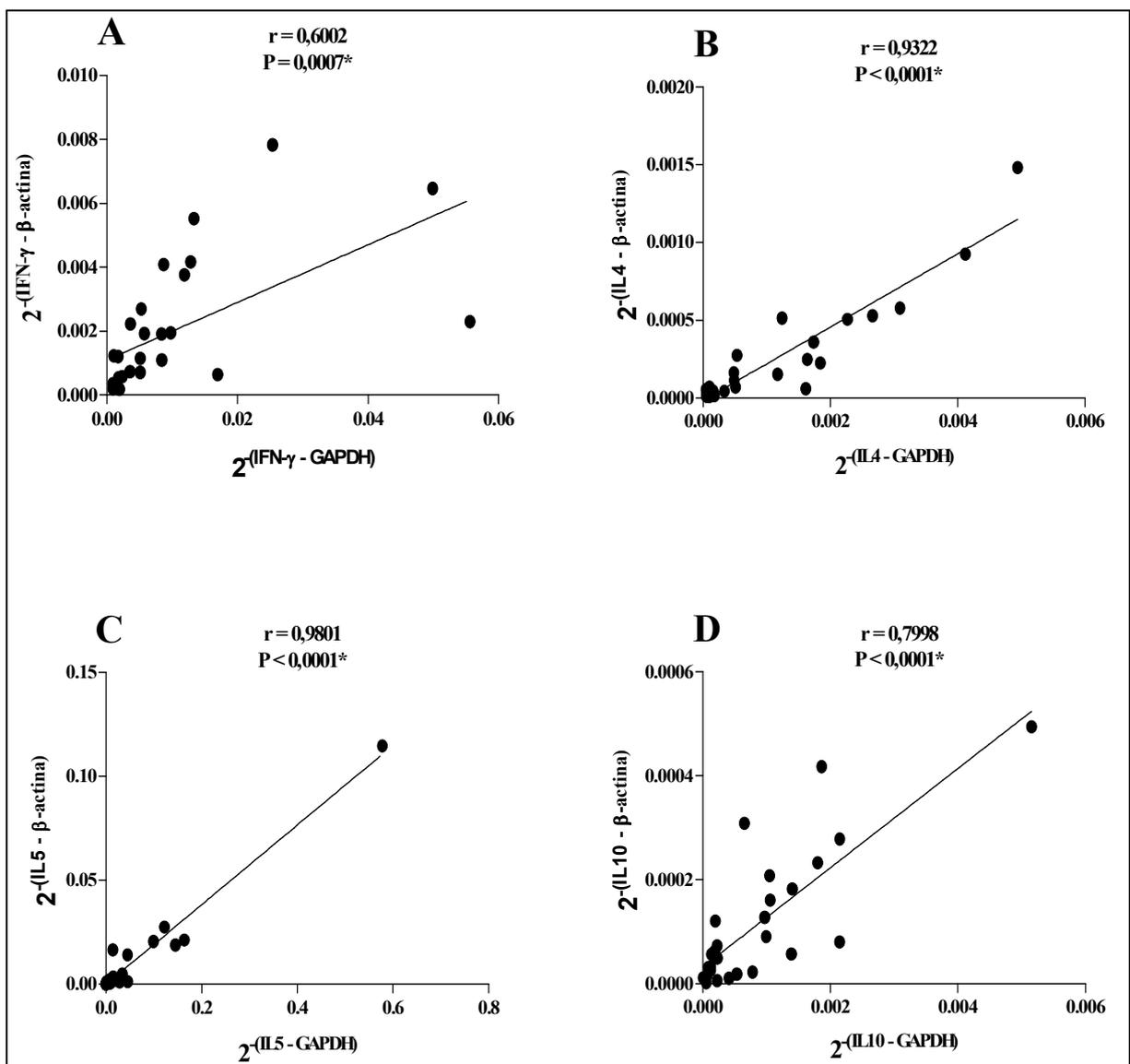
Em seguida foi calculado o $2^{-\Delta CT}$ de cada gene estudado (IFN- γ , IL-4, IL-5 e IL-10) para todos os pacientes, utilizando os CTs de GAPDH e β -actina. A partir destes resultados, foram realizadas as correlações entre os valores de $2^{-\Delta CT}$ de cada gene, calculados com os diferentes genes constitutivos. Os resultados mostraram boa correlação para os quatro genes estudados, como mostram a tabela 3 e gráfico 11. Para os genes IL-4 e IL-5, observou-se forte correlação ($r = 0,9322$ e $r = 0,9801$, respectivamente) e para IFN- γ e IL-10 observou-se correlação moderada ($r = 0,6002$ e $r = 0,7998$, respectivamente). Neste contexto, verificou-se a compatibilidades dos resultados obtidos com os dois genes constitutivos, validando os resultados de quantificação relativa para a técnica de PCR em tempo real.

Tabela 3 – Correlação entre $2^{-\Delta CT}$ dos genes constitutivos, GAPDH e β -actina, e a expressão gênica das citocinas nos pacientes infectados pelo HTLV-1.

Citocinas	N	(r) Pearson	(p) valor	poder 0.05
IFN- γ	28	0,6002	0,0007*	0,9658
IL-4	28	0,9322	< 0,0001*	1,0000
IL-5	28	0,9801	< 0,0001*	1,0000
IL-10	28	0,7998	< 0,0001*	0,9999

* Correlação estatisticamente significativa (Correlação de Pearson, $p \leq 0,05$).

Gráfico 11 – Correlação entre os valores de $2^{-\Delta CT}$ de cada gene das citocinas estudadas segundo os CTs de GAPDH e β -actina, representada em escala linear. (A) Correlação do gene de IFN- γ , $r = 0,6002$, $p = 0,0007$. (B) Correlação do gene de IL-4, $r = 0,9322$, $p < 0,0001$. (C) Correlação do gene de IL-5, $r = 0,9801$, $p < 0,0001$. (D) Correlação do gene de IL-10, $r = 0,7998$, $p < 0,0001$. Correlação de Pearson, $p \leq 0,05$.

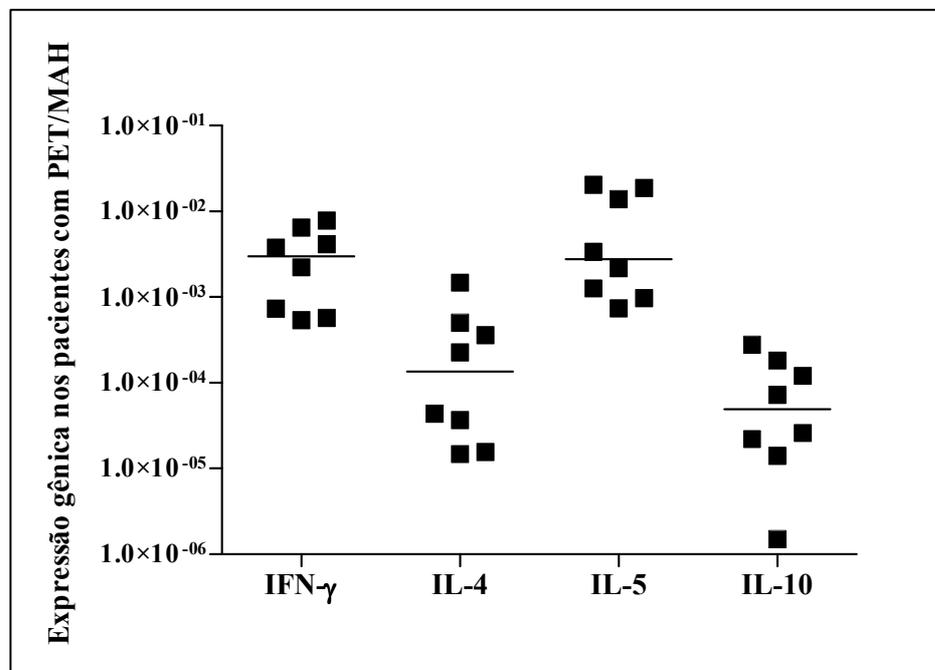


5.3 PERFIL CITOCÍNICO DOS PACIENTES INFECTADOS PELO HTLV-1

Uma vez demonstrada equivalência nos cálculos obtidos em relação aos dois genes constitutivos, foi utilizado o gene β -actina como padrão de referência para a derivação logarítmica ($2^{-\Delta CT}$) para a obtenção da expressão gênica relativa de cada gene estudado (IFN- γ , IL-4, IL-5 e IL-10) nos indivíduos com e sem PET/MAH.

Foram realizadas comparações entre as citocinas nos indivíduos com PET/MAH, totalizando seis análises comparativas, como mostra o gráfico 12.

Gráfico 12 – Perfil da expressão relativa dos genes das citocinas estudadas nos pacientes com PET/MAH em escala de Log10.



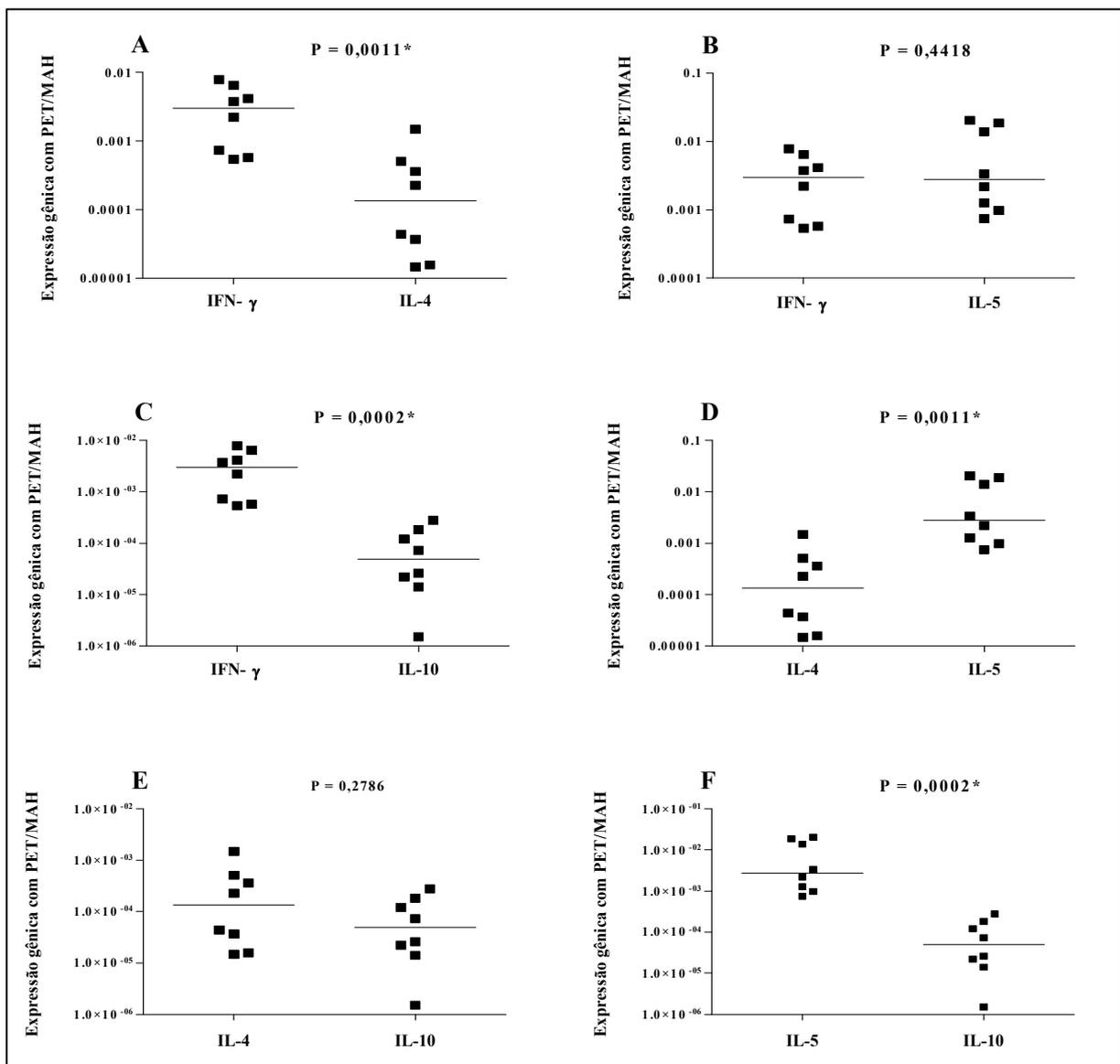
Houve maior expressão gênica de IFN- γ quando comparado a IL-4 ($p = 0,0011$), bem como quando se comparou a IL-10 ($p = 0,0002$), entretanto quando se comparou a IL-5, não se obteve diferença estatisticamente significativa na expressão gênica ($p = 0,4418$), apresentando níveis equivalentes de expressão para ambas as citocinas. Em relação a IL-4, houve uma menor expressão gênica quando comparado a IL-5 ($p = 0,0011$) e quando comparado a IL-10 não se evidenciou uma diferença estatisticamente significativa de expressão gênica ($p = 0,2786$), porém com uma tendência de expressão maior que a IL-10. Por fim, a IL-5 apresentou maior expressão gênica quando se comparou a IL-10 ($p = 0,0002$), como mostra na tabela 4 e é ilustrado no gráfico 13.

Tabela 4 – Análise comparativa da expressão gênica relativa das citocinas estudadas nos pacientes com PET/MAH.

Pacientes	N	Citocinas	Mediana	(p) valor
Com PET/MAH	8	IFN- γ x IL-4	0,002994 x 0,0001350	0,0011*
Com PET/MAH	8	IFN- γ x IL-5	0,002994 x 0,002784	0,4418
Com PET/MAH	8	IFN- γ x IL-10	0,002994 x 0,00004926	0,0002*
Com PET/MAH	8	IL-4 x IL-5	0,0001350 x 0,002784	0,0011*
Com PET/MAH	8	IL-4 x IL-10	0,0001350 x 0,00004926	0,2786
Com PET/MAH	8	IL-5 x IL-10	0,002784 x 0,00004926	0,0002*

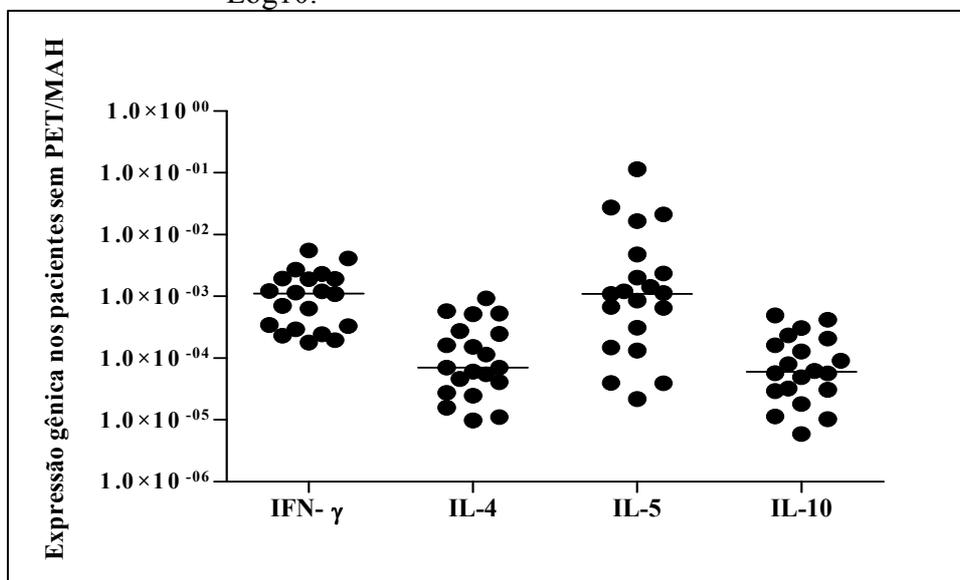
*Diferença estatisticamente significativa (Mann-Whitney, $p \leq 0,05$).

Gráfico 13 – Diferença de expressão gênica relativa das citocinas estudadas nos pacientes com PET/MAH em escala de Log10. (A) IFN- γ e IL-4 ($p = 0,0011$). (B) IFN- γ e IL-5 ($p = 0,4418$). (C) IFN- γ e IL-10 ($p = 0,0002$). (D) IL-4 e IL-5 ($p = 0,0011$). (E) IL-4 e IL-10 ($p = 0,2786$). (F) Diferença entre IL-5 e IL-10 ($p = 0,0002$). Teste de Mann-Whitney, $p \leq 0,05$.



Posteriormente foram realizadas comparações entre as citocinas nos indivíduos sem PET/MAH, totalizando também seis análises comparativas, como mostra o gráfico 14.

Gráfico 14 – Perfil da expressão relativa dos genes das citocinas estudadas nos pacientes sem PET/MAH em escala de Log10.



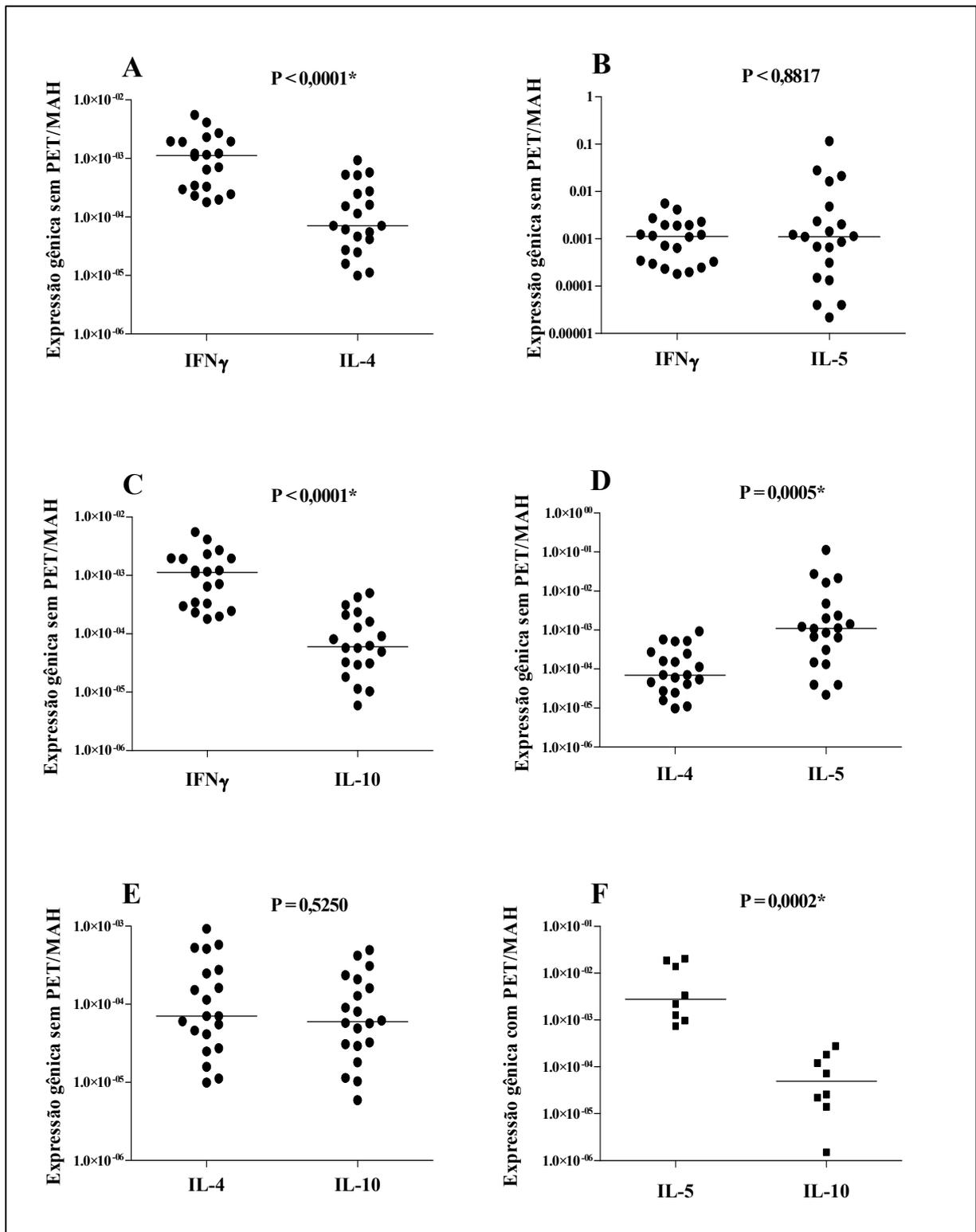
Houve maior expressão gênica de IFN- γ quando comparado a IL-4 ($p < 0,0001$), bem como quando se comparou a IL-10 ($p < 0,0001$), entretanto quando se comparou a IL-5, não se obteve diferença na expressão gênica ($p = 0,8817$), apresentando níveis de expressão equivalentes. Em relação a IL-4, houve menor expressão gênica quando comparado a IL-5 ($p = 0,0005$) e quando comparado a IL-10 não se verificou diferença estatisticamente significativa de expressão gênica ($p = 0,5250$), porém com tendência de expressão maior que a IL-10. Por fim, a IL-5 apresentou maior expressão quando se comparou a IL-10 ($p = 0,0001$), como mostra na tabela 5 e é ilustrado no gráfico 15.

Tabela 5 – Análise comparativa da expressão gênica relativa das citocinas estudadas nos pacientes sem PET/MAH.

Pacientes	N	Citocinas	Mediana	(p) valor
Sem PET/MAH	20	IFN- γ x IL-4	0,001119 x 0,00007059	< 0,0001*
Sem PET/MAH	20	IFN- γ x IL-5	0,001119 x 0,001109	0,8817
Sem PET/MAH	20	IFN- γ x IL-10	0,001119 x 0,00005964	< 0,0001*
Sem PET/MAH	20	IL-4 x IL-5	0,00007059 x 0,001109	0,0005*
Sem PET/MAH	20	IL-4 x IL-10	0,00007059 x 0,00005964	0,5250
Sem PET/MAH	20	IL-5 x IL-10	0,001109 x 0,00005964	0,0001*

*Diferença estatisticamente significativa (Mann-Whitney, $p \leq 0,05$).

Gráfico 15 - Expressão gênica relativa das citocinas IFN- γ , IL-4, IL-5 e IL-10 nos pacientes sem PET/MAH em escala de Log10. (A) Diferença de expressão gênica entre IFN- γ e IL-4 ($p < 0,0001$). (B) Diferença de expressão gênica entre IFN- γ e IL-5 ($p = 0,8817$). (C) Diferença de expressão gênica entre IFN- γ e IL-10 ($p < 0,0001$). (D) Diferença de expressão gênica entre IL-4 e IL-5 ($p = 0,0005$). (E) Diferença de expressão gênica entre IL-4 e IL-10 ($p = 0,5250$). (F) Diferença de expressão gênica entre IL-5 e IL-10 ($p = 0,0001$). Teste de Mann-Whitney, $p \leq 0,05$.



A partir destes resultados obtidos, verificou-se que ambos os grupos de pacientes apresentaram perfis semelhantes de expressão gênica em relação às citocinas estudadas.

5.4 ANÁLISE COMPARATIVA DO PERFIL CITOCÍNICO ENTRE OS PACIENTES COM PET/MAH E PACIENTES SEM PET/MAH

Visto que os pacientes que desenvolveram PET/MAH e os que não a desenvolveram apresentaram o mesmo perfil de expressão, a próxima análise foi comparar a expressão de cada citocina entre os dois grupos. Os pacientes com PET/MAH mostraram maior expressão das citocinas IFN- γ , IL-4 e IL-5 em relação aos pacientes sem PET/MAH. Apesar de não apresentar significância estatística, pode-se verificar maior tendência de produção de citocinas por parte dos pacientes com PET/MAH, principalmente de IFN- γ ($p=0,071$), como mostra o gráfico 16. Em relação a IL-10, os pacientes com PET/MAH tenderam a uma discreta diminuição de expressão em relação aos pacientes sem PET/MAH, porém sem significância estatística, como é ilustrado pelo gráfico 16 e demonstrada na tabela 6.

Tabela 6 – Análise comparativa da expressão gênica relativa das citocinas estudadas em relação aos indivíduos com e sem PET/MAH.

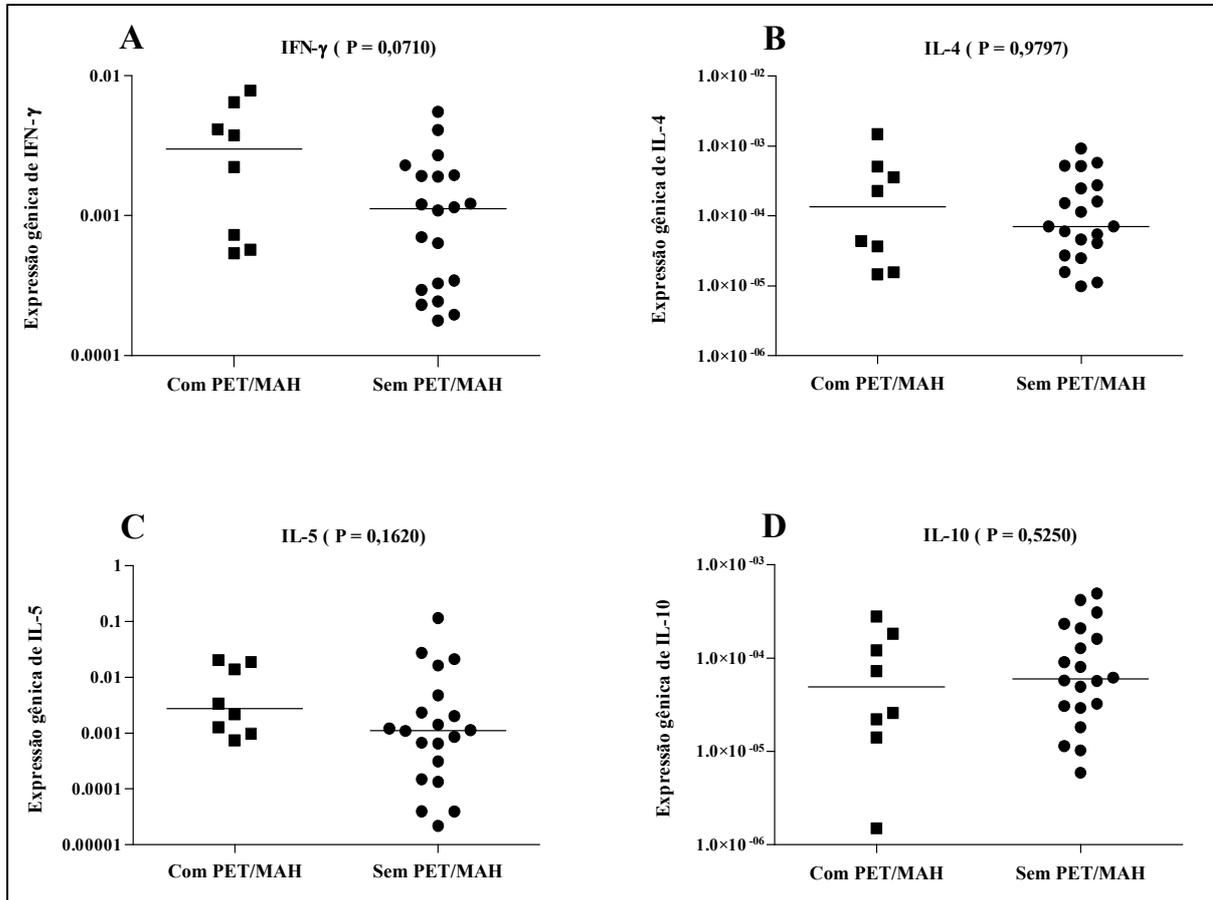
Citocinas	N (amostra)	Mediana	Média \pm DP	(p) valor
IFN- γ	8	0,002994	0,003285 \pm 0,002785	0,0710
	20	0,001119	0,001409 \pm 0,001413	
IL-4	8	0,0001350	0,0003353 \pm 0,0004974	0,9797
	20	0,00007059	0,00001964 \pm 0,0002494	
IL-5	8	0,002784	0,007729 \pm 0,008539	0,1620
	20	0,001109	0,009831 \pm 0,02590	
IL-10	8	0,00004926	0,00008978 \pm 0,00009834	0,5250
	20	0,00005964	0,0001242 \pm 0,0001408	

Teste de Mann-Whitney, $p \leq 0,05$.

DP = Desvio Padrão.

(N = 8) Com PET/MAH; (N = 20) Sem PET/MAH.

Gráfico 16 – Diferença de expressão gênica relativa das citocinas IFN- γ , IL-4, IL-5 e IL-10 nos pacientes com e sem PET/MAH em escala de Log10. (A) Diferença de expressão gênica de IFN- γ ($p = 0,0710$). (B) Diferença de expressão gênica de IL-4 ($p = 0,9797$). (C) Diferença de expressão gênica de IL-5 ($p = 0,1620$). (D) Diferença de expressão gênica de IL-10 ($p = 0,5250$). Teste de Mann-Whitney, $p \leq 0,05$.

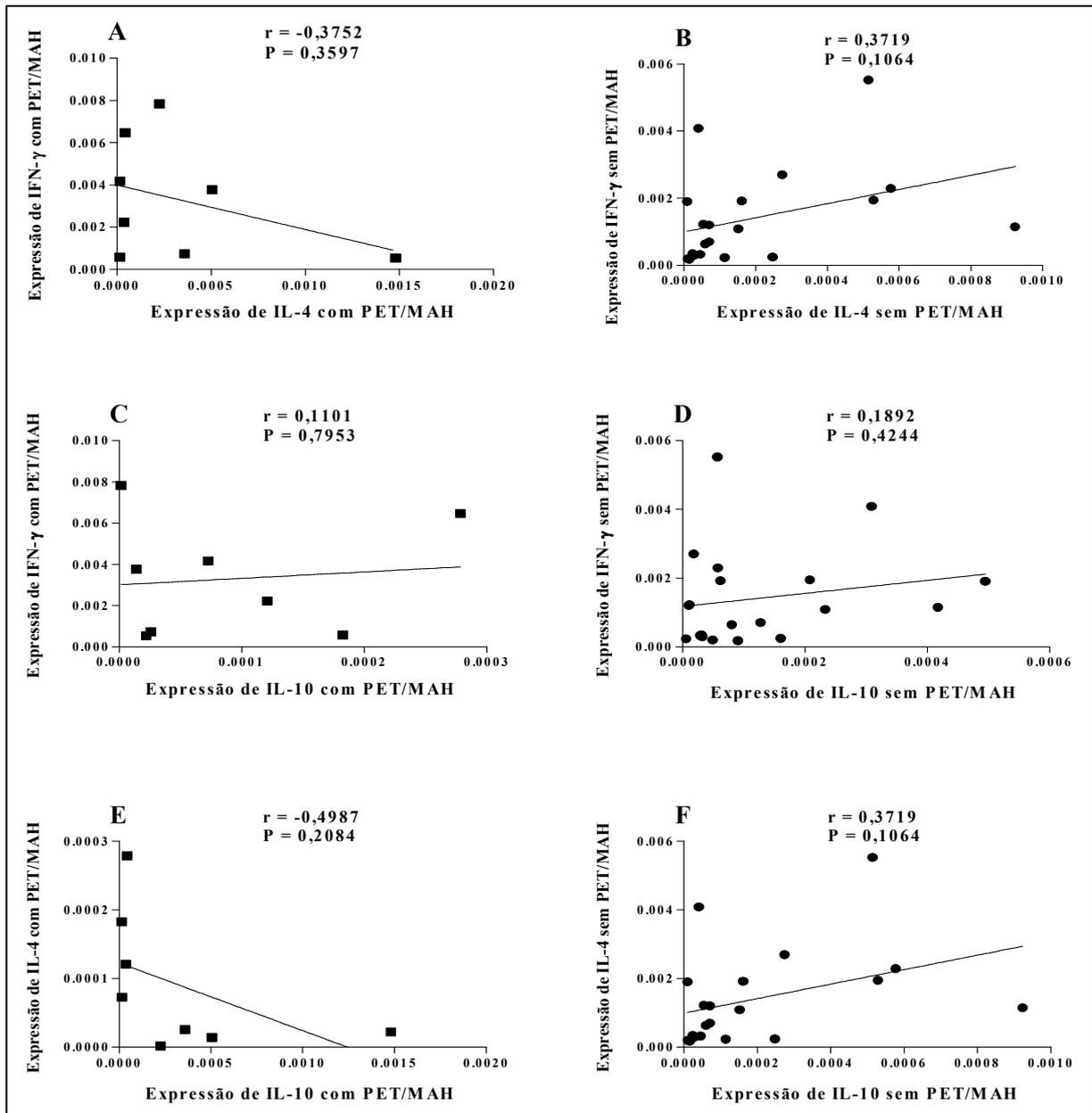


5.5 CORRELAÇÃO DA EXPRESSÃO CITOCÍNICA NOS PACIENTES COM E SEM PET/MAH

Foi observado anteriormente que nos indivíduos com PET/MAH houve maior expressão de IFN- γ , discreto aumento de expressão de IL-4 e discreta diminuição de IL-10. A partir desta observação, e tomando como base que IFN- γ , IL-4 e a IL-10 são antagônicas entre si, buscou-se uma nova análise, a correlação da expressão destas citocinas. Foi realizada para verificar um possível padrão de inversão dos perfis citocínicos. No gráfico 17, os pacientes com PET/MAH, apresentaram correlação negativa entre a expressão de IFN- γ e IL-4, e, entre a expressão de IL-4 e IL-10, mesmo não apresentando resultados significativos ($r = -0,3752$ e $r = -0,4987$, respectivamente). Em relação à expressão de IFN- γ e IL-10, a correlação foi ínfima ($r = 0,1101$). Os pacientes sem PET/MAH, ao contrário que foi observado nos

indivíduos com PET/MAH, apresentaram correlação positiva para todas as análises. Mesmo sem significância estatística a correlação de expressão entre IFN- γ e IL-4 foi de $r = 0,3719$; entre IFN- γ e IL-10 foi de $r = 0,1892$, e, entre IL-4 e IL-10, foi de $r = 0,3719$.

Gráfico 17 – Correlação de expressão gênica relativa das citocinas IFN- γ , IL-4, e IL-10 nos pacientes com e sem PET/MAH em escala de Log10. (A) Correlação da expressão gênica de IFN- γ e IL-4 com PET/MAH ($r = -0,3752$ e $p = 0,3597$). (B) Correlação da expressão gênica de IFN- γ e IL-4 sem PET/MAH ($r = 0,3719$ e $p = 0,1064$). (C) Correlação da expressão gênica de IFN- γ e IL-10 com PET/MAH ($r = 0,1101$ e $p = 0,7953$). (D) Correlação da expressão gênica de IFN- γ e IL-10 sem PET/MAH ($r = 0,1892$ e $p = 0,4244$). (E) Correlação da expressão gênica de IL-4 e IL-10 com PET/MAH ($r = -0,4987$ e $p = 0,2084$). (F) Correlação da expressão gênica de IL-4 e IL-10 sem PET/MAH ($r = 0,3719$ e $p = 0,1064$). Correlação de Pearson, $p \leq 0,05$.

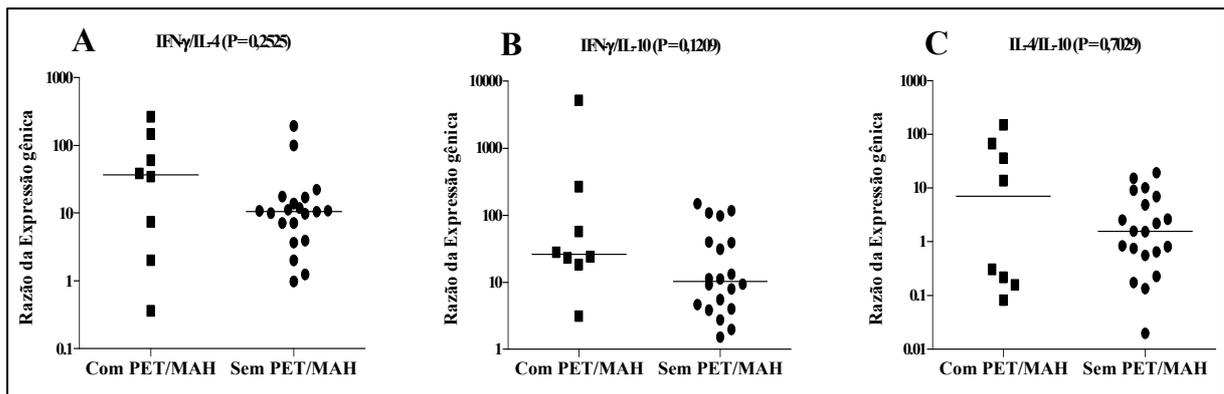


5.6 RAZÃO ENTRE OS PERFIS DE RESPOSTA IMUNOLÓGICA

Depois de realizada a análise da diferença das expressões gênicas das citocinas nos dois grupos de indivíduos estudados, buscou-se analisar a razão entre os perfis citocínicos de resposta imunológica Th1, Th2 e Treg nos pacientes com e sem PET/MAH.

Em todas as comparações, os pacientes com PET/MAH apresentaram razão maior em relação aos pacientes sem PET/MAH, mesmo sem significância estatística como mostra o gráfico 18.

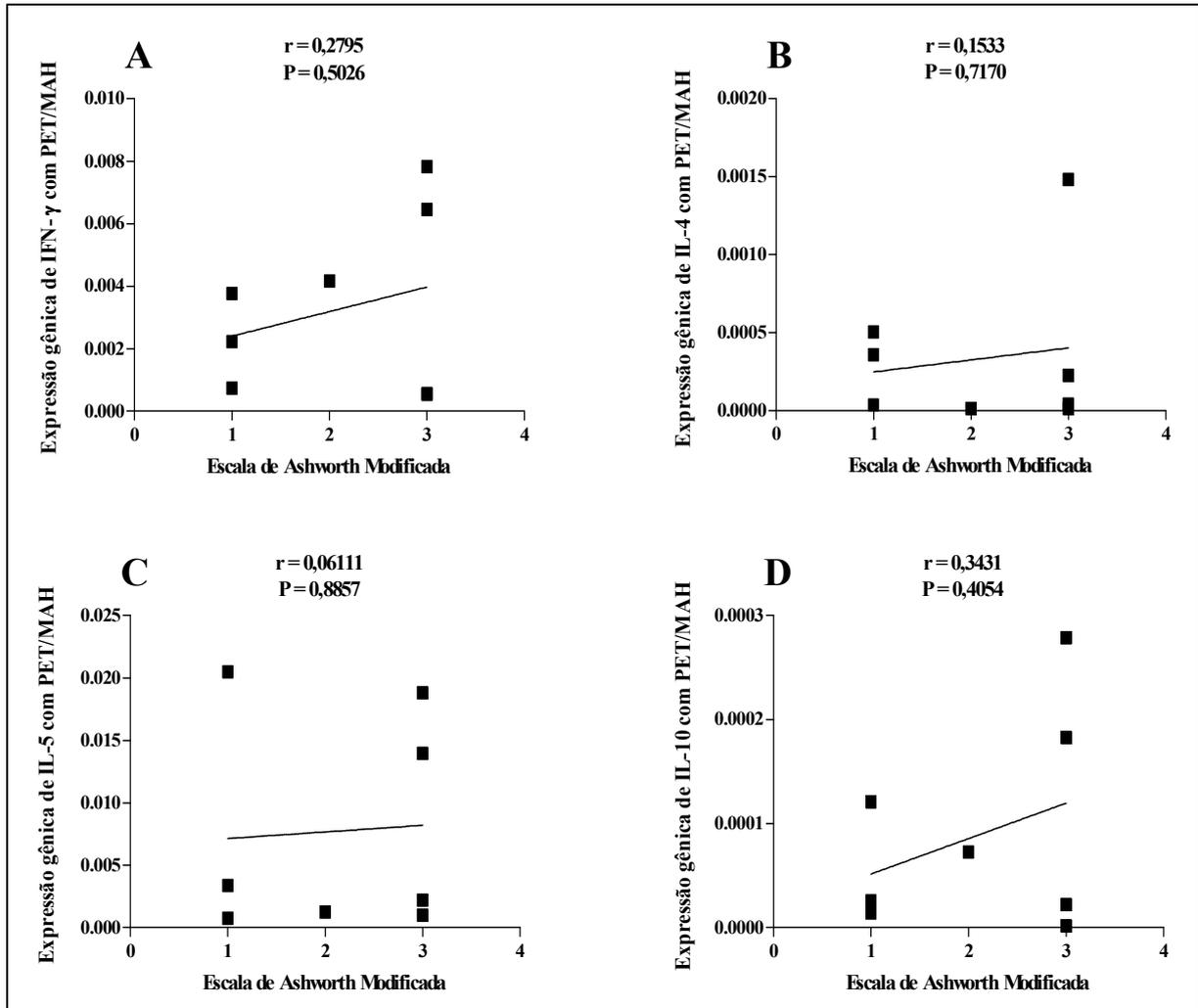
Gráfico 18 – Diferença na expressão gênica relativa entre as razões das citocinas antagônicas (IFN- γ , IL-4 e IL-10 nos pacientes com e sem PET/MAH em escala de Log10. (A) Razão de IFN- γ /IL-4 em pacientes com e sem PET/MAH, ($p = 0,12525$). (B) Razão de IFN- γ /IL-10 em pacientes com e sem PET/MAH, ($p = 0,1209$). (C) Diferença de IL-4/IL-10 em pacientes com e sem PET/MAH, ($p = 0,7029$). Teste de Mann-Whitney, $p \leq 0,05$.



5.7 CORRELAÇÃO DOS PERFIS DE RESPOSTA IMUNOLÓGICA E PERFIL CLÍNICO DOS PACIENTES COM PET/MAH

Durante as avaliações clínicas realizadas nos pacientes com HTLV-1, foi avaliado o grau de espasticidade muscular, bem como a fraqueza proximal dos músculos dos membros inferiores e por fim a existência de auxílio na marcha destes pacientes. Como método de avaliação da espasticidade, foi utilizado a escala de Ashworth Modificada. A partir destes dados foram realizadas correlações desta escala com a expressão gênica das citocinas estudadas. A expressão de IFN- γ e de IL-10 apresentou correlações positivas maiores em relação a IL-4. Já a IL-5 apresentou correlação praticamente nula. Entretanto, as correlações não foram estatisticamente significantes, conforme ilustrado no gráfico 19.

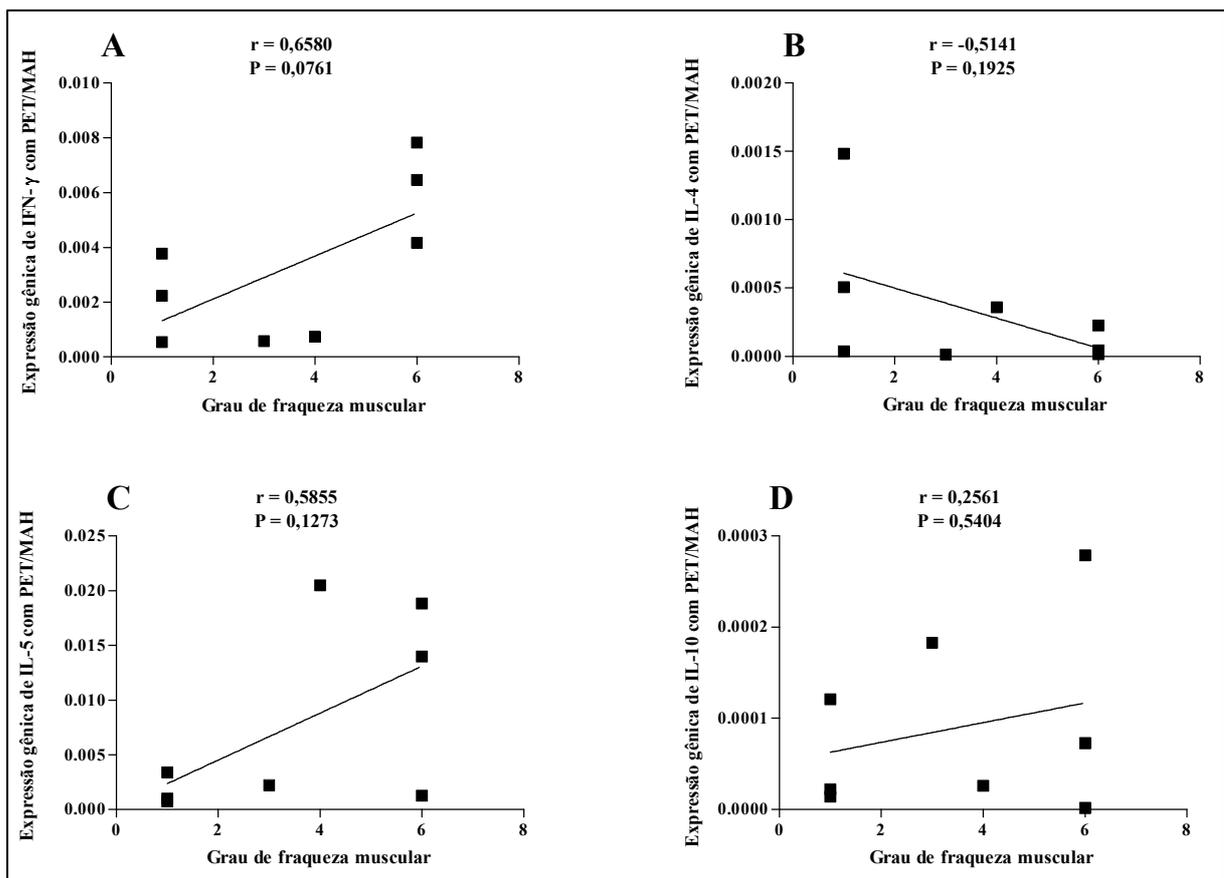
Gráfico 19 – Correlação entre a escala de Ashworth Modificada e a expressão gênica relativa das citocinas IFN- γ , IL-4, IL-5 e IL-10 nos pacientes com PET/MAH em escala linear. (A) Correlação de IFN- γ e a escala de Ashworth modificada ($r = 0,2795$, $p = 0,5026$). (B) Correlação de IL-4 e a escala de Ashworth modificada ($r = 0,1533$, $p = 0,7170$). (C) Correlação de IL-5 e a escala de Ashworth modificada ($r = 0,0611$, $p = 0,8857$). (D) Correlação de IL-10 e a escala de Ashworth modificada ($r = 0,3431$, $p = 0,4054$). Correlação de Pearson, $p \leq 0,05$.



A fraqueza proximal dos membros inferiores é também uma característica que os pacientes com PET/MAH apresentam como manifestação clínica desta patologia. Avaliou-se esta fraqueza utilizando escala de avaliação progressiva segundo o grau de fraqueza muscular e sua limitação na marcha. A partir desta informação contida na avaliação destes pacientes, averiguou-se a correlação do grau de fraqueza muscular e a expressão gênica das citocinas estudadas. Foram consideradas correlações positivas para a expressão de IFN- γ , IL-5 e IL-10. Os resultados mostraram que quanto maior foi o grau de fraqueza muscular maior foi a expressão de IFN- γ , apresentando uma correlação moderada e com valor de p próximo ao considerado estatisticamente significativo ($r = 0,6580$, $p = 0,0761$). A IL-5 apresentou

correlação moderada, porém não foi significativa ($r = 0,5855$, $p = 0,1273$). Já IL-10, apresentou correlação fraca e também não significativa ($r = 0,2561$, $p = 0,5404$). Mesmo não apresentando resultados significantes, a expressão de IL-4 apresentou uma correlação negativa ($r = -0,5141$, $p = 0,1925$) em relação à fraqueza proximal de membros inferiores, mostrando uma tendência de que quanto maior é a fraqueza muscular menor é a expressão gênica desta citocina, apresentando uma correlação inversa quando comparado à expressão de IFN- γ , como pode ser observado no gráfico 20.

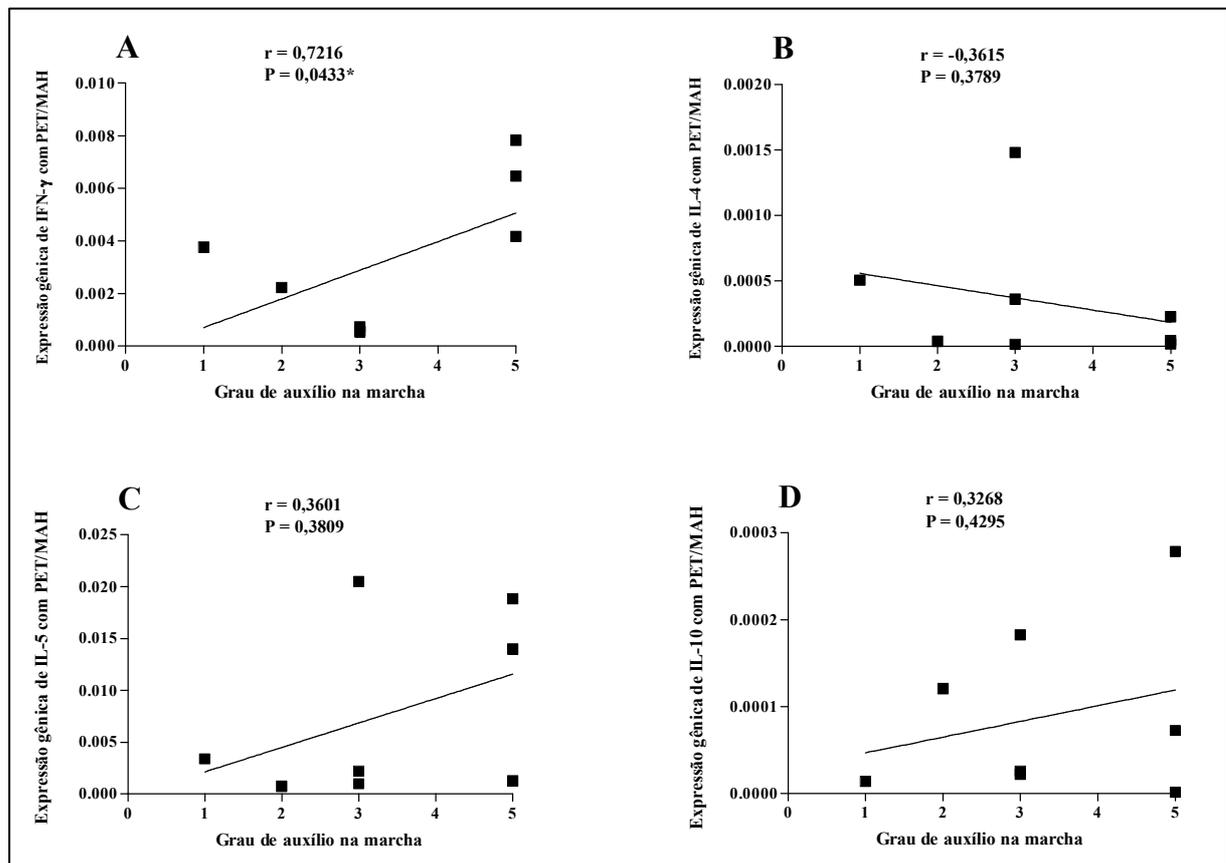
Gráfico 20 – Correlação entre o grau de fraqueza muscular e a expressão gênica relativa das citocinas IFN- γ , IL-4, IL-5 e IL-10 nos pacientes com PET/MAH em escala linear. (A) Correlação de IFN- γ e fraqueza muscular ($r = 0,6580$, $p = 0,0761$). (B) Correlação de IL-4 e fraqueza muscular ($r = -0,5141$, $p = 0,1925$). (C) Correlação de IL-5 e fraqueza muscular ($r = 0,5855$, $p = 0,1273$). (D) Correlação de IL-10 e fraqueza muscular ($r = 0,2561$, $p = 0,5404$). Correlação de Pearson, $p \leq 0,05$.



Os pacientes que desenvolvem PET/MAH apresentam alteração no tônus muscular conhecida como espasticidade, esta alteração leva a um quadro clínico de alteração funcional da marcha, o que a torna alterada. Esta alteração leva o paciente à necessidade de dispositivos que os auxiliem para esta atividade no decorrer evolutivo da doença.

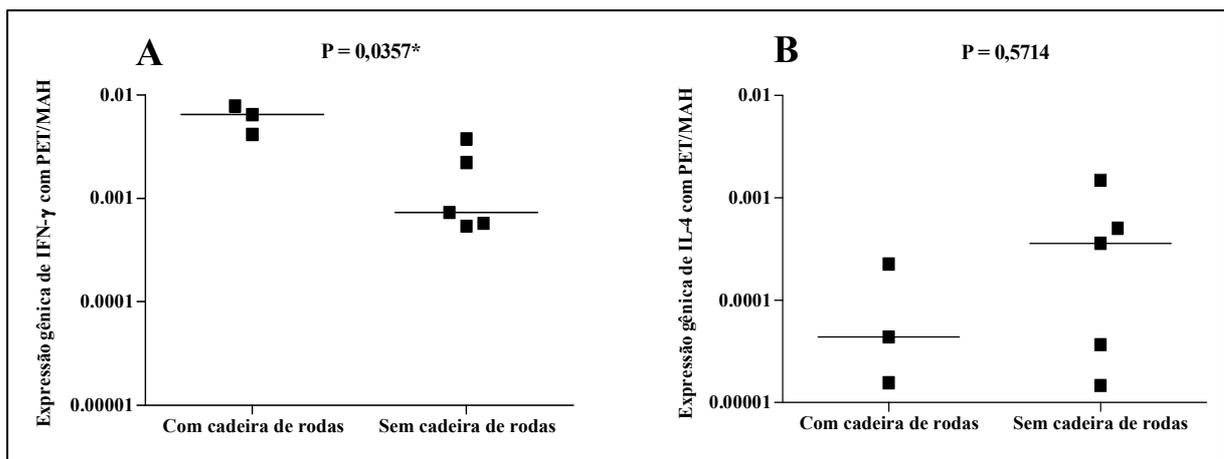
Dos indivíduos presentes no estudo, sete apresentaram dispositivos que os auxiliavam na marcha. A partir destes dados foram realizadas correlações do grau de auxílio na deambulação e a expressão gênica das citocinas estudadas. A expressão de IFN- γ em relação ao grau de auxílio na marcha mostrou resultados estatisticamente significantes, revelando que quanto maior é a expressão gênica de IFN- γ maior é o grau de auxílio na marcha destes pacientes, com correlação considerada moderada ($r = 0,7216$, $p = 0,0433$). Já para as citocinas IL-5 e IL-10, estas correlações foram fracas, não apresentando resultados significantes, ($r = 0,3601$, $p = 0,3809$; $r = 0,3268$, $p = 0,4298$, respectivamente). Entretanto, para a IL-4 esta correlação foi negativa, mostrando uma tendência de que quanto maior é o auxílio na marcha, menor é a expressão gênica de IL-4 ($r = -0,3615$, $p = 0,3789$), apresentando uma correlação inversa quando comparada à expressão de IFN- γ , conforme mostra o gráfico 21.

Gráfico 21 – Correlação entre o grau de auxílio na marcha e a expressão gênica relativa das citocinas IFN- γ , IL-4, IL-5 e IL-10 nos pacientes com PET/MAH em escala linear. (A) Correlação da expressão de IFN- γ e o auxílio na marcha ($r = 0,7216$, $p = 0,0433$). (B) Correlação da expressão de IL-4 e o auxílio na marcha ($r = -0,3615$, $p = 0,3789$). (C) Correlação da expressão de IL-5 e o auxílio na marcha ($r = 0,3601$, $p = 0,3809$). (D) Correlação da expressão de IL-10 e o auxílio na marcha ($r = 0,3268$, $p = 0,4298$). Correlação de Pearson, $p \leq 0,05$.



A partir das correlações realizadas entre as citocinas estudadas e o auxílio na marcha, buscou-se verificar a diferença de expressão gênica das citocinas IFN- γ e IL-4, nos pacientes cuja necessidade de deambulação seria aqueles indivíduos com e sem cadeira de rodas. A expressão de IFN- γ foi maior nos pacientes cuja necessidade de deambulação também era maior, ou seja, aqueles indivíduos com cadeira de rodas, com valor de p estatisticamente significativo ($p = 0,0357$). Como se verificou uma correlação negativa em relação à expressão de IL-4 e auxílio da marcha buscou-se a diferença de expressão para esta citocina. Os resultados evidenciaram que houve uma tendência de menor expressão de IL-4 nos pacientes com maior auxílio da marcha (cadeira de rodas), mesmo não apresentando significância estatística ($p = 0,5714$), conforme mostra o gráfico 22.

Gráfico 22 – Diferença de expressão gênica de IFN- γ e IL-4 nos indivíduos com e sem cadeira de rodas em escala de Log10. (A) Diferença de IFN- γ em pacientes com e sem cadeira de rodas ($p = 0,0357$). (B) Diferença de IL-4 em pacientes com e sem cadeira de rodas ($p = 0,5714$). Teste de Mann-Whitney, $p \leq 0,05$.



6 DISCUSSÃO

O HTLV-1 é um vírus sexualmente transmitido associado a várias doenças, em particular a PET/MAH. A infecção por este vírus no Brasil é considerada um problema de saúde pública, onde as doenças associadas a ele impõem custos sociais e financeiros aos indivíduos infectados, seus familiares e também ao sistema público de saúde. É uma infecção que ainda não possui uma diretriz de políticas públicas específicas em seu enfrentamento.

No Brasil aproximadamente 20 milhões de pessoas estão infectadas pelo HTLV-1, sendo endêmico no país. O Pará é considerado um dos quatro Estados brasileiros com maior prevalência desta infecção, e, mesmo assim, grande parte dos profissionais de saúde desconhecem este vírus. É necessário mais estudos em relação as doenças associadas ao HTLV-1, principalmente a PET/MAH que é a desordem neuroinflamatória etiologicamente associada ao vírus. Esta doença associada ainda permanece sem cura, apenas com tratamentos paliativos para minimizar os sintomas clínicos (MONTANHEIRO et al., 2009; ROMANELLI; CARNEIRO-PROIETTI; PROIETTI, 2010).

A fisiopatologia da PET/MAH ainda permanece com vários pontos obscuros. Fatores genéticos e imunológicos do hospedeiro são os principais responsáveis pelas manifestações clínicas associadas a ele. A persistência do HTLV-1 nos linfócitos CD4⁺ determina uma interação prolongada entre o vírus e o sistema imunológico do hospedeiro. Esta interação pode levar a desequilíbrio na resposta imunológica, resultando no aumento do processo inflamatório contra o vírus. Os indivíduos que desenvolvem PET/MAH apresentam resposta imunológica com perfil Th1, com produção aumentada de IFN- γ e TNF- α , que estão hiperexpressas no sangue periférico (GONÇALVES et al., 2010; SANTOS et al., 2006).

Outra questão importante é que as células infectadas pelo HTLV-1 são as células T CD4⁺, em particular as Treg, que são responsáveis pelo controle da resposta inflamatória exagerada. Alguns trabalhos relatam que, quando infectadas pelo HTLV-1, estas células podem aumentar a produção de citocinas que são consideradas antiinflamatórias, como é o caso da IL-10 e TGF- β , o que ocorre em pacientes que desenvolvem LLcTA, onde há imunossupressão. No caso dos pacientes que desenvolvem PET/MAH, o que é descrito é o oposto, mostrando diminuição destas citocinas, explicando a resposta inflamatória aumentada (MONTANHEIRO et al., 2009; SANTOS et al., 2006).

Tendo em vista esta desregulação imunológica apresentada nos indivíduos que desenvolvem a doença associada, este trabalho avaliou o perfil imunológico periférico dos pacientes infectados pelo HTLV-1 que desenvolveram ou não PET/MAH. A resposta

imunológica destes indivíduos foi correlacionada com os aspectos clínicos apresentados por eles, focando na sua função motora, avaliando o grau de espasticidade, de fraqueza muscular e o de auxílio na marcha.

A quantificação relativa das citocinas estudadas mostrou que tanto os pacientes que desenvolveram ou não a PET/MAH apresentaram predomínio do perfil de resposta imunológica do tipo Th1. Houve maior expressão de IFN- γ , quando comparado a expressão de IL-4 e IL-10 de forma significativa, como mostram os gráficos 12 e 13 para os pacientes que desenvolveram PET/MAH, e, os gráficos 14 e 15, para os indivíduos sem PET/MAH. Este resultado corrobora com os de Brito-Melo et al. (2007), onde os autores, através da citometria de fluxo, encontraram uma maior expressão de IFN- γ tanto nos indivíduos com PET/MAH como nos assintomáticos.

Como foi observado o predomínio do perfil Th1 nos dois grupos estudados, realizou-se a análise comparativa entre os indivíduos com e sem PET/MAH para a expressão das citocinas estudadas. Em relação ao IFN- γ , os indivíduos com PET/MAH apresentaram expressão duas vezes maior (Mediana: $2,9 \times 10^{-3}$) quando comparados aos indivíduos sem PET/MAH (Mediana: $1,1 \times 10^{-3}$), conforme gráfico 16. Apesar de não apresentar significância estatística ($p = 0,0710$), este achado corrobora com aqueles encontrados no estudo de Muniz et al. (2006), que quantificou, através do método de ELISA, os níveis desta citocina no sangue de pacientes infectados por HTLV-1. Os autores mostram que os indivíduos com PET/MAH apresentaram altos níveis de IFN- γ quando comparado aos assintomáticos.

Um ponto importante que se pode verificar também foi em relação à expressão de IL-4. Nos pacientes com PET/MAH, a IL-4 apresentou expressão maior quando comparada aos indivíduos sem PET/MAH, como mostra o gráfico 16. Mesmo não apresentando significância estatística ($p = 0,9797$), os pacientes com PET/MAH apresentaram expressão de IL-4 quase duas vezes maior (Mediana: $1,3 \times 10^{-4}$), quando comparados aos pacientes sem PET/MAH (Mediana: $0,7 \times 10^{-4}$). Este resultado mostra o inverso daquele obtido por Furukawa et al. (2003) onde através da citometria de fluxo, a maior intensidade de fluorescência de IL-4 foi nos indivíduos assintomáticos quando comparado com PET/MAH. E também o trabalho de Best et al. (2006), através do método de ELISA, constatou que não existia diferença estatística entre PET/MAH e assintomáticos, apresentando uma ligeira diminuição dos níveis de IL-4 em indivíduos com doença associada. Entretanto, o estudo de Gaspar-Sobrinho et al. (2010), utilizando o método de ELISA em indivíduos portadores de HTLV-1 e atopia mostrou que, mesmo esses pacientes apresentando aumento dos níveis de citocina da resposta Th1, havia o

aumento da resposta Th2 que levaria ao desenvolvimento da atopia. Sugerindo que o perfil Th1 e Th2 podem co-existir, e este fato pode mostrar a quebra do paradigma de que estes perfis apresentam uma relação inversa entre si.

Apesar da IL-4 estar pouco mais expressa nos pacientes com PET/MAH, quando se analisou a correlação entre a expressão IFN- γ e IL-4, verificou-se que a correlação é negativa para os pacientes com PET/MAH ($r = -0,3752$) gráfico 17. Diferente do que é visto para os pacientes sem PET/MAH que apresenta um $r = 0,3719$. Sendo assim, mesmo havendo maior expressão de IL-4 nos pacientes com PET/MAH, a expressão de IFN- γ é de tal forma superior que não interfere no quadro inflamatório.

O equilíbrio entre as respostas Th1 e Th2 se mostra de forma importante no controle do desenvolvimento de doenças inflamatórias. Várias doenças inflamatórias mostram desequilíbrio entre estas respostas (GONÇALVES et al., 2008). Através do cálculo da razão entre as expressões de IFN- γ e IL-4, pode-se verificar o quanto seria a predominância da resposta Th1 sobre a Th2. A gráfico 18 mostra a predominância maior do perfil Th1 (IFN- γ) nos indivíduos com PET/MAH quando comparado aos sem PET/MAH. Mesmo sem significância estatística, os pacientes com PET/MAH apresentaram razão três vezes maior (Mediana: 36.69), quando comparado aos sem PET/MAH (Mediana: 10.62). Estes achados corroboram com o que é descrito na literatura, relatando a predominância do perfil Th1 em pacientes com PET/MAH, conforme é citado por Araya et al. (2011), Gonçalves et al. (2008), Nakamura (2009) e Nishiura et al. (2004).

Outro fato foi observado em relação à expressão de IL-5. A expressão gênica desta citocina foi semelhante nos dois grupos estudados. Isso indica que esta citocina, provavelmente não participa da patogênese da PET/MAH (gráficos 12, 13, 14 e 15). Este resultado pode ser visto também nos estudos de Gaspar-Sobrinho et al. (2010), onde foi relatada correlação positiva destas citocinas apresentando níveis de expressão elevados nestes pacientes.

Quando analisada a expressão de IL-5, observou-se expressão semelhante entre os dois grupos, porém os pacientes com PET/MAH apresentaram discreto aumento na expressão (Gráfico 16). Este resultado coincide com os estudos de Muniz et al. (2006) e Best et al. (2006), onde através do método de ELISA puderam demonstrar que os níveis de IL-5 não apresentou diferença entre os indivíduos assintomáticos e com PET/MAH.

O sistema imunológico possui mecanismos de controle para que não ocorra exacerbação da resposta contra algum corpo estranho. E isso é tarefa desempenhada pelas

células Tregs que produzem citocinas antiinflamatórias, como a IL-10. Sabe-se que o HTLV-1 infecta as células Treg e pode alterar sua função (ARAYA et al., 2011). Sendo assim, analisou-se neste estudo expressão de IL-10. Nos indivíduos com e sem PET/MAH a expressão de IL-10 foi significativamente menor quando comparado ao IFN- γ e IL-5. Mesmo sem significância estatística, a expressão de IL-10 também foi menor quando comparado a IL-4, conforme mostram os gráficos 13 e 15. Estes resultados compartilham daqueles encontrados por Muniz et al. (2006) e Montanheiro et al. (2009), utilizando o método de ELISA onde verificaram baixos níveis de IL-10 tanto em indivíduos com PET/MAH como em assintomáticos quando comparado a outras citocinas estudadas.

O gráfico 16 mostra a comparação da expressão de IL-10 em ambos os grupos. Houve discreta diminuição desta citocina nos indivíduos com PET/MAH (Mediana: $0,4 \times 10^{-4}$) em relação aos sem PET/MAH (Mediana: $0,5 \times 10^{-4}$). Estes achados corroboram com o estudo de Best et al. (2006) e Muniz et al. (2006) onde se observou baixos níveis de IL-10 nos indivíduos com doença associada quando comparado aos indivíduos assintomáticos. Apesar da diminuição não se apresentar significante, nota-se um fato interessante. A expressão de IL-10 acompanha a expressão das citocinas inflamatórias para controlar a ação destas e diminuir o dano tecidual. No gráfico 17, verifica-se que as correlações entre IL-10 e IFN- γ se mostram fracamente positivas nos dois grupos de pacientes. No gráfico 18, pode-se verificar a razão entre IFN- γ /IL-10 e IL-4/IL-10 para pacientes com e sem PET/MAH. Os pacientes com PET/MAH a razão é 2,5 vezes maior (Mediana: 26,24) em relação aos pacientes sem PET/MAH (Mediana: 10,27). Sendo assim, nota-se que a expressão de IL-10 está prejudicada nos pacientes com PET/MAH, o que está descrito na literatura.

Esta tendência de menor expressão nestes indivíduos pode ser explicada pelo fato de as células Treg serem os principais reservatórios do HTLV-1 no sangue periférico. Quando estão infectadas, apresentam alteração na sua função levando a diminuição da expressão de IL-10. Isto implica na eficácia do controle da resposta exacerbada do tipo Th1, fazendo com que o processo inflamatório perdure. A persistência da inflamação pode implicar no desenvolvimento da PET/MAH, causando lesão ao SNC.

Através da rotina de atendimento dos pacientes com PET/MAH pelos profissionais de saúde, podem ser encontrados vários sinais clínicos informando que a doença está progredindo. A desregulação na resposta imunológica pode estar envolvida nesta progressão da doença. Conforme o estudo de Saito (2010), estas alterações imunológicas podem ser associadas com os sinais clínicos que estes indivíduos apresentam.

Todos os indivíduos participantes do estudo foram atendidos no Ambulatório do NMT da UFPA. Durante as consultas médicas foi constatado que os pacientes apresentavam alguma queixa sintomatológica que poderia estar relacionado ou não ao HTLV-1. Como já foi relatado na literatura, os pacientes que apresentam infecção pelo HTLV-1 podem ter manifestações reumatológicas associada ao vírus, conforme relata Romanelli, Caramelli e Proietti, (2010). Dentre as manifestações reumatológicas avaliadas durante as consultas, ambos os grupos de pacientes apresentavam sintomatologias como artrose, xerostomia e xerofthalmia, sendo estas manifestações clínicas características de processo inflamatório.

Além dos sintomas reumatológicos, outra queixa bastante revelada pelos pacientes foi em relação ao processo doloroso que estes indivíduos relatavam. Este sintoma foi principalmente na região lombar com irradiação para os membros inferiores, com sensação de cansaço e perda de força muscular. Estes mesmos sintomas também foram relatados por alguns indivíduos sem PET/MAH, porém com menor frequência. Deste modo pode-se constatar que estes indivíduos atendidos no NMT, que não apresentavam PET/MAH, não poderiam ser considerados como assintomáticos.

Em indivíduos infectados pelo HTLV-1, nos quais ocorre o desenvolvimento da PET/MAH, verifica-se a ativação do sistema imunológico, gerando um processo inflamatório crônico na medula espinhal em alguns indivíduos infectados. Este processo resulta em uma lesão neural com desmielinização levando a sintomas neurológicos característicos da PET/MAH, como comprometimentos motores (fraqueza e espasticidade em membros inferiores), sensitivos (parestesias e dores neuropáticas), distúrbios esfínterianos vesicais e intestinais, além de disfunção erétil no homem. Neste trabalho, a análise dos sintomas neurológicos foi direcionada aos resultantes na perda funcional da marcha. Esta alteração funcional foi avaliada segundo o critério de função muscular tendo como variáveis três aspectos clínicos, podendo citar o tônus muscular (espasticidade), força muscular e o auxílio na marcha. Estes critérios foram escolhidos baseados em sua importância clínica para a progressão da doença levando a alterações na qualidade de vida destes pacientes. Este fato pode ser confirmado por Macêdo et al. (2004), onde estes autores, através de um estudo de coorte, pesquisaram o HTLV entre pacientes que apresentavam doença neurológica em Belém do Pará. Foi observado em seu trabalho que 80% dos pacientes HTLV-1/2-soropositivos, apresentavam como sintomatologias a espasticidade, fraqueza muscular e dificuldades de locomoção. Levando a conclusão de que estes sintomas estão correlacionados com o desenvolvimento de mielopatias crônicas.

Em relação à avaliação da espasticidade dos indivíduos com doença associada, utilizou-se como instrumento de avaliação a escala de Ashworth Modificada, tomando como referência os músculos adutores de quadril, extensores de joelho e os flexores plantares de tornozelo, que são os principais músculos testados quando são realizadas pesquisas envolvendo espasticidade de membros inferiores, como pode ser observado nos estudos de Ansari et al. (2008) e Ghotbi et al. (2011), em que eles utilizam esta mesma escala de avaliação, assim como estes mesmos músculos citados.

Pode-se perceber ainda, neste estudo, que todos os pacientes com PET/MAH apresentaram aumento de tônus muscular, porém de forma variada conforme mostra tabela 2. No entanto, sabe-se que quanto maior é a lesão no trato medular específico para controle do tônus muscular, maior é o grau de espasticidade. Não foram encontrados estudos que fizessem esta correlação entre expressão de citocinas e o grau de espasticidade, mas estudos clínicos realizados em indivíduos com PET/MAH segundo Biswas et al. (2009), Kendall et al. (2009) e Grindistaff e Gruener (2005), relatam que a espasticidade aumentada está relacionada com a progressão da doença. As expressões gênicas de IFN- γ e IL-4 apresentaram correlação positiva fraca ($r = 0,279$ e $r = 0,1533$, respectivamente) com o grau de espasticidade, porém sem significância estatística. Já a IL-5 apresentou relação positiva ínfima ($r = 0,0611$) e também, sem significância estatística conforme mostra o gráfico 19. A correlação não foi expressiva, porém isso pode ser explicado pelo tratamento o qual a maioria dos pacientes estava sendo submetido. Alguns pacientes faziam uso do Baclofeno para o controle do tônus muscular durante a coleta dos dados. O uso desta medicação poderia ter alterado o verdadeiro grau de espasticidade destes indivíduos, sendo um possível viés nos resultados de correlação entre as citocinas estudadas e a escala de Ashworth Modificada.

A fraqueza proximal é uma das características clínicas presentes nos indivíduos com PET/MAH. Esta informação foi coletada através das fichas clínicas dos pacientes, a qual foi avaliada através de uma escala progressiva de força muscular. A interpretação desta escala mostra que quanto maior é a graduação obtida por ela, maior é o grau de fraqueza muscular. A expressão de citocinas inflamatórias podem estar implicadas no aparecimento deste sintoma clínico. A partir desta ideia, buscou-se uma correlação entre as citocinas estudadas e o grau de força muscular. Quanto maior foi a expressão IFN- γ , maior foi a fraqueza muscular presente nestes indivíduos, apresentando correlação positiva moderada de $r = 0,6580$, com valor de p de 0,07. Já a IL-4, curiosamente, mostrou correlação negativa com $r = -0,5141$, porém, sem

significância estatística, conforme mostra o gráfico 20. Este dado pode reforçar a relação do IFN- γ no desenvolvimento dos sintomas clínicos da PET/MAH.

Com a progressão da doença, os indivíduos ficam dependentes de dispositivos que os auxiliem na deambulação. De acordo com a literatura, a progressão natural da doença leva os pacientes a necessitarem de aparelhos que os ajudem cada vez mais na marcha. Os indivíduos com PET/MAH inicialmente necessitam de bengalas, e, em um estágio mais avançado da doença, ficam confinados a cadeira de rodas.

Com base no processo evolutivo da doença, buscou-se a correlação do grau de auxílio na marcha com os níveis de expressão gênica nestes pacientes. Este estudo apresentou correlação positiva estatisticamente significante em relação à expressão de IFN- γ e o grau de auxílio na marcha ($r = 0,7216$ e $p = 0,0433$). Foi observado que, quanto maior o nível de expressão de IFN- γ , maior foi a dependência de dispositivos que auxiliam na locomoção, no caso destes pacientes foi a cadeira de rodas. Em relação à expressão de IL-4 a análise de correlação foi negativa ($r = -0,3615$), porém sem significância estatística (Gráfico 21), igual ao que foi encontrada em relação à fraqueza muscular. Com isso, realizou outra análise adicional nos pacientes com PET/MAH, comparando pacientes que usavam ou não cadeira de rodas em relação à expressão de IFN- γ e IL-4. Foi constatado que aqueles indivíduos com cadeira de rodas (Mediana: $6,459 \times 10^{-3}$) apresentavam, de forma significativa ($p = 0,0357$), maior expressão gênica para IFN- γ , quase que nove vezes maior quando comparado aos sem cadeira de rodas (Mediana: $0,7298 \times 10^{-3}$). Já em relação a IL-4, houve uma menor expressão desta citocina, oito vezes menor (Mediana: $0,4379 \times 10^{-4}$), nos indivíduos com cadeira de rodas quando comparado aqueles sem cadeiras de rodas (Mediana: $3,589 \times 10^{-4}$), porém sem significância estatística ($p = 0,5714$), conforme mostra o gráfico 22.

Todos estes resultados direcionam para a conclusão que a resposta inflamatória deflagrada pelo IFN- γ está envolvida na progressão e desfecho clínico dos pacientes que desenvolvem PET/MAH. O que não ocorreu em relação a IL-4, que apresentou correlação inversa na maioria das análises. Apesar dos relatos na literatura não relacionarem a expressão de citocinas com o quadro clínico, os trabalhos mostram que o IFN- γ está intimamente relacionado com o desenvolvimento de PET/MAH como já descrito por Montanheiro et al. (2009), Yamano et al. (2009) e Gonçalves et al. (2008). A expressão de IL-10 se mostrou menor nos pacientes que desenvolveram PET/MAH, o que também já foi descrito por outros autores como Brito-Melo et al. (2007) e Muniz et al. (2006).

Este estudo da resposta imunológica nos pacientes infectados por HTLV-1 teve como objetivo mostrar a relação das citocinas inflamatórias e antiinflamatórias na progressão clínica destes pacientes que desenvolveram PET/MAH. Os pacientes com PET/MAH apresentaram maior resposta inflamatória do tipo Th1, com diminuição de citocina antiinflamatória quando comparados aos pacientes sem PET/MAH. Estes resultados quando relacionados aos sintomas clínicos, demonstraram que a resposta inflamatória do tipo Th1 é importante para o desenvolvimento e progressão da PET/MAH, pois, mesmo que os pacientes estivessem utilizando medicamento antiespásticos como Baclofeno, antiinflamatórios não hormonais como diclofenaco, nimesulida e naproxeno e os antiinflamatórios hormonais (corticóides), os resultados foram significativos.

7 CONCLUSÕES

- Nos indivíduos estudados, tanto nos pacientes que desenvolveram PET/MAH como aqueles que não a desenvolveram, através dos resultados obtidos, sugere que houve predomínio do perfil Th1 (IFN- γ) em ambos os grupos;
- A expressão relativa de IL-4 nos indivíduos com PET/MAH sugere tendência de maior expressão desta citocina nestes indivíduos, podendo indicar uma maior ativação desta citocina;
- Em ambos os grupos, com e sem PET/MAH, a expressão relativa de IL-5 se manteve sem diferença estatisticamente significativa, podendo sugerir que esta citocina não participa da patogênese da PET/MAH;
- Nos indivíduos com PET/MAH, mesmo sem resultados significantes, estes indivíduos tenderam a apresentar uma discreta diminuição da expressão relativa de IL-10, podendo indicar que a expressão desta citocina encontra-se prejudicada nestes indivíduos;
- A partir dos resultados obtidos, pode-se também verificar que a expressão aumentada de IFN- γ pode estar envolvida na patogênese e progressão desta doença. As análises de correlação da função motora com a expressão gênica indicam conclusões interessantes. Neste aspecto, a expressão relativa de IFN- γ com o grau de espasticidade foi fraca, porém, este fato ocorreu provavelmente devido uma possível interferência da medicação utilizada pelos pacientes, o Baclofeno;
- Em relação ao grau de fraqueza muscular e a expressão relativa de INF- γ , a análise de correlação se mostrou positiva moderada. Já o que se observou em relação à expressão de IL-4 foi correlação negativa. Isso indicaria uma possível participação do IFN- γ neste sintoma clínico e a expressão de IL-4 não estaria envolvida neste processo;
- Quando foi realizada a correlação entre a expressão relativa de IFN- γ com o grau de auxílio na marcha, observou-se uma correlação moderada com resultado significativo. O contrário foi observado em relação a expressão de IL-4, mostrando-se negativa. Isso poderia indicar a participação do IFN- γ e não da IL-4 nesse processo;

- Foi observado também que aqueles indivíduos que desenvolveram PET/MAH e que utilizavam como auxílio na marcha a cadeira de rodas, a expressão relativa de IFN- γ foi estatisticamente maior quando comparado, a estes mesmos indivíduos, sem o uso de cadeira de rodas.

REFERÊNCIAS

- AHUJA, J. et al. Induction of pro-inflammatory cytokines by human T-cell leukemia virus type-1 Tax protein as determined by multiplexed cytokine protein array analyses of human dendritic cells. **Biomed. Pharmacother.**, Philadelphia, v.61, n.4, p.201-8, 2007.
- ANSARI, N. N. et al. The interrater and intrarater reliability of the Modified Ashworth Scale in the assessment of muscle spasticity: limb and muscle group effect. **NeuroRehabilitation**, Tehran, v. 23, n. 3, p. 231-7, 2008.
- ARAUJO, A. Q.; SILVA, S. T. The HTLV-1 neurological complex. **Lancet neurol.**, Rio de Janeiro, v. 5, n. 12, p. 1068-76, 2006.
- ARAUJO, A. Q. et al. HTLV-1 and neurological conditions: when to suspect and when to order a diagnostic test for HTLV-1 infection? **Arq. Neuropsiquiatr.**, Rio de Janeiro, v. 67, n. 1, p.132-138, 2009.
- ARAYA, N. et al. Human T-Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1) and Regulatory T Cells in HTLV-1-Associated Neuroinflammatory Disease. **Viruses**, v. 3, n. 9, p. 1532-1548, 2011.
- ASHWORTH, B. Preliminary trial of carisoprodol in multiple sclerosis. **Practitioner.**,v. 192, p. 540-2, 1964.
- ASQUITH, B.; BANGHAM, C. R. How does HTLV-I persist despite a strong cell-mediated immune response? **Trends Immunol.**, London, v. 29, n. 1, p. 4-11, 2008.
- BEST, I. et al. Proviral load and immune markers associated with human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in Peru. **Clin. Exp. Immunol.**, Lima, v. 146, n. 2, p. 226-33, 2006.
- BEST, I. et al. IFN- γ production in response to Tax 161-233, and frequency of CD4⁺ Foxp3⁺ and Lin HLA-DR^{high} CD123⁺ cells, discriminate HAM/TSP patients from asymptomatic HTLV-1-carriers in a Peruvian population. **Immunology**, Lima, v. 128, p. 777-86, 2009.
- BEWICK, S.; YANG, R.; ZHANG, M. The danger is growing! A new paradigm for immune system activation and peripheral tolerance. **PLoS One**, Tennessee, v. 4, n. 12, p. e8112, 2009.
- BISWAS, H. H. et al. Neurologic abnormalities in HTLV-I- and HTLV-II-infected individuals without overt myelopathy. **Neurology**, San Francisco, v. 73, n. 10, p. 781-9, 2009.
- BOHANNON, R. W.; SMITH, M. B. Interrater reliability of a modified Ashworth scale of muscle spasticity. **Phys. Ther.**, v. 67, n. 2, p. 206-7, 1987.
- BOXUS, M.; WILLEMS, L. Mechanisms of HTLV-1 persistence and transformation. **Br. J. Cancer**, Gembloux, v. 101, n. 9, p. 1497-501, 2009.
- BRITO-MELO, G. E. A. et al. IL-10 produced by CD4⁺ and CD8⁺ T cells emerge as a putative immunoregulatory mechanism to counterbalance the monocyte-derived TNF-alpha and guarantee asymptomatic clinical status during chronic HTLV-I infection. **Clin. Exp. Immunol.**, Minas Gerais, v. 147, n. 1, p. 35-44, 2007.

CAROD-ARTAL, F. J.; MESQUITA, H. M.; RIBEIRO, L. S. Manifestaciones neurológicas y discapacidad en pacientes que padecen mielopatía asociada al HTLV-I. **Neurologia**, Brasília, v. 23, n. 2, p.78-84, 2008.

CASTRO-COSTA, C. M. et al. Pain in tropical spastic paraparesis/HTLV-I associated myelopathy patients. **Arq. Neuropsiquiatr.**, Ceará, v. 67, n. 3-b, p. 866-870, 2009.

CASTRO, L. H. et al. HTLV-I associated myelopathy in Brazil: a preliminary report. **Arq. Neuropsiquiatr.**, São Paulo, v. 47, n.4, p. 501-2, 1989.

CASSEB, J., OLIVEIRA, A.C.P. HTLV. Disponível em: <<http://www.htlv.com.br/index.htm>>. Acessado em: 21/02/2011.

CATALAN-SOARES, B., CARNEIRO-PROIETTI, A. B., E PROIETTI, F. A. Heterogeneous geographic distribution of human T-cell lymphotropic viruses I and II (HTLV-I/II): serological screening prevalence rates in blood donors from large urban areas in Brazil. **Cad. Saude Publica**, v. 21, n.3, p. 926-31, 2005.

CHAMPS, A. P. S. et al. Mielopatía asociada ao HTLV-1: análise clínico-epidemiológica em uma série de casos de 10 anos. **Rev. Soc. Brás. Med. Trop.**, Minas Gerais, v. 43, n. 6, p. 668-672, 2010.

DEFINO, H. L. A. Trauma raquimedular. **Medicina**, São Paulo, v. 32, p. 388-400, 1999.

FRANZOI, A. C. et al. Perfil funcional de locomoção em um grupo de pacientes com lesão medular atendidos em um centro de reabilitação. **Coluna/Columna**, Rio de Janeiro, v. 8, n. 4, p. 401-407, 2009.

FURUKAWA, Y. et al. Different Cytokine Production in Tax-Expressing Cells between Patients with Human T Cell Lymphotropic Virus Type I (HTLV-I)-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis and Asymptomatic HTLV-I Carriers. **J. Infect. Dis.**, Kagoshima, v. 187, n.7, p. 1116-25, 2003.

GASPAR-SOBRINHO, F. P. et al. Clinical and immunological features of patients with atopy and concomitant HTLV-1 infection. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Bahia, v. 43, n. 12, p. 1167-72, 2010.

GHOTBI, N. et al. Measurement of lower-limb muscle spasticity: intrarater reliability of Modified Modified Ashworth Scale. **J. Rehabil. Res. Dev.**, Tehran, v. 48, n. 1, p. 83-8, 2011.

GONÇALVES, D. U. et al. HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP) Inflammatory Network. **Inflamm.**, Minas Gerais, v. 7, n. 2, p. 98-107, 2008.

GONÇALVES, D. U. et al. Epidemiology, Treatment, and Prevention of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1-Associated Diseases. **Clin. Microbiol. Rev.**, Minas Gerais, v.23, n.3, p. 577-85, 2010.

GOON, P. K. et al. High frequencies of Th1-type CD4(+) T cells specific to HTLV-1 Env and Tax proteins in patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Blood**, London, v. 99, n. 9, p. 3335-41, 2002.

GOON, P. K. et al. Human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I)-specific CD4+ T cells: immunodominance hierarchy and preferential infection with HTLV-I. **J. Infect. Dis.**, London, v. 189, n. 12, p. 2294-8, 2004.

GRINDSTAFF, P.; GRUENER, G. The peripheral nervous system complications of HTLV-1 myelopathy (HAM/TSP) syndromes. **Semin. Neurol.**, Illinois, v. 25, n. 3, p. 315-27, 2005.

HERAUD, J. M. et al. Immunological changes and cytokine gene expression during primary infection with human T-cell leukaemia virus type 1 in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). **Virology**, French Guiana, v. 361, n. 2, p. 402-11, 2007.

HIGUCHI, M.; FUJII, M. Distinct functions of HTLV-1 Tax1 from HTLV-2 Tax2 contribute key roles to viral pathogenesis. **Retrovirology**, Niigata, n. 6, p. 117, 2009.

IRISH, B. P. et al. Molecular Mechanisms of Neurodegenerative Diseases Induced by Human Retroviruses: A Review. **Am. J. Infect. Dis.**, Philadelphia, v. 5, n. 3, p. 231-258, 2009.

ISHAK, R. et al. HTLV-I associated myelopathy in the northern region of Brazil (Belém-Pará): serological and clinical features of three cases. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Pará, v. 35, n. 3, p. 243-246, 2002.

IZUMO, S. Neuropathology of HTLV-1-associated myelopathy (HAM/TSP). **Neuropathology**, Kagoshima, v. 30, p. 480-5, 2010.

JEANG, K. T. HTLV-1 and adult T-cell leukemia: insights into viral transformation of cells 30 years after virus discovery. **J. Formos. Med. Assoc.**, Maryland, v. 109, n. 10, p. 688-93, 2010.

KENDALL, E. A. et al. Early neurologic abnormalities associated with human T-cell lymphotropic virus type 1 infection in a cohort of Peruvian children. **J. Pediatr.**, Nashville, v. 155, n. 5, p. 700-6, 2009.

KITAGAWA, T. et al. Antibodies to HTLV-I in Japanese immigrants in Brazil. **JAMA**, v. 56, n. 17, p. 2342, 1986.

LANNES, P. et al. Paraparesia Espástica Tropical – Mielopatia associada ao vírus HTLV- I: possíveis estratégias cinesioterapêuticas para a melhora dos padrões de marcha em portadores sintomáticos. **Rev. Neurocienc.**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 3, p. 153-160, 2006.

MACÊDO, O. et al. Human T-cell lymphotropic virus types I and II infections in a cohort of patients with neurological disorders in Belém, Pará, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, Pará, v. 46, n. 1, p. 13-7, 2004.

MACKENZIE, C. R.; CHARLSON, M. E. Standards for the use of ordinal scales in clinical trials. **Br. Med. J.**, New York, v. 292, v. 6512, p. 40-3, 1986.

MACNAMARA, A. et al. HLA class I binding of HBZ determines outcome in HTLV-1 infection. **PLoS Pathog.**, London, v. 6, n. 9, p. e1001117, 2010.

MAJOROVITS, E. et al. Human T-lymphotropic virus-1 visualized at the virological synapse by electron tomography. **PLoS One**, Oxford, v. 3, n. 5, p. e2251, 2008.

MATSUURA, E.; YAMANO, Y.; JACOBSON, S. Neuroimmunity of HTLV-I Infection. **J. Neuroimmune Pharmacol.**, Bethesda, v. 5, n. 3, p. 310-25, 2010.

MICHAËLSSON, J. et al. The frequency of CD127^{low} expressing CD4⁺CD25^{high} T regulatory cells is inversely correlated with human T lymphotropic virus type-1 (HTLV-1) proviral load in HTLV-1-infection and HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **BMC Immunol.**, San Francisco, v. 9, p. 41, 2008.

MINUTOLI, V. P. et al. Efeito do movimento passivo contínuo isocinético na hemiplegia espástica. **Acta Fisiatr.**, São Paulo, v. 14, n. 3, p. 142-48, 2007.

MONTANHEIRO, P. A. et al. The Elevated Interferon Gamma Production is an Important Immunological Marker in HAM/TSP Pathogenesis. **Scand. J. Immunol.**, São Paulo, v. 70, n.4, p. 403-7, 2009.

MONTES, M. et al. Regulatory T cell expansion in HTLV-1 and strongyloidiasis co-infection is associated with reduced IL-5 responses to Strongyloides stercoralis antigen. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, Lima, v. 3, n. 6, p. e456, 2009.

MUNIZ, A. L. et al. Association of cytokines, neurological disability, and disease duration in ham/tsp patients. **Arq. Neuropsiquiatr.**, Bahia, v. 64, n. 2-A, p. 217-21, 2006.

NAKAMURA, T. HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP): the role of HTLV-I-infected Th1 cells in the pathogenesis, and therapeutic strategy. **Folia Neuropathol.**, Nagasaki, v. 47, n. 2, p. 182-94, 2009.

NAKHOSTIN-ANSARI, N. et al. A comparative study on the inter-rater reliability of the Ashworth Scales in assessment of spasticity. **Acta Med. Iran.**, Tehran, v. 44, n. 4, p. 246-250, 2006.

NISHIURA, Y. et al. Increased mRNA expression of Th1-cytokine signaling molecules in patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Tohoku. J. Exp. Med.**, Nagasaki, v. 204, n. 4, p. 289-98, 2004.

OLIERE, S. et al. Modulation of innate immune responses during human T-cell leukemia virus (HTLV-1) pathogenesis. **Cytokine Growth Factor Rev.**, Montreal, v. 22, n.4, p. 197-210, 2011.

OLIVEIRA, S. R.; AVELINO, M. M. Importância da infecção pelo Vírus Linfotrófico-T Humano tipo 1 (HTLV-1), síndromes clínicas associadas e transmissão vertical. **Ver. Patol. Trop.**, Goiânia, v. 36, n. 1, p. 17-34, 2007.

REKAND, T. Clinical assessment and management of spasticity: a review. **Acta Neurol. Scand. Suppl.**, Bergen, n. 190, p. 62-6, 2010.

- RIBEIRO, M. A. et al. Geographic distribution of human T-lymphotropic virus types 1 and 2 among mothers of newborns tested during neonatal screening, Minas Gerais, Brazil. **Rev. Panam. Salud. Publica.** Minas Gerais, v. 27, n. 5, p. 330-7, 2010.
- ROMANELLI, L. C. F.; CARAMELLI, P.; PROIETTI, A. B. F. C. O vírus linfotrópico de células T humanos tipo 1 (HTLV-1): Quando suspeitar da infecção? **Rev. Assoc. Med. Brás.,** Minas Gerais, v. 56, n. 3, p. 340-7, 2010.
- SAITO, M. Immunogenetics and the Pathological Mechanisms of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1- (HTLV-1-)Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP). **Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.,** Okinawa, 2010.
- SANTOS, S. B. et al. Modulation of T Cell Responses in HTLV-1 Carriers and in Patients with Myelopathy Associated with HTLV-1. **Neuroimmunomodulation,** Salvador, v. 13, n.3, p. 145-51, 2006.
- SANTOS, S. B.; MUNIZ, A. L.; CARVALHO, E. M. Imunopatogênese da mielopatia associada ao HTLV-I. **Gaz. méd. Bahia,** Bahia, v. 79, n. 1, p. 11-17, 2009.
- SATOU, Y.; MATSUOKA, M. HTLV-1 and the host immune system: how the virus disrupts immune regulation, leading to HTLV-1 associated diseases. **J. Clin. Exp. Hematop.,** Kyoto, v. 50, n. 1, p. 1-8, 2010.
- SONODA, S.; LI, H. C.; TAJIMA, K. Ethnoepidemiology of HTLV-1 related diseases: Ethnic determinants of HTLV-1 susceptibility and its worldwide dispersal. **Cancer Sci.,** Kagoshima, v. 102, n. 2, p. 295-301, 2011.
- SUEMORI, K. et al. HBZ is an immunogenic protein, but not a target antigen for human T-cell leukemia virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes. **J. Gen. Virol.,** Ehime, v. 90, n. 8, p. 1806-11, 2009.
- TOULZA, F. et al. High frequency of CD4+FoxP3+ cells in HTLV-1 infection: inverse correlation with HTLV-1-specific CTL response. **Blood,** London, v. 111, n. 10, p. 5047-53, 2008.
- VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol.,** Ghent, v. 3, n. 7, 2002.
- YAMANO, Y. et al. Abnormally high levels of virus-infected INF γ +CCR4+CD4+CD25+ T cells in a retrovirus-associated neuroinflammatory disorder. **Plos One,** Kawasaki, v. 4. n. 8, p. e6517, 2009.
- YASUNAGA, J.; MATSUOKA, M. Human T-cell leukemia virus type I induces adult T-cell leukemia: from clinical aspects to molecular mechanisms. **Cancer Control,** Kyoto, v. 14, n. 2, p. 133-40, 2007.
- YELNIK, A. P. et al. How to clinically assess and treat muscle overactivity in spastic paresis. **J. Rehabil. Med.,** Paris, v. 42, n. 9, p. 801-7, 2010.

APÊNDICES

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS

Correlação entre a avaliação clínica e o padrão de resposta imunológica periférica de pacientes acometidos por paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1).

As pessoas que são infectadas pelo HTLV-1 podem desenvolver várias doenças, dentre elas, uma lesão na coluna que leva a dificuldade de caminhar, a paraparesia espástica. No entanto, a maioria dos indivíduos infectados não adoecem. Para adoecer, o vírus causa mudanças na defesa do corpo. Para entender e tratar melhor as doenças causadas pelo HTLV, este trabalho se propõe a estudar as defesas do corpo juntamente com as alterações dos pacientes infectados com HTLV. Para isso, coletaremos amostras de sangue e realizaremos avaliação clínica, sem qualquer outra intervenção.

Se você tiver qualquer dúvida sobre este estudo, você pode entrar em contato com George Alberto da Silva Dias, aluno do curso de Mestrado em Doenças Tropicais pela UFPA pelo telefone (91)8108-9582. Se você tiver dúvidas sobre seus direitos ou com relação aos aspectos éticos do trabalho, você pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (CEP) do Núcleo de Medicina Tropical - UFPA – Av. Generalíssimo Deodoro, 92, Umarizal, Belém – PA; Telefone 3241-0032.

É garantida a liberdade de retirar o consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo sem qualquer prejuízo à continuidade de tratamento na instituição. As informações serão analisadas em conjunto a outros pacientes, não divulgadas as suas identificações. Não há nenhuma despesa pessoal adicional ao participante do estudo e nenhuma compensação financeira relacionada à sua participação. Os dados obtidos por sua participação serão apenas utilizados para este estudo.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Correlação entre a Avaliação Clínica, Padrão de Resposta Periférica e a Função Tímica de Pacientes Acometidos por Paraparesia Espástica Tropical/Mielopatia Associada ao HTLV”.

Eu discuti com o George Alberto da Silva Dias sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim, quais são os propósitos, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Belém __/__/20__

Participante

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente para a participação neste estudo.

Belém __/__/20__

Pesquisador

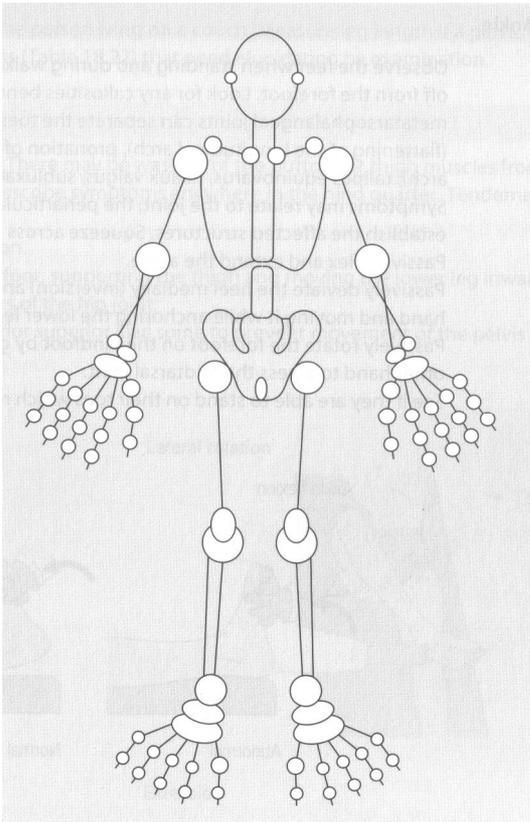
ANEXOS

ANEXO A – FICHA DE AVALIAÇÃO CLÍNICA

Origem:
[1] NMT
[2] URE-Reduto

Número ____ RG-NMT _____ RG-HUJBB _____
 Iniciais _____ Sexo [1] Masc [2] Fem Idade ____ anos
 Etnia [1] Branco [2] Pardo [3] Amarelo [4] Índio [5] Negro
HTLV → [0]Negativo [1]HTLV 1 [2]HTLV 2
Método [1]ELISA [2]Western Blot [3]PCR
 Modo de infecção: [1]Vertical [2]Transfusão sanguínea [3]Agulha contaminada [4]Contato sexual [5] Desconhecido
 Tempo provável de infecção ____ [] anos / [] meses / [] Desconhecido
 Comorbidades: _____ Medicações: _____

Investigação reumatológica



Artralgia [1] Tempo ____ [] anos / [] meses / [] dias
 Artrite [2] Tempo ____ [] anos / [] meses / [] dias → **Pedir RX**
 [1] Monoarticular [2] Oligoarticular (2-4) [3] Poliarticular (≥5)

Rigidez Matinal [0] Não [1] < 1h [2] ≥ 1h
 RX__ [1] ____ [2] ____ [3] ____ [4] ____ [5] ____
 RX__ [1] ____ [2] ____ [3] ____ [4] ____ [5] ____
 RX__ [1] ____ [2] ____ [3] ____ [4] ____ [5] ____
 [1] Redução do espaço articular
 [2] Osteófitos
 [3] Esclerose subcondral
 [4] Osteopenia justa-articular
 [5] Erosão

Outras manifestações reumatológicas:

[1] Bursite _____
 [2] Tendinite _____
 [3] Epicondilite _____
 [4] Outras _____

Síndrome sicca Xerostomia [0] Não [1] Sim Tempo ____ [] anos / [] meses / [] dias
 Xeroftalmia [0] Não [1] Sim Tempo ____ [] anos / [] meses / [] dias

Se algum achado positivo:

* Oftalmologia:

- T. Schirmer [0] > 5mm [1] ≤ 5mm
- Rosa Bengala [0] NL [1] ≥ 4 (Sistema de van Bijsterveld)

* Serviço de Patologia Bucal e Medicina Nuclear:

- Bx gl salivar _____
- Cintilo de gls salivares [0] NL [1] Deficit de função _____

Avaliação muscular

Mialgia [0] Não [1] Sim

Fraqueza Proximal [0] Não [1] Sim

- Graduação [1] [2] [3] [4] [5] [6]

- Mingazzini

MMSS [1] $\geq 2'$ [2] $< 2'$ ___ segsMMII [1] $\geq 2'$ [2] $< 2'$ ___ segs

- Biópsia muscular

- ENMG

[1] Nenhuma anormalidade ao exame

[2] Nenhuma anormalidade ao exame, fadigabilidade fácil ou diminuição da tolerância ao exercício

[3] Grau discreto de atrofia de um ou mais grupos musculares

[4] Marcha alterada; incapacidade para correr, mas hábil p/ subir escadas s/ suporte para as mãos

[5] Marcha muito alterada; lordose acentuada, incapacidade p/ subir escadas ou se levantar da cadeira s/ apoio

[6] Incapacidade para andar sem assistência

Outras manifestações

Cutâneas

Biópsia _____

Linfonodomegalias

Biópsia _____

Oculares:

[] Uveíte → [1] Dor [2] Hiperemia [3] Fotofobia [4] Turvação [5] Redução da acuidade
[1] Unilateral [2] Bilateral

Encaminhar para OFTALMO →

[] Confirmado [1] Anterior [2] Posterior [3] Intermediária [4] Panuveíte

[] Afastado → Diagnóstico _____

[] Outras _____

Neurológicas [] PET / MAH

[] Outras _____

Outros órgãos e sistemas [] LTA

Laboratório

Hemograma	Hb	Ht	Leuco	Seg	Linfo	Plaqt
PAIs	VHS	PCR				
EFP	Alfa1	Alfa2	Beta	Albumina	Gama	
Auto-anticorpos	Perfil					
	Anti-DNA	Anti-Sm	Anti-P	Anti-Ro	Anti-La	Anti-RNP
	Anti-Jo-1	Látex	WR	Anti-CCP		
Sorologias	Anti-HCV	HbsAg	Anti-HBc	Anti-HIV		
Carga Proviral	[0] Indetectável	[1] Detectável _____ cópias				
Polimorfismos	-610Fas	IVS3nt169FasL		IVS2nt-124FasL		
Outros	TSH	T4L	CPK	AST	ALT	Creat
Outros	CD4			CD8		

Critérios de Exclusão

[Sim]	[Não]	Sorologia positiva para Hepatite B
[Sim]	[Não]	Sorologia positiva para Hepatite C
[Sim]	[Não]	Sorologia positiva para HIV
[Sim]	[Não]	Tireoidopatia
[Sim]	[Não]	Hepatopatia (AST e/ou ALT > 2x o limite superior da normalidade)
[Sim]	[Não]	Nefropatia (Creatinina > 1,5mg/dl)
[Sim]	[Não]	Uso de glicocorticóides sistêmicos, atual ou nos últimos 6 meses
[Sim]	[Não]	Uso de imunossupressores, atual ou nos últimos 6 meses
[Sim]	[Não]	Uso de antiretrovirais, atual ou nos últimos 6 meses
[Sim]	[Não]	Manifestações/doenças reumatológicas com sorologia para HTLV 1 / 2 (+) e PCR negativa
[Sim]	[Não]	Não assinar o termo de consentimento

Critérios para classificação da Artrite Reumatóide – ACR	
[1]	Rigidez Matinal \geq 1h*
[2]	Artrite em 3 ou + áreas articulares observada pelo médico*
[3]	Artrite de mãos*
[4]	Artrite simétrica*
[5]	Nódulos reumatóides
[6]	Fator reumatóide positivo
[7]	Alterações radiológicas
Artrite Reumatóide [0] Não (<4critérios) [1] Sim (\geq4 critérios)	

Critérios de Classificação Internacional Revisados para Síndrome de Sjögren		
[1] Sintomas oculares	Você tem olho seco, diariamente, persistentemente, há mais de 3 meses?	
	Você tem sensação recorrente de areia nos olhos?	
	Você necessita usar lágrima artificial mais de 3 vezes ao dia?	
[2] Sintomas orais	Você tem sensação de boca seca, diariamente, há mais de 3 meses?	
	Você tem inchaço das glândulas salivares, recorrente ou persistente, enquanto adulto?	
	Você frequentemente ingere líquidos para facilitar a deglutição, principalmente de alimentos sólidos?	
[3] Sinais oculares	Teste de Schirmer (\leq 5mm em 5 minutos)	
	Escore de Rosa Bengala ou outro corante (\geq 4 no Sistema de van Bijsterveld)	
[4] Histopatologia	Sialadenite linfocítica focal em glândula salivar menor	
[5] Envolvimento de glândula salivar	Fluxo salivar não-estimulado (\leq 1,5mL em 15 minutos)	
	Sialografia de parótida com sialectasias sem evidência de obstrução	
	Cintilografia de glândula salivar com déficit de função	
[6] Auto-anticorpos	Anti-Ro e/ou Anti-La	
	<input type="checkbox"/> Síndrome de Sjögren primária	4 dos 6 itens, sendo positivo o item 4 ou 6
	<input type="checkbox"/> Síndrome de Sjögren secundária	3 dos 4 critérios objetivos (3,4,5,6)
		Qual doença?
<input type="checkbox"/> Critérios de exclusão	História de radioterapia em cabeça e pescoço, HCV, Linfoma	

	preexistente, SIDA, sarcoidose, Doença enxerto versus hospedeiro, uso de anticolinérgicos
--	---

Crítérios diagnósticos para Miopatias Inflamatórias Idiopáticas – Bohan e Peter			
[1]	Fraqueza muscular proximal e simétrica		
[2]	Evidência de miosite ao exame histopatológico		
[3]	Elevação de enzimas musculares		
[4]	ENMG com padrão miopático		
[5]	Lesões cutâneas típicas da dermatomiosite		
	[] Polimiosite	[] Definitiva	Todos de 1-4
		[] Provável	3 de 1-4
		[] Possível	2 de 1-4
	[] Dermatomiosite	[] Definitiva	5 + 3 de 1-4
		[] Provável	5 + 2 de 1-4
		[] Possível	5 + 1 de 1-4

Crítérios para Classificação da Fibromialgia – ACR	
[1]	Dor difusa pelo corpo, definida como dor acima, abaixo ou em ambos os lados da cintura, com pelo menos 3 meses de duração e comprometimento de pelo menos um segmento da coluna
[2]	11 dos 18 Tender points positivos

Crítérios para osteoartrite de mãos, joelhos e quadris – ACR		
[] Mãos – Clínico		
[1]	Dor ou rigidez nas mãos pela maioria dos dias do mês	1,2,3,4 ou 1,2,3,5
[2]	Alargamento rígido de 2 ou + articulações das mãos, dentre 10 (2/3 IFP e IFD; 1 carpoMTC)	
[3]	Edema de até 2 MTC	
[4]	Alargamento duro de de 2 ou + IFD	
[5]	Deformidade de 1 ou + articulações, dentre 10	
[] Quadril – Clínico e Radiológico		
[1]	Dor no quadril pela maioria dos dias do mês	1,2,3 ou 1,2,4 ou 1,3,4
[2]	VHS \leq 20mm/h	
[3]	RX com osteófitos femorais e/ou acetabulares	
[4]	RX com redução do espaço articular	
[] Joelhos – Clínico		
[1]	Dor no joelho pela maioria dos dias do mês	1,2,3,4 ou 1,2,5 ou 1,4,5
[2]	Crepitação à movimentação	
[3]	Rigidez Matinal \leq 30 minutos	
[4]	Idade \geq 38 anos	
[5]	Alargamento ósseo ao exame	
[] Joelhos – Clínico e Radiológico		
[1]	Dor no joelho pela maioria dos dias do mês	1,2 ou 1,3,5,6 ou 1,4,5,6
[2]	Osteófitos	
[3]	Líquido sinovial típico	
[4]	Idade \geq 40 anos	
[5]	Rigidez Matinal \leq 30 minutos	
[6]	Crepitação à movimentação	

ANEXO B – ESCALA DE AVALIAÇÃO DA ESPASTICIDADE

Nome: _____
 Sexo: ___ Idade _____ anos RG-NMT _____ Data: ___/___/___ G- _____

ESCALA DE ASHWORTH MODIFICADA		
0	Nenhum aumento do tônus muscular	
1	Leve aumento do tônus muscular, manifestando-se como um resistir e ceder ou por mínima resistência no final da amplitude de movimento quando a parte afetada é movida em flexão ou extensão.	
1+	Leve aumento do tônus muscular, manifestando-se como uma resistência, que persiste de maneira discreta através do movimento passivo remanescente (menos da metade deste).	
2	Aumento do tônus durante a maior parte do movimento, mas o segmento é facilmente mobilizado passivamente.	
3	Aumento considerável do tônus, com dificuldade na movimentação passiva.	
4	O segmento afetado está rígido em flexão ou extensão.	
1 - QUADRIL	Direito	Esquerdo
Flexão		
Extensão		
Adução		
Abdução		
Rotação Externa		
Rotação Interna		
2 - JOELHO	Direito	Esquerdo
Flexão		
Extensão		
3 - TORNOZELO	Direito	Esquerdo
Flexão plantar		
Dorso flexão		

ANEXO C – PARECER DE ÉTICA DE PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLO DE MEDICINA TROPICAL
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

PARECER DE ÉTICA DE PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

1. **Protocolo:** N°038/2010-CEP/NMT
2. **Projeto de Pesquisa:** CORRELAÇÃO ENTRE A AVALIAÇÃO CLÍNICA, PADRÃO DE RESPOSTA PERIFÉRICA E A FUNÇÃO TÍMICA DE PACIENTES ACOMETIDOS POR PARAPARESIA ESPÁSTICA TROPICAL/MIELOPATIA ASSOCIADA AO HTLV.
3. **Pesquisador Responsável:** George Alberto da Silva Dias.
4. **Instituição / Unidade:** NMT/UFPA.
5. **Data de Entrada:** 11/06/2010.
6. **Data do Parecer:** 30/06/2010.

PARECER

O Comitê de Ética em Pesquisa do NMT/UFPA apreciou o protocolo em tela e, verificou que foram atendidas todas as exigências da Resolução 196/96-CNS/MS. Portanto, manifesta-se pela sua aprovação.

Parecer: **APROVADO.**

Belém, 09 de agosto de 2010.


Profº Teiji Oikawa
Coordenador do CEP-NMT/UFPA.