



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

GEORGE ALBERTO DA SILVA DIAS

**PADRÃO DE RESPOSTA IMUNOLÓGICA PERIFÉRICA EM PACIENTES
INFECTADOS PELO HTLV-1 E SUA CORRELAÇÃO COM AS MANIFESTAÇÕES
NEUROLÓGICAS FUNCIONAIS NOS INDIVÍDUOS COM PET/MAH.**

**Belém – Pará
2014**

GEORGE ALBERTO DA SILVA DIAS

**PADRÃO DE RESPOSTA IMUNOLÓGICA PERIFÉRICA EM PACIENTES
INFECTADOS PELO HTLV-1 E SUA CORRELAÇÃO COM AS MANIFESTAÇÕES
NEUROLÓGICAS FUNCIONAIS NOS INDIVÍDUOS COM PET/MAH.**

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

Orientadora: Prof^a. Dra. Hellen Thais Fuzii

**Belém – Pará
2014**



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

GEORGE ALBERTO DA SILVA DIAS

**PADRÃO DE RESPOSTA IMUNOLÓGICA PERIFÉRICA EM PACIENTES
INFECTADOS PELO HTLV-1 E SUA CORRELAÇÃO COM AS MANIFESTAÇÕES
NEUROLÓGICAS FUNCIONAIS NOS INDIVÍDUOS COM PET/MAH.**

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

Aprovado em: ___/___/___

Conceito: _____

Banca Examinadora

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

Prof. Dr. Ricardo Ishak
Membro - ICB/UFPA

Prof. Dr. Givago da Silva Souza
Membro - ICB/UFPA

Prof^a. Dra. Denise da Silva Pinto
Membro - ICS/UFPA

Prof^a. Dra. Maísa Silva de Sousa
Membro - NMT/UFPA

Prof^a. Dra. Fabíola Elizabeth Villanova
Suplente - NMT/UFPA

Dedico esta tese a minha família por todo o carinho, orgulho e admiração que sentem por mim. Sem vocês nada disso seria possível.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Prof^a. Dra. Hellen Thais Fuzii

A minha orientadora por sempre acreditar em mim e acima de tudo pela paciência, pois lidar com meu temperamento não é fácil, mas apesar de tudo esteve ao meu lado em todos os momentos. Soube entender e encaminhar com inteligência e humanismo, como também propor procedimentos de superação nas diversas barreiras que se apresentaram nesse percurso. Tivemos vários momentos de altos e baixos, mas foi na adversidade que conseguimos seguir em frente. Se hoje estou tendo a oportunidade de concluir este doutoramento, foi porque ela soube persistir neste “rebelde” Fisioterapeuta. Obrigado por tudo! E desculpe pelos erros que cometi durante estes anos. Tenha certeza de que os erros cometidos foram na tentativa de acertar, e, sem você, certamente eu não teria o êxito de concluir mais esta etapa. Foi e será sempre fundamental pra minha formação profissional e pessoal.

Prof. Dr. Juarez Antônio Simões Quaresma

Ao Dr. Juarez, educador, incentivador e grande profissional, não só por seus conhecimentos, mas especialmente pela atenção dispensada e diálogos interessantes. Obrigado pela oportunidade de poder desenvolver este trabalho no laboratório.

AGRADECIMENTOS

Ao longo dos anos de trabalho que resultaram nesta tese, pessoas e instituições me ajudaram, ensinando e apoiando. Agora que alcanço meus objetivos não poderia deixar de reconhecê-las. Esta, talvez, seja a parte mais difícil da tese de se escrever, porque a vida não se coloca em análise de regressão e não é pelo valor de “p” que descobrimos a significância das pessoas na nossa trajetória.

Primeiro de tudo agradeço a DEUS por estar sempre no comando de minha vida.

À Universidade Federal do Pará (UFPA) que me proporcionou todo este conhecimento e engrandecimento profissional. Sou grato a esta instituição que respeito e admiro por toda sua história e importância para a formação de profissionais no Estado do Pará.

Ao Núcleo de Medicina Tropical (NMT) que foi a porta de entrada para realizar meu sonho da pós-graduação.

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. Muitos destes professores eu tive o privilégio de poder ter um relacionamento mais próximo, como é o caso da Prof^ª. Dra. Conceição Pinheiro, Prof^ª. Dra. Luisa Caricio, Prof. Dr. Givago Souza, Prof^ª. Dra. Máisa Sousa e Prof^ª. Dra. Rita Medeiros, e pude perceber que são pessoas muito especiais. Não posso esquecer de mencionar um ser humano muito querido e importante para o NMT que é o Prof. Dr. Manuel Ayres, um exemplo de pessoa e profissional a ser seguido.

A equipe do Laboratório de Clínica e Epidemiologia de Doenças Endêmicas do NMT, conhecido como o Ambulatório do NMT. Em especial a Prof^ª. Dra. Rita Medeiros que viabilizou a minha entrada e participação neste ambulatório, confiando e acreditando na proposta a ser realizada com os pacientes do HTLV. Sou muito grato a ela, pois desde o princípio tivemos uma relação muito boa, me proporcionando total apoio clínico com os pacientes. E toda a sua equipe inicial composta pelo Prof. Dr. Cezar Caldas e também pela médica Letícia Figueiredo. A Letícia foi fundamental, me proporcionando grande viabilidade para o desenvolvimento do projeto e também pelo companheirismo e amizade que formamos. Não podendo esquecer os acadêmicos de medicina, com os quais fiz grandes amizades. Foram muitos acadêmicos, mas posso citar o Eder Begot para representar todos eles que de alguma forma me ajudaram a chegar nesta tese. O Eder foi primordial na coleta das amostras

biológicas, no momento em que não tínhamos uma pessoa as sextas-feiras para coletar e ele se dispunha a me ajudar sempre que precisava.

Os anos se passaram e a equipe do Ambulatório foi mudando. Tive o prazer de conhecer três pessoas, que admiro muito, e que se tornaram meus parceiros de projeto e amigos. Os médicos e professores Gilberto Yoshikawa, Roberta Koyama e Satomi Fujihara, são três grandes profissionais que aprendi muito durante as consultas médicas e que tem um profundo respeito pela Fisioterapia. Esses médicos são de uma capacidade profissional e intelectual impressionante. Eu agradeço muito a cada um de vocês pela confiança e ensinamentos a mim dedicados. Estar ao lado de vocês foi extremamente engrandecedor, prazeroso e divertido. Outra figura muito importante entre nós foi a Letícia Martins, acadêmica de Psicologia, que esteve conosco neste período também. Sua visão humanista e diferenciada nos fez enxergar de forma diferente nossos pacientes. A Letícia Martins foi minha parceira durante todos esses anos.

As minhas grandes e estimadas amigas que estão comigo desde o início dessa jornada. A Prof^ª. Dra. Denise Pinto que conheci quando ainda estava iniciando meu mestrado e que com o passar dos anos formamos uma bela amizade. Amizade esta que considero muito e tenho grande orgulho deste sentimento. Ela, como sempre, foi essencial nos momentos mais intensos do doutorado. Foi uma das pessoas que sempre acreditou no meu potencial como docente e também no meu trabalho. Ajudou-me de todas as formas para que pudesse chegar a conclusão desta tese. Tornamos-nos parceiros de outros projetos, e, mais recente, parceiro para uma vida toda, pois tive a honra de poder batizar seu filho (André) que foi mais um presente que ela me deu. A Prof^ª. Dra. Marizeli Araújo... O que posso falar desta pessoa?! Um ser humano sem igual! Posso dizer que foi meu porto seguro durante meus momentos de dúvida, de estresse, de raiva, de angústia, mas também nos momentos felizes e divertidos. Estava sempre disposta a me ajudar da melhor forma possível, foi a pedra fundamental para realizar as interlocuções nas tomadas de decisão mais delicadas. O seu jeito meigo e apaziguador foram fundamentais para lidar com meu temperamento. Obrigado por tornar meus dias mais felizes e mais calmos, quando eles pareciam se tornar um tsunami. Obrigado por ser minha confidente e conselheira! A Prof^ª. Dra. Tinara Aarão, que mesmo de longe estava na torcida pelo meu sucesso profissional. Obrigado pelo apoio de sempre.

A equipe do laboratório de Imunopatologia, na figura da Prof^ª. Dra. Fabíola Villanova e Prof^ª. Dra. Esther Von Ledebur, pelos ensinamentos a mim dedicados. Também a Bióloga Mara Chagas, que foi essencial no momento que mais precisei. Ajudando-me na coleta das amostras até o processo de separação das células. Muito obrigado pela sua preciosa ajuda e

pelos momentos de conversa, diversão e conhecimento. Muito obrigado pelos momentos de compartilhamento das experiências de vida e pela palavra de Deus que sempre nos confortava. Ao Farmacêutico Jorge Rodrigues que está presente neste laboratório desde quando era aluno de iniciação científica e presenciou a caminhada neste doutorado e que com sua simplicidade e com suas palavras me fizeram várias vezes refletir sobre a vida. A Enfermeira Jéssica Gomes que esteve sempre disposta a me ajudar no que precisasse e foi à pessoa a quem confiava na coleta das amostras. Obrigado por ser esta pessoa tão solícita e amiga. E, ao acadêmico de medicina da UEPA, Henrique Miranda que também fez parte deste processo.

Também não posso deixar de agradecer, mais uma vez, aos médicos Gilberto Yoshikawa, Roberta Koyama e Satomi Fujihara, que estiveram comigo também na fase experimental do projeto. Na verdade formamos uma grande equipe, carinhosamente chamada de a “equipe do HTLV”. Foi impressionante a dedicação e empenho destes profissionais com o projeto. Todos nós estávamos empenhados com o doutorado. Estávamos com vontade de fazer ciência com qualidade. Acho que isso foi o grande sucesso deste grupo. Obrigado por dividirem comigo os longos momentos de espera dos procedimentos laboratoriais, pois todos nós trabalhamos juntos neste projeto. Da clínica a bancada!

Ao laboratório de Análises Clínicas do Núcleo de Medicina Tropical, em especial a Prof^a. Dra. Luisa Caricio, pela permissão em usar seu laboratório para a coleta dos materiais biológicos; Ao Andrei, Kemper, Adenilson, Marcela, Amanda, Dona Fátima e Dona Socorro e também os alunos de iniciação científica que participaram deste processo e que sempre ao chegar neste laboratório fui recebido com belos sorrisos, a todos vocês muito obrigado por terem me ajudado na coleta das amostras dos pacientes.

Ao laboratório de Biologia Celular e Molecular, da Prof^a. Dra. Maísa Sousa e Prof^a. Dra. Edna Ishikawa, por nos darem o suporte dos exames laboratoriais de confirmação da infecção pelo HTLV de nossos pacientes, e, também, não esquecendo da Louise que esteve sempre disposta a nos esclarecer qualquer informação relacionada ao diagnóstico laboratorial dos pacientes.

A Faculdade de Fisioterapia e Terapia Ocupacional (FFTO) da Universidade Federal do Pará. Esta, sem dúvida, foi meu pilar nos momentos delicados que passei no doutorado. Estar na FFTO era mais do que um trabalho, foi minha terapia diária. Estar naquele ambiente e rodeado dos meus alunos me fazia esquecer tudo! Conheci pessoas incríveis que me deram o suporte para poder enfrentar as intempéries do doutorado. Devo muito aos meus amigos Prof^a. Mariane Sarmiento, Prof. Victor Cavaleiro, Prof. Marcelo Cardoso, Prof^a. Denise Pinto, Prof.

Carlomagno Bahia, Prof^a. Bianca Callegari, Prof^a. Cibele Câmara, Prof^a. Carla Serrão, Prof^a. Keila Madureira, Prof^a. Suellen Moraes, Prof^a. Michele Castro, Prof. Evanildo Lopes, Prof. Otávio Folha, Prof^a. Adriene Seabra, Prof^a. Adrine dos Santos, Prof^a. Cibele Braga, Prof^a. Camila Bergamim, Prof^a. Ivete Ribeiro e todos os outros professores, que estiveram ao meu lado me dando incentivo, confortando, viabilizando meus horários para poder estar no laboratório, aguentando meus momentos de estresse, enfim... Obrigado por acreditarem em mim, acreditarem no meu trabalho. Não posso esquecer à senhora Ana Matos, senhora Maria Helena, Débora Ribeiro e Carla, que estiveram presentes comigo e torcendo para que tudo desse certo no final. E a razão pela qual eu sonhei com este título, que são os meus alunos da FFTO. Muito obrigado pelo carinho, pela torcida e pela preocupação com o doutorado. Sentia-me orgulhoso toda vez que os alunos mandavam mensagens pelo celular, facebook ou quando encontravam comigo e perguntavam como estava o doutorado e diziam que estavam torcendo por mim. Isso não tem preço!

Um agradecimento especial ao amigo Prof. Helder Pinheiro. Disse-me palavras que nunca mais esquecerei quando passei por um momento muito delicado. Com seu jeito calmo e com palavras certas tranquilizou-me e fez enxergar que precisava persistir naquilo que almejava, e, como sempre, neste mesmo momento minhas grandes amigas (Marizeli, Tinara e Denise) estavam presentes. E foi com esta energia positiva que comecei a perceber a situação de outra forma. Agradeço também a sua valiosa ajuda na estatística do trabalho.

Obrigado ao Prof. Dr. Anderson Raiol, que se mostrou sempre disposto a me ajudar na análise estatística quando minha orientadora alçava pensamentos que eram um pouco demais para o meu humilde conhecimento (risos!).

A chave fundamental desta tese, que foram os pacientes que participaram deste estudo. Obrigado por confiarem no projeto, pois sem vocês nada disso seria possível.

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

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.”

Chico Xavier

RESUMO

O vírus linfotrófico de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1) está associado principalmente a leucemia/linfoma de células T do adulto (LLcTA) e a paraparesia espástica tropical/mielopatia associado ao HTLV-1 (PET/MAH). A PET/MAH é uma doença inflamatória do sistema nervoso central (SNC), porém o mecanismo pelo qual o HTLV-1 induz a PET/MAH ainda não está totalmente esclarecido. Acredita-se que a interação vírus-hospedeiro pode levar ao desequilíbrio na resposta imunológica, com produção aumentada de citocinas inflamatórias, podendo estar relacionada ao desenvolvimento da PET/MAH. Assim, este trabalho visa analisar a resposta imunológica periférica dos pacientes portadores do HTLV-1 e correlacioná-la com as manifestações neurológicas funcionais dos pacientes com PET/MAH. Foram incluídos 69 pacientes neste estudo, sendo 43 portadores do HTLV-1 sem PET/MAH e 26 portadores do HTLV-1 com PET/MAH. Nos pacientes com PET/MAH as manifestações neurológicas funcionais avaliadas foram: força muscular, tônus muscular, equilíbrio e grau de auxílio da marcha. Cinco (05) mL de sangue foram coletados em tubo com EDTA de cada paciente e as células linfomononucleares foram separadas utilizando Ficoll-Paque. O RNA total foi extraído de 10^6 células utilizando o reagente Trizol. Após quantificação do RNA, 1 μ g do mRNA foi submetido a transcrição reversa para obtenção do cDNA. A expressão gênica relativa das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-10 e TGF- β foram realizadas através da PCR em tempo real utilizando o *StepOnePlus* (*Applied Biosystem*) com o reagente *SybrGreen* (*Applied Biosystem*). Para o cálculo da expressão gênica foi realizada através da 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 com e sem PET/MAH apresentaram predomínio de expressão gênica do perfil Th1, principalmente de IFN- γ . Foi observado também que nos pacientes com PET/MAH houve expressão aumentada de TNF- α . O perfil Th2 (IL-4) apresentou-se diminuído, principalmente nos pacientes com PET/MAH. Quanto à resposta antiinflamatória, a expressão de IL-10 se mostrou prejudicada nos pacientes com PET/MAH e a expressão de TGF- β inicialmente se mostrou elevada em ambos os grupos. Após análises da razão entre TGF- β /IL-10 pode-se observar que a expressão de TGF- β se manteve quase que equiparada a expressão de IL-10, sugerindo a sua participação não como citocina antiinflamatória, mas como possível ação de reparação tecidual. O perfil inflamatório associou-se positivamente com o grau de auxílio na marcha e o equilíbrio, apresentando resultados significantes somente para a expressão de IFN- γ . Os pacientes infectados pelo 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. PET/MAH. Resposta imunológica periférica. Manifestações neurológicas funcionais.

ABSTRACT

Human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) is associated with adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) and HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). HAM/TSP is an inflammatory disease of the central nervous system (CNS); however, the mechanism by which HTLV-1 induces HAM/TSP is not yet clear. The virus–host interaction may provoke changes in the immunological response, such as the enhanced production of inflammatory cytokines, which are implicated in the pathogenesis of HAM/TSP. This work aimed to analyze the peripheral immune response of patients infected with HTLV-1 and correlate it with functional neurological manifestations in patients with HAM/TSP. In the current study, 69 HTLV-1 infected patients were studied. 26 of them developed HAM/TSP and 43 didn't develop HAM/TSP. In patients with HAM/TSP was evaluated the functional neurological manifestations like muscle strength, muscle tone, balance and walking aid. Five mL peripheral blood was collected into a tube with EDTA and lymphomononuclear cells were separated on a Ficoll-Paque™ Plus density gradient (GE Healthcare). Total RNA was extracted from 10^6 cells with Trizol reagent. After RNA quantification, 1 μ g of total RNA was submitted to reverse transcription for the generation of cDNA using the Superscript III kit (Invitrogen). IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-10 and TGF- β gene expression was measured quantitatively with the StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystem) using SYBR Green reagent (Applied Biosystem). 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 $Ct_{\text{gene}} - Ct_{\text{housekeeping gene}}$. The gene expression showed higher expression of Th1 cytokine in patients with and without HAM/TSP, principally IFN- γ . In HAM/TSP patients also showed higher TNF- α expression. The gene expression showed lower expression of Th2 cytokine in patients with HAM/TSP. As regards the anti-inflammatory response, gene expression of IL-10 showed impaired in patients with HAM/TSP and expression of TGF- β initially showed higher in both groups. After ratio analysis between TGF- β and IL-10 it was observed that the expression of TGF- β was equivalent to the expression of IL-10, suggesting its involvement as a non-inflammatory cytokine, but as possible repair action tissue. The inflammatory profile was positively associated with the walking aid and balance, showing significant results only for the expression of IFN- γ . The patients infected with HTLV-1 who developed HAM/TSP showed increased Th1 response compared to patients who did not develop HAM/TSP, and this increased expression of IFN- γ is related to the development and progression of the disease.

Key-words: HTLV-1. HAM/TSP. Peripheral immune response. Functional neurological manifestations.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição geográfica da infecção pelo HTLV-1.	26
Figura 2 – Distribuição geográfica da infecção pelo HTLV-1 no Brasil e os quatro Estados (Maranhão, Bahia, Pará e Pernambuco), destacados com o quadro em vermelho, de maior prevalência da infecção.	27
Figura 3 – Estrutura morfológica esquemática do HTLV-1.....	28
Figura 4 - Organização genômica esquemática do HTLV-1. Genoma integrado.	29
Figura 5 - Localização intracelular da proteína Tax e complexos Gag p19 em conjugados de células T infectadas pelo HTLV-1. Cada painel mostra a superposição de coloração com anti- β -tubulina mAb (vermelho) e anti-Gag p19 mAb ou anti-Tax mAb (verde). (A) Mostra a não polarização da proteína Gag em células T. (B e C) mostra a polarização da proteína Gag. (D) Polarização da proteína Tax. (D) A proteína Tax polarizada é vista como um crescente verde ao longo da junção célula-célula.	30
Figura 6 – Principais hipóteses sobre a patogênese da PET/MAH: (1) citotoxicidade direta; (2) Autoimunidade; e (3) o mecanismo de dano circundante ou “bystander”.....	35
Figura 7 – Distribuição da inflamação e infecção causada pelo HTLV-1 no SNC. Medula espinal torácica de um paciente com PET/MAH, com 2,5 anos de doença.	36
Figura 8 – (A) Medula espinal torácica de um paciente com PET/MAH, com 2,5 anos de doença. (B) Distribuição da inflamação e infecção causada pelo HTLV-1 no SNC.	36
Figura 9 - Representação esquemática do complexo neurológico do HTLV-1: o modelo do iceberg	38
Figura 10 – Evolução clínica da PET/MAH.	40
Figura 11 – Imagem de ressonância magnética (RM) mostrando atrofia da medula torácica em paciente com PET/MAH, como mostra pela seta branca.	41
Figura 12 - Corrida eletroforética em gel de agarose com formaldeído para RNA, evidenciando as bandas de RNAs ribossômicos 28S e 18S.	50
Gráfico 13 – (A) Comparação da força muscular, entre os membros inferiores, para as regiões proximais e distais de acordo com a escala do <i>Medical Research Council</i> , $p=0,74$ e $p=0,78$ respectivamente. Teste de Mann-Whitney, $p \leq 0,05$. (B) Distribuição da fraqueza muscular.	57
Gráfico 14 – (A) Comparação da espasticidade, entre os membros inferiores, para os músculos adutores de quadril, quadríceps femoral e flexores plantares ($p=0,85$, $p=0,92$ e $p=0,96$). Teste de Mann-Whitney, $p \leq 0,05$. (B) Distribuição da espasticidade.	59
Gráfico 15 - Comparação do equilíbrio e mobilidade nos pacientes HTLV-1 com PET/MAH para o risco de queda, $p=0,02^*$. Teste G (Aderência), $p \leq 0,05$	60

Gráfico 16 – Grau de auxílio na marcha dos pacientes com PET/MAH, $p=0,07$. Teste G (Aderência), $p \leq 0,05$	61
Gráfico 17 – Distribuição do grau de risco de queda em indivíduos PET/MAH que deambulavam sem auxílio, $p = 0,80$. Teste G (Aderência), $p \leq 0,05$	62
Gráfico 18 – Correlação da expressão dos genes constitutivos dos pacientes infectados pelo HTLV-1, de acordo com o CT em escala linear, $r = 0,92$, $p < 0,0001$. Correlação de Spearman, $p \leq 0,05$	63
Gráfico 19 – 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 Log2. (A) Correlação do gene de IFN- γ , $r = 0,80$, $p = < 0,0001^*$. (B) Correlação do gene de TNF- α , $r = 0,94$, $p < 0,0001^*$. (C) Correlação do gene de IL-4, $r = 0,93$, $p < 0,0001^*$. (D) Correlação do gene de IL-10, $r = 0,85$, $p < 0,0001^*$. (E) Correlação do gene de TGF- β , $r = 0,95$, $p < 0,0001^*$. Correlação de Spearman, $p \leq 0,05$	64
Gráfico 20 – Perfil da expressão relativa dos genes das citocinas estudadas. (A) Pacientes HTLV-1 com PETMAH e (B) Pacientes HTLV-1 sem PET/MAH em escala de Log10.....	65
Gráfico 21 – Diferença de expressão gênica relativa das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-10 e TGF- β nos pacientes HTLV-1 com e sem PET/MAH em escala de Log10. (A) Diferença de expressão gênica de IFN- γ ($p = 0,790$). (B) Diferença de expressão gênica de TNF- α ($p = 0,733$). (C) Diferença de expressão gênica de IL-4 ($p = 0,171$). (D) Diferença de expressão gênica de IL-10 ($p = 0,771$). (E) Diferença de expressão gênica de TGF- β ($p = 0,410$). Teste de Mann-Whitney, $p \leq 0,05$	68
Gráfico 22 – Diferença na expressão gênica relativa entre as razões das citocinas nos indivíduos HTLV-1 com e sem PET/MAH em escala de Log10. (A) Razão de IFN- γ /TNF- α ($p = 0,660$). (B) Razão de IFN- γ /IL-4 ($p = 0,222$). (C) Razão de IL-4/IL-10 ($p = 0,733$). (D) Razão de IFN- γ /TGF- β ($p = 0,431$). Teste de Mann-Whitney, $p \leq 0,05$	71
Gráfico 23 – Diferença na expressão gênica relativa entre as razões das citocinas nos indivíduos HTLV-1 com e sem PET/MAH em escala de Log10. (A) Razão de TNF- α /IL-4 ($p = 0,055$). (B) Razão de TNF- α /IL-10 ($p = 0,324$). (C) Razão de TNF- α /TGF- β ($p = 0,396$). Teste de Mann-Whitney, $p \leq 0,05$	72
Gráfico 24 – Diferença na expressão gênica relativa entre as razões das citocinas nos indivíduos HTLV-1 com e sem PET/MAH em escala de Log10. (A) Razão de IL-4/IL-10 ($p = 0,461$). (B) Razão de IL-4/ TGF- β ($p = 0,995$). (C) Razão de IL-10/TGF- β ($p = 0,446$). Teste de Mann-Whitney, $p \leq 0,05$	73

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Distribuição demográfica dos pacientes infectados pelo HTLV-1 avaliados no Laboratório de Clínica e Epidemiologia de Doenças Endêmicas do NMT da UFPA no período de Agosto de 2010 a Agosto de 2014, Belém - Pará. 55
- Tabela 2** – Distribuição do grau de força muscular segundo a escala do *Medical Research Council* nos pacientes com PET/MAH avaliados no Laboratório de Clínica e Epidemiologia de Doenças Endêmicas do NMT da UFPA no período de Agosto de 2010 a Agosto de 2014, Belém - Pará. 56
- Tabela 3** – Distribuição do grau de espasticidade segundo a escala de Ashworth Modificada nos pacientes com PET/MAH avaliados no Laboratório de Clínica e Epidemiologia de Doenças Endêmicas do NMT da UFPA no período de Agosto de 2010 a Agosto de 2014, Belém - Pará. 58
- Tabela 4** – Distribuição do risco de quedas segundo a escala de Equilíbrio e Mobilidade de Tinetti nos pacientes com PET/MAH avaliados no Laboratório de Clínica e Epidemiologia de Doenças Endêmicas do NMT da UFPA no período de Agosto de 2010 a Agosto de 2014, Belém - Pará. 60
- Tabela 5** – Distribuição do grau de auxílio na marcha nos pacientes HTLV-1 com PET/MAH avaliados no Laboratório de Clínica e Epidemiologia de Doenças Endêmicas do NMT da UFPA no período de Agosto de 2010 a Agosto de 2014, Belém - Pará..... 61
- Tabela 6** – Correlação entre $2^{-\Delta CT}$ dos genes constitutivos, GAPDH e β -actina, e a expressão gênica das citocinas nos pacientes infectados pelo HTLV-1, analisados no Laboratório de Imunopatologia do NMT da UFPA no período de Agosto de 2010 a Agosto de 2014, Belém - Pará. 63
- Tabela 7** – Análise comparativa da expressão gênica relativa das citocinas estudadas nos pacientes HTLV-1 com PET/MAH e HTLV-1 sem PET/MAH, analisados no Laboratório de Imunopatologia do NMT da UFPA no período de Agosto de 2010 a Agosto de 2014, Belém - Pará. 67
- Tabela 8** – Correlação da expressão relativa dos genes estudados nos grupos de pacientes HTLV-1 com PET/MAH e HTLV-1 sem PET/MAH, analisados no Laboratório de Imunopatologia do NMT da UFPA no período de Agosto de 2010 a Agosto de 2014, Belém - Pará. 70
- Tabela 9** - Regressão linear múltipla das citocinas estudadas relacionadas com a escala do *Medical Research Council*, nos pacientes HTLV-1 com PET/MAH (n=23), analisados no Laboratório de Imunopatologia do NMT da UFPA no período de Agosto de 2010 a Agosto de 2014, Belém - Pará. 74
- Tabela 10** - Regressão linear múltipla dos perfis citocínicos relacionado com a escala do *Medical Research Council*, nos pacientes HTLV-1 com PET/MAH (n=23), analisados no Laboratório de Imunopatologia do NMT da UFPA no período de Agosto de 2010 a Agosto de 2014, Belém - Pará. 74

Tabela 11 - Regressão linear múltipla das citocinas estudadas relacionadas com a escala de Ashworth Modificada, nos pacientes HTLV-1 com PET/MAH (n=26), analisados no Laboratório de Imunopatologia do NMT da UFPA no período de Agosto de 2010 a Agosto de 2014, Belém - Pará.	75
Tabela 12 - Regressão linear múltipla dos perfis citocínicos relacionado com a escala de Ashworth Modificada, nos pacientes HTLV-1 com PET/MAH (n=26), analisados no Laboratório de Imunopatologia do NMT da UFPA no período de Agosto de 2010 a Agosto de 2014, Belém - Pará.	75
Tabela 13 - Regressão linear múltipla das citocinas estudadas relacionadas com a escala de Equilíbrio e Mobilidade de Tinetti, nos pacientes HTLV-1 com PET/MAH (n=25), analisados no Laboratório de Imunopatologia do NMT da UFPA no período de Agosto de 2010 a Agosto de 2014, Belém - Pará.....	76
Tabela 14 - Regressão linear múltipla dos perfis citocínicos relacionado com a escala de Equilíbrio e Mobilidade de Tinetti, nos pacientes HTLV-1 com PET/MAH (n=25), analisados no Laboratório de Imunopatologia do NMT da UFPA no período de Agosto de 2010 a Agosto de 2014, Belém - Pará.....	77
Tabela 15 - Regressão linear múltipla das citocinas estudadas relacionadas com o grau de auxílio na marcha, nos pacientes HTLV-1 com PET/MAH (n=26), analisados no Laboratório de Imunopatologia do NMT da UFPA no período de Agosto de 2010 a Agosto de 2014, Belém - Pará.	77
Tabela 16 - Regressão linear múltipla dos perfis citocínicos relacionado com o grau de auxílio na marcha, nos pacientes HTLV-1 com PET/MAH (n=26), analisados no Laboratório de Imunopatologia do NMT da UFPA no período de Agosto de 2010 a Agosto de 2014, Belém - Pará.	78

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 etilendiamino 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	22
2 REFERENCIAL TEÓRICO	24
2.1 HTLV-1	24
2.2 EPIDEMIOLOGIA.....	25
2.3 ESTRUTURA E GENOMA DO HTLV-1	28
2.4 REPLICAÇÃO DO HTLV-1	29
2.5 RESPOSTA IMUNOLÓGICA CONTRA O VÍRUS	30
2.6 ALTERAÇÕES IMUNOLÓGICAS DA PET/MAH.....	32
2.7 FISIOPATOLOGIA DA PET/MAH.....	35
2.8 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA PET/MAH	37
2.9 DIAGNÓSTICO DA PET/MAH	41
3 OBJETIVOS	44
3.1 GERAL.....	44
3.2 ESPECÍFICOS	44
4 MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO	45
4.2 SELEÇÃO DOS CASOS	45
4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	45
4.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	45
4.5 AVALIAÇÃO FUNCIONAL	46
4.6.1 Força muscular	47
4.6.2 Tônus muscular	47
4.6.3 Escala de Equilíbrio e Mobilidade de Tinetti.....	48
4.6.4 Grau de auxílio na marcha	48

4.7 QUANTIFICAÇÕES DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA PERIFÉRICA	48
4.7.1 Coleta de sangue, separação e contagem das células linfomononucleares	49
4.7.2 Isolamento e quantificação do RNA	49
4.7.3 Síntese de cDNA.....	51
4.7.4 Quantificação da expressão gênica das citocinas para os perfis de resposta imunológica periférica do tipo Th1, Th2 e Treg.....	51
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
4.9 FLUXOGRAMA DOS PROCEDIMENTOS REALIZADOS	53
4.10 ASPECTOS ÉTICOS	54
5 RESULTADOS.....	55
5.1 DESCRIÇÃO DOS PACIENTES	55
5.2 MANIFESTAÇÃO CLÍNICA DOS PACIENTES COM PET/MAH	56
5.3 VALIDAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DA EXPRESSÃO GÊNICA DAS CITOCINAS IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-10 E TGF- β	62
5.4 PERFIL CITOCÍNICO DOS PACIENTES INFECTADOS PELO HTLV-1 COM E SEM PET/MAH	65
5.5 ANÁLISE COMPARATIVA DO PERFIL CITOCÍNICO ENTRE OS PACIENTES HTLV-1 COM PET/MAH E SEM PET/MAH	67
5.6 CORRELAÇÃO DA EXPRESSÃO CITOCÍNICA NOS PACIENTES HTLV-1 COM E SEM PET/MAH	69
5.7 RAZÃO ENTRE OS PERFIS DE RESPOSTA IMUNOLÓGICA	70
5.8 CORRELAÇÃO DOS PERFIS DE RESPOSTA IMUNOLÓGICA PERIFÉRICA E OS SINAIS CLÍNICOS DOS PACIENTES COM PET/MAH.....	73
6 DISCUSSÃO	79
7 CONCLUSÕES.....	91

REFERÊNCIAS	93
APÊNDICE	101
APÊNDICE A - FICHA DE AVALIAÇÃO FISIOTERAPÊUTICA DOS PACIENTES COM PET/MAH.....	102
APÊNDICE B – ESCALA DO GRAU DE AUXÍLIO NA MARCHA	105
APÊNDICE C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	106
ANEXOS	107
ANEXO A – ESCALA MANUAL DE FORÇA MUSCULAR.....	108
ANEXO B – ESCALA DE ASHWORTH MODIFICADA	109
ANEXO C – ESCALA DE EQUILÍBRIO E MOBILIDADE DE TINETTI.....	110
ANEXO D – PARECER DE ÉTICA DE PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS.....	112

1 INTRODUÇÃO

O vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 1 (*Human T-cell leukemia virus type 1 – HTLV-1*) é um retrovírus que infecta cerca de 20 milhões de pessoas em todo o mundo. O HTLV-1 está associado com infecções crônicas e persistentes das células T que podem causar doenças neoplásicas e inflamatórias. É o principal agente etiológico da Leucemia/Linfoma de células T do Adulto (LLcTA) e da paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1 (PET/MAH). Estas condições ocorrem em somente 2 a 5% dos indivíduos infectados, enquanto que a grande maioria dos indivíduos infectados não desenvolve doença, e, por isto, são considerados portadores assintomáticos do vírus. Porém, o HTLV-1 tem sido também associado a várias outras doenças inflamatórias (BRASIL, 2013; ROMANELLI; CARAMELLI; PROIETTI, 2010; SANTOS; MUNIZ; CARVALHO, 2009).

A PET/MAH é considerada uma das alterações mais comuns nos indivíduos infectados pelo HTLV-1, na qual o portador apresenta alterações neurológicas importantes, acometendo principalmente as funções motoras, sensoriais e autonômicas. É uma doença inflamatória onde as células T CD4⁺ infectadas pelo HTLV-1 e as células T CD8⁺ HTLV-específicas possuem um papel significativo na patogênese. Uma das mais importantes observações imunológicas na infecção pelo HTLV-1 é a proliferação celular espontânea *in vitro*, sem estímulo. Foi demonstrada a presença de infiltrado de células T CD4⁺ e CD8⁺ no sistema nervoso central (SNC), tendo destaque as células CD4⁺ por produzirem citocinas neurotóxicas. Estas citocinas são consideradas importantes mediadores da lesão tecidual na PET/MAH (MATSUURA; YAMANO; JACOBSON, 2010; ROMANELLI; CARAMELLI; PROIETTI, 2010; SAITO, 2010; SANTOS; MUNIZ; CARVALHO, 2009).

Estudos mostram que estes indivíduos possuem resposta imunológica específica característica para o fenótipo do tipo Th1, apresentando elevada produção de citocinas como IFN- γ , que estão hiperexpressas nos linfócitos de sangue periférico. Isso pode levar a maior circulação destas células entre o sangue periférico e o SNC, e, propiciando a inflamação e lesão tecidual local. Em contrapartida, o perfil de resposta para o fenótipo Th2 encontra-se diminuído, na qual os níveis de IL-4, que é a citocina característica deste último fenótipo, encontra-se em baixos níveis de expressão (AHUJA et al., 2007; TOULZA et al., 2008; YAMANO et al., 2009).

As células T reguladoras (Treg) apresentam papel diferenciado no controle do processo inflamatório causado pelo vírus. Nos indivíduos com PET/MAH, estas células são os principais reservatórios do vírus no sangue periférico. A infecção desta célula leva a

alterações na expressão do fator de transcrição para o fenótipo das células Treg, e, conseqüentemente, alteração na função supressora da resposta imunológica com diminuição na expressão de IL-10. Essa perda da função supressora é capaz de exacerbar o processo da doença, uma vez que a inflamação não é controlada e o processo inflamatório se mantém (BRITO-MELO et al., 2007; SANTOS; MUNIZ; CARVALHO, 2009; SATOU; MATSUOKA, 2010; TOULZA et al., 2008; YAMANO et al., 2009).

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 periférica correlacionando com as manifestações clínicas relacionados aos sinais neurológicos destes indivíduos, pode trazer novas interpretações sobre a fisiopatologia da PET/MAH.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 HTLV-1

O HTLV-1 pertence ao gênero *Deltaretrovirus* da família *Retroviridae* e da subfamília *Orthoretrovirinae* (COOPER; VAN DER LOEFF; TAYLOR, 2009; GESSAIN; MAHIEUX, 2012).

A descoberta dos primeiros retrovírus humanos ocorreu independentemente no Japão e nos Estados Unidos. Poiesz et al., em 1980, identificaram pela primeira vez o HTLV a partir de um paciente com linfoma cutâneo de células T. Yoshida et al., em 1982, identificaram o vírus da leucemia de células T do adulto (ATLV). Assim, HTLV e ATLTV foram descritos com apresentando a mesma sequência genética e foram nomeados posteriormente como HTLV tipo 1 (GONÇALVES et al., 2010; POIESZ et al., 1980; YOSHIDA et al., 1982).

Após a descoberta do HTLV-1, um segundo retrovírus humano foi descoberto. Kalyanaraman et al., em 1982, descreveram por ensaios imunológicos, a existência de um novo tipo de vírus que seria relacionado àquele primeiro descrito por Poiesz, porém, distinto do mesmo. Prevalente na África Central e Ocidental, em populações ameríndias nativas na América do Norte, Central e do Sul, e entre grupos de usuários de drogas injetáveis nos Estados Unidos e Europa, o HTLV-2 apresenta aproximadamente 70% de homologia da sequência de nucleotídeos quando comparada as do HTLV-1. A partir de então, as variantes isoladas por Poiesz e por Kalyanaraman passaram a ser denominadas HTLV-1 e HTLV-2, respectivamente (GONÇALVES et al., 2010; KALYANARAMAN et al., 1982).

Em 1983, uma equipe francesa composta por virologistas, epidemiologistas e neurologistas iniciou uma série de estudos na Martinica e Guiana Francesa, a fim de investigar a epidemiologia e o impacto clínico do HTLV-1 nesta região. Isto levou à descoberta da associação entre o retrovírus e a neuromielopatia crônica (GESSAIN et al., 1985; GESSAIN; MAHIEUX, 2012).

Gessain et al., em 1985, demonstraram que pacientes portadores de paraparesia espástica tropical (*Tropical Spastic Paraparesis - TSP*), na região da Martinica, apresentavam sorologia positiva para HTLV-1 em 68% dos casos. Em 1986, uma condição neurológica similar foi descrita no Japão e denominada mielopatia associada ao HTLV-1 (*HTLV-1 Associated Myelopathy - HAM*). Posteriormente, Roman e Osame, em 1988, concluíram tratar-se da mesma doença, passando a ser usado o termo mielopatia associada ao

HTLV/paraparesia espástica tropical (do inglês, *HAM/TSP*). Em 1989, a Organização Mundial de Saúde (OMS) reconheceu oficialmente que a paraparesia espástica tropical (PET) e a mielopatia associada ao HTLV-1 (MAH) representava a mesma doença, conhecida em português através da denominação de PET/MAH. Desde então, inúmeras outras doenças vêm sendo correlacionadas com a infecção pelo HTLV-1 como uveíte, síndrome de Sjögren, dermatite infecciosa, polimiosite, artropatias, tireoidite, polineuropatias, alveolite linfocitária, linfoma cutâneo de células T, estrogiloidíase, escabiose, hanseníase e tuberculose (ARAÚJO; SILVA, 2006; GESSAIN et al., 1985; ROMAN; OSAME, 1988; ROMANELLI; CARAMELLI; PROIETTI, 2010).

No Brasil, o HTLV-1 foi primeiramente descrito por Kitagawa et al., em 1986, em uma comunidade japonesa residente em Campo Grande (MS), com soroprevalência de 13%, sendo a maioria dos indivíduos oriundos de Okinawa, sul do Japão. A primeira associação entre o vírus e a PET/MAH realizada no Brasil foi feita Castro et al., em 1989. Em Belém do Pará, Ishak et al., em 2002, associaram 3 casos de PET/MAH com o HTLV-1 (CASTRO et al., 1989; ISHAK et al., 2002; KITAGAWA et al., 1986; SANTOS; LIMA, 2005).

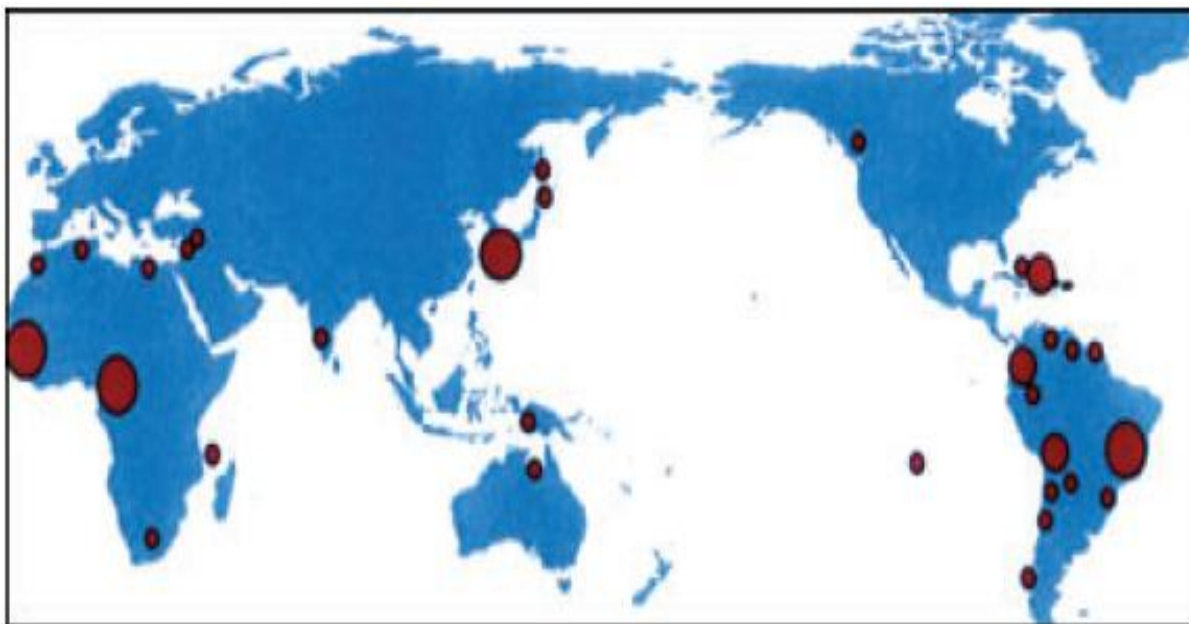
Em 2005 foram identificados os HTLV-3 e HTLV-4 em amostras de sangue de indivíduos no sul de Camarões em populações que tinham contatos com primatas não-humanos e não há relato de transmissão entre humanos e/ou se causam doenças em seus portadores (KANNIAN; GREEN, 2010; MAHIEUX; GESSAIN, 2005, 2009).

2.2 EPIDEMIOLOGIA

O HTLV-1 tem ampla distribuição mundial e estima-se que cerca de 20 milhões de pessoas estejam contaminadas. 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). O sul do Japão é a região mais endêmica do mundo (BRASIL, 2013; CARNEIRO-PROIETTI, 2006; MATSUURA; YAMANO; JACOBSON, 2010; OLIÉRE et al., 2011; ROMANELLI; CARAMELLI; PROIETTI, 2010; SAITO, 2010; SONODA; LI; TAJIMA, 2011; WATANABE, 2011).

A existência de infecções pelo HTLV-1 na África Equatorial, juntamente com a presença do vírus entre descendentes de africanos residentes no Caribe e na América Latina, sugere que a África seja o reservatório primário do vírus (SANTOS; LIMA, 2005).

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

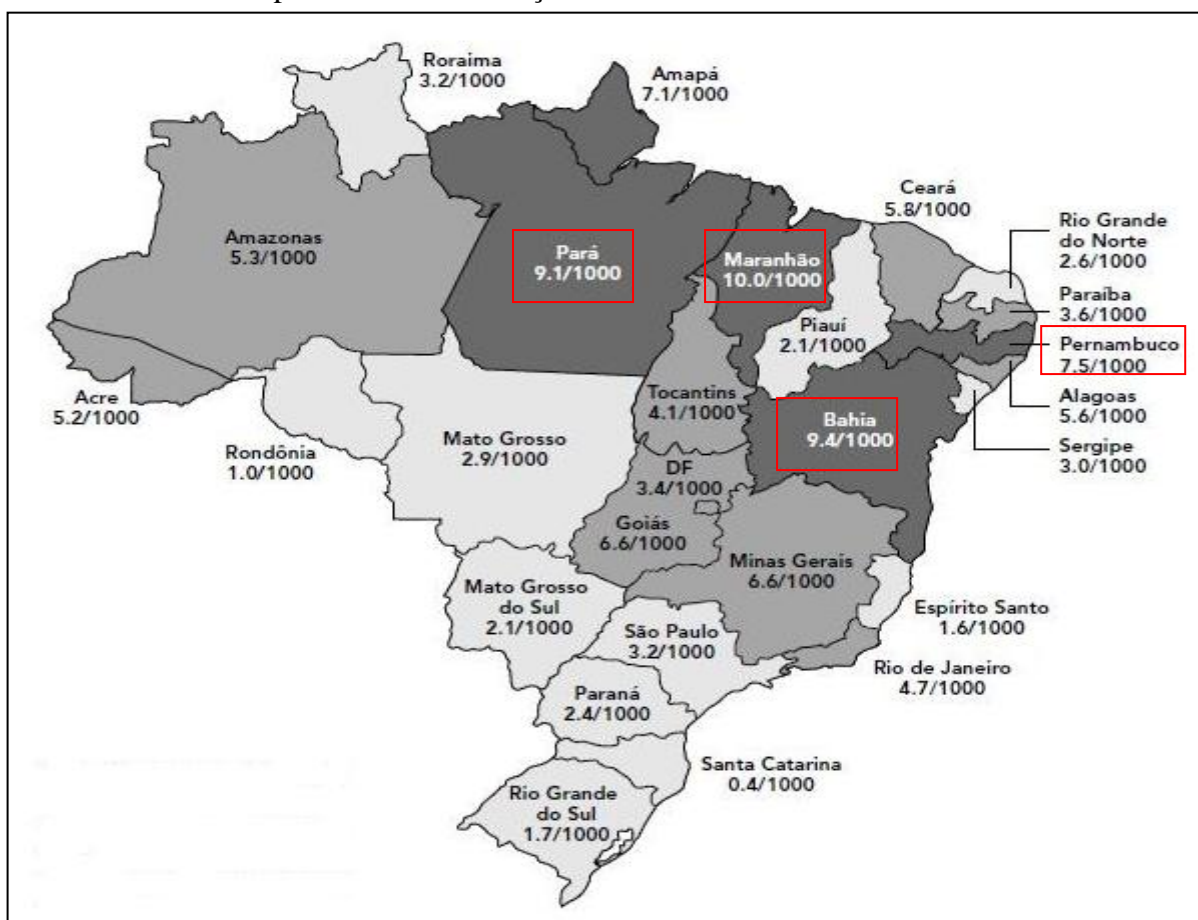


Fonte: Adaptado de Sonoda, Li e Tajima, 2011.

Por outro lado, ele é endêmico em diversos países da América Central e do Sul, incluindo Honduras, Panamá, Colômbia, Venezuela, Bolívia, Brasil, Peru, Chile e Argentina. No Brasil, a infecção pelo HTLV-1 é considerada endêmica. Estimativas apontam para aproximadamente 2,5 milhões de pessoas infectadas pelo HTLV-1, o que torna o Brasil o país com maior número absolutos de casos. Esta alta prevalência varia entre as regiões brasileiras, apresentando baixa prevalência na região sul do país e altas prevalências nas regiões norte e nordeste. Um estudo realizado em doadores de sangue das 27 capitais brasileiras demonstrou distribuição heterogênea, destacando-se como os Estados de maior prevalência o Pará, Maranhão, Pernambuco e Bahia (Figura 2) (CARNEIRO-PROIETTI, 2006; DIAS-BASTOS; OLIVEIRA; CARNEIRO-PROIETTI, 2010; DOURADO et al., 2003; JACOB et al., 2007; MAGRI et al., 2014; MATSUURA; YAMANO; JACOBSON, 2010; OLIÉRE et al., 2011; ROMANELLI; CARAMELLI; PROIETTI, 2010; SAITO, 2010; SANTOS; LIMA, 2005; SILVA et al., 2009; SONODA; LI; TAJIMA, 2011).

O HTLV-2 é mais prevalente entre usuários de drogas nos Estados Unidos e Europa, sendo endêmico entre vários grupos indígenas das Américas. No Brasil é mais prevalente entre os Caiapós, nos quais foi relatada prevalência superior a 25%. Já o HTLV-3 e HTLV-4 ainda não foram identificados em território brasileiro (CALATTINI et al., 2005; DIAS-BASTOS; OLIVEIRA; CARNEIRO-PROIETTI, 2010; GONÇALVES et al., 2010; MARTINS et al., 2011).

Figura 2 – Distribuição geográfica da infecção pelo HTLV-1 no Brasil e os quatro Estados (Maranhão, Bahia, Pará e Pernambuco), destacados com o quadro em vermelho, de maior prevalência da infecção.



Fonte: Adaptado de Catalan-Soares; Carneiro-Proietti; Proietti, 2005.

A transmissão do HTLV-1 ocorre, principalmente, por três vias. A via sexual é considerada a mais eficiente na transmissão. Ocorre principalmente do homem para mulher em cerca de quatro (04) vezes mais quando comparado a transmissão da mulher para o homem. Presume-se que a infecção adquirida através da atividade sexual seja consequente dos linfócitos infectados presentes no sêmen e na secreção vaginal (CHAMPS et al., 2010; GALVÃO-CASTRO et al., 2009; LAIRMORE et al., 2011; OLIVEIRA; AVELINO, 2007; RIBEIRO et al., 2010).

A via perinatal ocorre através de mães infectadas que amamentam seus filhos, resultando na transferência de linfócitos maternos infectados para o seu bebê. E também a contaminação do feto a partir do sangue materno infectado é relatada, na literatura, como mecanismo de transmissão viral, porém não representa um modo significativo de transmissão do HTLV-1 (CHAMPS et al., 2010; GALVÃO-CASTRO et al., 2009; LAIRMORE et al., 2011; OLIVEIRA; AVELINO, 2007; RIBEIRO et al., 2010).

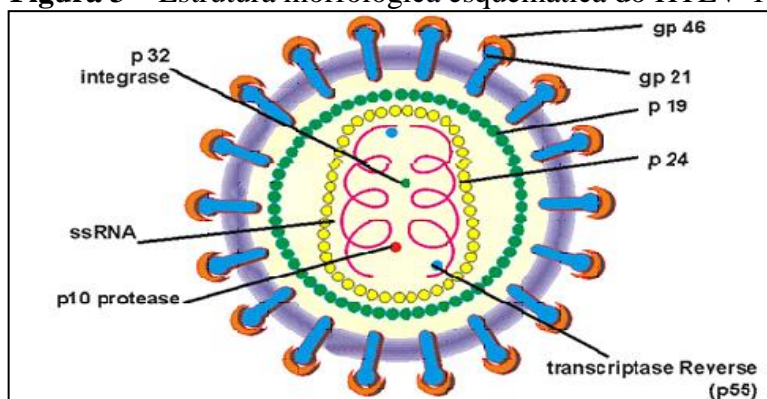
Por fim, a via sanguínea ocorre através de transfusões sanguíneas ou pelo uso de agulhas e/ou seringas contaminadas. A transfusão de produtos sanguíneos infectados continua a ser um importante problema de saúde pública. Por isso, no Brasil, desde 1993, a partir da portaria n.º 1.376, editada pelo Ministério da Saúde é exigida a pesquisa para o HTLV entre os hemodoadores (CHAMPS et al., 2010; GALVÃO-CASTRO et al., 2009; LAIRMORE et al., 2011; OLIVEIRA; AVELINO, 2007; RIBEIRO et al., 2010).

2.3 ESTRUTURA E GENOMA DO HTLV-1

Possui estrutura morfológica semelhante à de outros retrovírus, onde no interior do capsídeo têm-se duas fitas simples de RNA, a enzima transcriptase reversa e a integrase que são importantes para a inserção no genoma do hospedeiro, onde passará a constituir o provírus (Figura 3) (BOXUS; WILLEMS, 2009; HOSHINO, 2012; LAIRMORE et al., 2011; MATSUURA; YAMANO; JACOBSON, 2010).

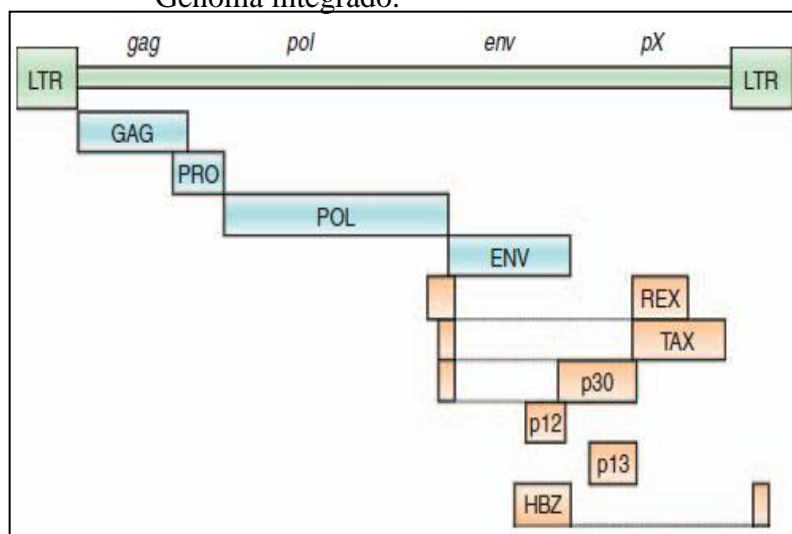
Seu genoma contém genes estruturais e funcionais (Figura 4), como os genes *gag*, *pro/pol* e *env* que estão flanqueadas por duas regiões LTR (*long terminal repeat*). Além disso, na região entre o gene *env* e a região 3'-LTR também foi descrita a região *pX*. O gene *gag* codifica as proteínas estruturais p19, p25 e p15; o gene *pro/pol* codifica a transcriptase reversa e a protease, respectivamente; o gene *env* codifica as glicoproteínas do envelope externo gp21 e gp46; o gene *pX* codifica as proteínas regulatórias TAX (p40), REX (p27), p12, p13, p21, p30, que estão implicadas na infecção e proliferação do vírus. Outra proteína recentemente identificada foi a HBZ (*HTLV-1 b-ZIP factor*), que, junto com a TAX, estão implicados na patogênese deste vírus (BOXUS; WILLEMS, 2009; HOSHINO, 2012; LAIRMORE et al., 2011; MATSUURA; YAMANO; JACOBSON, 2010).

Figura 3 – Estrutura morfológica esquemática do HTLV-1.



Fonte: Adaptado de Casseb e Oliveira, 2014.

Figura 4 - Organização genômica esquemática do HTLV-1. Genoma integrado.



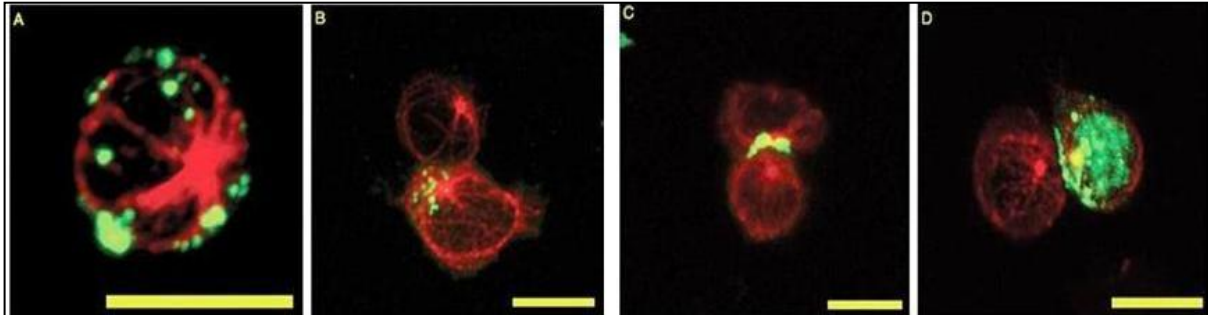
Fonte: Adaptado de Boxus e Willems, 2009.

2.4 REPLICAÇÃO DO HTLV-1

Como os demais retrovírus, seu ciclo de vida é dependente da enzima transcriptase reversa. Inicialmente a partícula viral necessita se ligar à superfície celular. Essa inserção ocorre entre as glicoproteínas do envelope viral e receptores específicos da superfície celular. Após essa interação, o vírus torna-se capaz de penetrar na célula, liberando todo o seu conteúdo no citoplasma. Neste, a fita simples de RNA viral é transcrita à DNA de fita dupla pela transcriptase reversa. A dupla fita de DNA linear migra para o núcleo e integra-se no genoma do hospedeiro pela ação da integrase viral. Uma vez integrado, o provírus utiliza a maquinaria celular para o processo de replicação viral. Os dados até agora disponíveis sugerem que o HTLV-1 é um vírus pouco replicativo e que a replicação viral *in vivo* ocorre mais devido à expansão clonal das células infectadas, do que via expressão do genoma integrado (HOSHINO, 2012; LAIRMORE et al., 2011; SANTOS; LIMA, 2005).

No HTLV-1 a infecção por virion livre é pouco eficiente. A infecção da célula pelo vírus ocorre através de sinapse entre células infectadas e não infectadas (Figura 5). A proteína TAX apresenta papel importante por estimular o número de cópias de provírus e a proliferação celular, além de inibir apoptose. O HTLV-1 pode infectar vários tipos celulares, como célula T, B e células sinoviais, mas possui tropismo por células CD4⁺ (HOSHINO, 2012; LAIRMORE et al., 2011; MAJOROVITS et al., 2008; SATOU; MATSUOKA, 2010).

Figura 5 - Localização intracelular da proteína Tax e complexos Gag p19 em conjugados de células T infectadas pelo HTLV-1. Cada painel mostra a superposição de coloração com anti- β -tubulina mAb (vermelho) e anti-Gag p19 mAb ou anti-Tax mAb (verde). **(A)** Mostra a não polarização da proteína Gag em células T. **(B e C)** mostra a polarização da proteína Gag. **(D)** Polarização da proteína Tax. **(D)** A proteína Tax polarizada é vista como um crescente verde ao longo da junção célula-célula.



Fonte: Adaptado de Nejmeddine et al., 2005.

O gene *tax* codifica a proteína mais estudada do HTLV-1. A proteína TAX influencia a expressão de genes virais e celulares. A estimulação da expressão de genes virais ocorre 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, SRF, CREB e AP-1. Além disso, TAX também pode inativar p53, p16^{INK4A} e MAD-1. Especula-se que TAX tenha grande importância na proliferação das células infectadas por HTLV-1 durante o estado assintomático. Além disso, seu fenótipo “mutador” pode acumular alterações genéticas e epigenéticas no genoma do hospedeiro que mantém a proliferação independente de *tax*. Com isso, a expressão de *tax* pode ser inibida, e como ela é alvo do sistema imunológico, sua repressão leva ao escape do mesmo. O gene *hbz*, recentemente descrito, situa-se na região 3'-LTR, que, ao contrário da 5'-LTR, apresenta-se hipometilada. A proteína codificada por este gene foi inicialmente descrita ligando-se a CREB-2 e inibindo a transcrição de TAX. Estudos mostraram que 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; HOSHINO, 2012; JEANG, 2010; YASUNAGA; MATSUOKA, 2007).

2.5 RESPOSTA IMUNOLÓGICA CONTRA O VÍRUS

Inicialmente, achava-se que o 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? A não detecção destes antígenos está relacionada com a diminuição da expressão da proteína TAX (BOXUS; WILLEMS, 2009; MACNAMARA et al., 2010).

Com relação à proteína TAX, apesar de apresentar 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. Como ela também é alvo da resposta imunológica celular, a inibição de sua expressão confere vantagens às células infectadas. Essa inativação da TAX ocorre pela ação de HBZ, para evitar a produção exagerada de TAX. O que se tem entre as proteínas TAX e HBZ é uma relação de *feedback*, uma vez que a TAX ativa a produção de HBZ que, por sua vez, reprime a transativação mediada de TAX. Outro ponto importante é que, em um estudo desenvolvido por Boxus e Willems (2009) foi demonstrado que a resposta citotóxica contra HBZ é ineficiente, não eliminando as células que expressam HBZ (ASQUITH; BANGHAM, 2008; BOXUS; WILLEMS, 2009; MACNAMARA et al., 2010; SAITO, 2010; SUEMORI et al., 2009).

O número de CTL específicas contra células infectadas com HTLV-1 se correlaciona positivamente com a carga de provírus de HTLV-1 tanto nos indivíduos assintomáticos quanto em indivíduos com PET/MAH. Sabe-se que quanto maior é a carga viral em indivíduos infectados maior é a chance de desenvolvimento de doenças HTLV-associadas. 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. 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 pró-inflamatórias 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 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. Entretanto, essas células CD4⁺ respondem mais a proteína ENV do HTLV-1, 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).

2.6 ALTERAÇÕES IMUNOLÓGICAS DA PET/MAH

Para o desenvolvimento dos sinais característicos da PET/MAH, os pacientes apresentam alterações na resposta imunológica. Estas alterações incluem a proliferação de linfócitos T CD4⁺ infectados pelo HTLV-1, com característica de proliferar-se de forma espontânea, além de expressão do gene viral intensificada, altos títulos de anticorpos contra HTLV-1 (encontrados tanto no soro quanto no fluido cérebro espinhal) e resposta imunológica vírus-específica, incluindo produção aumentada de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , TNF- α , IL-1 e IL-6. Além disso, quando as células T CD4⁺ estão 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 (ARAÚJO et al., 2009; BEST et al., 2009; CASTRO-COSTA et al., 2009; ROMANELLI; CARAMELLI; PROIETTI, 2010).

Estes indivíduos possuem resposta imunológica específica que é característica para o fenótipo do tipo Th1, apresentando produção aumentada de citocinas como IFN- γ e TNF-

α , que estão hiperexpressas nos linfócitos de sangue periférico. Isso pode levar a 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 diminuição para o perfil Th2, na qual os níveis de IL-4, apresentavam-se em níveis 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 exacerbada 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, o que ocorre é a exacerbção da resposta imunológica, uma vez que nestes pacientes as células T com o fenótipo $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ (Treg) 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 à 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 da 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 exacerbção do quadro inflamatório

na PET/MAH (BEWICK; YANG; ZHANG, 2009; HERAUD et al., 2007; MICHAËLSON et al., 2008; MONTES et al., 2009; SAITO, 2010).

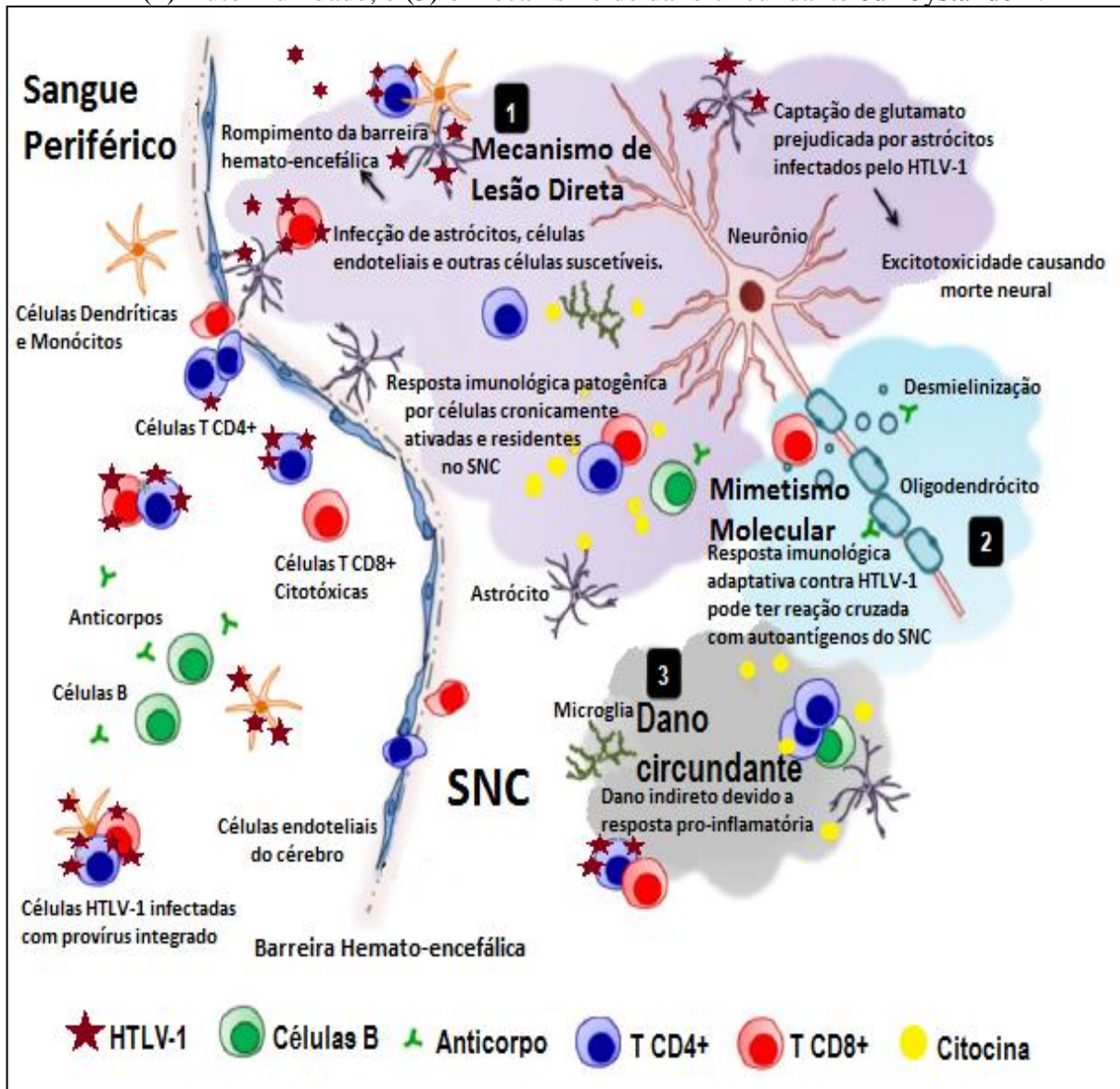
Estudo desenvolvido por Yamano et al. (2009) demonstrou que em pacientes com PET/MAH, a ativação persistente da resposta imunológica induzida por TAX, estaria associada a uma diminuição da expressão de células T $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ com função supressora e a um acúmulo da população de células T $CD4^+CD25^+FOXP3^-$, 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 $IFN-\gamma$ e que se correlacionava com a severidade da PET/MAH (TOULZA et al., 2008).

Os verdadeiros mecanismos pelo qual o HTLV-1 induz doenças neurológicas são desconhecidos. No entanto, diante do cenário exposto em relação às alterações imunológicas para o desenvolvimento da PET/MAH, existem três principais hipóteses sobre a patogênese da doença (Figura 6). A primeira hipótese aponta para o mecanismo de citotoxicidade direta, onde células T citotóxicas $CD8^+$, específicas para antígenos do HTLV-1, cruzariam a barreira hematoencefálica e destruiriam, por mecanismos citotóxicos diretos ou via produção de citocinas, as células da glia infectadas pelo HTLV-1 (ARAÚJO; SILVA, 2006; COOPER; VAN DER LOEFF; TAYLOR, 2009; SAITO, 2010; SHOEIBI et al., 2013).

A segunda hipótese, denominada de autoimunidade, aponta para um processo de mimetismo molecular no qual a semelhança entre uma proteína neuronal do hospedeiro e a mais importante proteína do vírus, o antígeno Tax, acarretaria um processo inflamatório de auto-imunidade com lesão neuronal (ARAÚJO; SILVA, 2006; COOPER; VAN DER LOEFF; TAYLOR, 2009; SAITO, 2010; SHOEIBI et al., 2013).

A terceira e última hipótese, a mais aceita de todas, também denominada de dano circundante ou “*bystander*” envolveria os linfócitos T $CD4^+$ infectados e os linfócitos T $CD8^+$ específicos para a proteína viral Tax, que juntos atravessariam a barreira hematoencefálica e produziram grande quantidade de citocinas proinflamatórias levando a um processo de intensa inflamação e destruição tecidual. Neste sentido, acredita-se, neste estudo, que os linfócitos são ativados na paraparesia espástica tropical, e quando atravessam a barreira hemato-encefálica, dão início ao processo inflamatório no SNC resultante em lesão celular (ARAÚJO; SILVA, 2006; COOPER; VAN DER LOEFF; TAYLOR, 2009; SAITO, 2010; SHOEIBI et al., 2013).

Figura 6 – Principais hipóteses sobre a patogênese da PET/MAH: (1) citotoxicidade direta; (2) Autoimunidade; e (3) o mecanismo de dano circundante ou “bystander”.



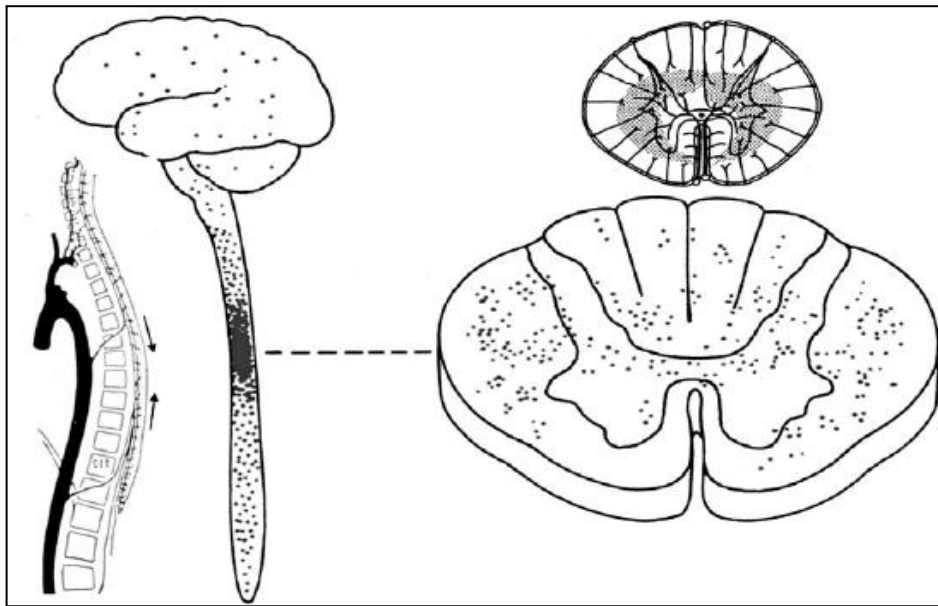
Fonte: Adaptado de Olière et al., 2011.

2.7 FISIOPATOLOGIA DA PET/MAH

As descrições patológicas da PET/MAH indicam principalmente o acometimento da medula espinhal ao nível torácico inferior (Figura 7). Ocorre um processo de inflamação na medula espinhal, acometendo a substância branca e cinzenta, seguida por degeneração axonal (Figura 8A), apesar da degeneração não está relacionada a tratos específicos, estudos anatomopatológicos demonstrarem degeneração das colunas posteriores do fascículo grácil (1), dos tratos cortico-espinhal lateral (2), tratos espino-cerebelar anterior (3) e posterior (5) e espinotalâmicos do funículo lateral (4) (Figura 8B). Características dessas lesões são

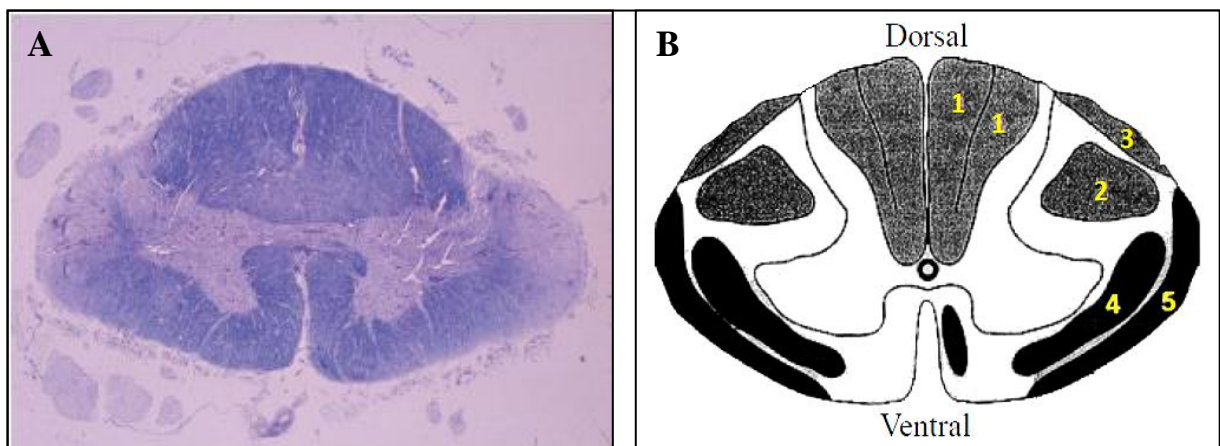
infiltrados perivasculares e parênquimal principalmente com linfócitos e macrófagos espumantes, proliferação de astrócitos e gliose fibrilar. Há ampla destruição de mielina e perda de axônios especialmente do trato corticoespinal, consistentes com os achados clínicos (ARAÚJO et al., 2009; CASTRO-COSTA et al., 2009; COOPER; VAN DER LOEFF; TAYLOR, 2009; IZUMO, 2010; MORGAN, 2011; SAITO, 2010; YAMANO et al., 2009; YAMANO; SATO, 2012; SHOEIBI et al., 2013).

Figura 7 – Distribuição da inflamação e infecção causada pelo HTLV-1 no SNC. Medula espinal torácica de um paciente com PET/MAH, com 2,5 anos de doença.



Fonte: Adaptado de Izumo, 2010.

Figura 8 – (A) Medula espinal torácica de um paciente com PET/MAH, com 2,5 anos de doença. (B) Distribuição da inflamação e infecção causada pelo HTLV-1 no SNC.



Fonte: Defino, 1999; Izumo, 2010. (modificado pelo autor).

Posteriormente ao curso da doença, o processo se torna menos celular e mais atrófico. Citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IFN- γ e IL-1 β foram detectados em células no infiltrado perivascular. Não há nenhuma evidência direta de que o HTLV-1 infecta os neurônios, astrócitos ou microglia, mas as células T CD4+ tem sido observada nas lesões da medula espinal (COOPER; VAN DER LOEFF; TAYLOR, 2009; MORGAN, 2011; YAMANO; SATO, 2012; SHOEIBI et al., 2013).

A inflamação causada na medula ocasiona comprometimentos motores (fraqueza e espasticidade em membros inferiores), sensoriais (parestesias e dores neuropáticas), distúrbios esfinterianos vesicais e intestinais, além de disfunção erétil no homem (ARAÚJO; SILVA, 2006; ARAÚJO et al., 2009; CASTRO-COSTA et al., 2009; SAITO, 2010; YAMANO et al., 2009).

Embora a alteração do tecido parenquimático não esteja confinada a nenhum trato específico, a degeneração simétrica do trato corticoespinal 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 espinocerebelar anterior e posterior, ocasionando perda da propriocepção inconsciente, e do trato espinotalâmico lateral, provocando distúrbios relacionados à dor e temperatura. Vale ainda ressaltar o possível comprometimento da substancia gelatinosa, o que pode agravar o quadro algico (ARAÚJO et al., 2009; CASTRO-COSTA et al., 2009; COOPER; VAN DER LOEFF; TAYLOR, 2009; MORGAN, 2011; SAITO, 2010; SHOEIBI et al., 2013; YAMANO; SATO, 2012).

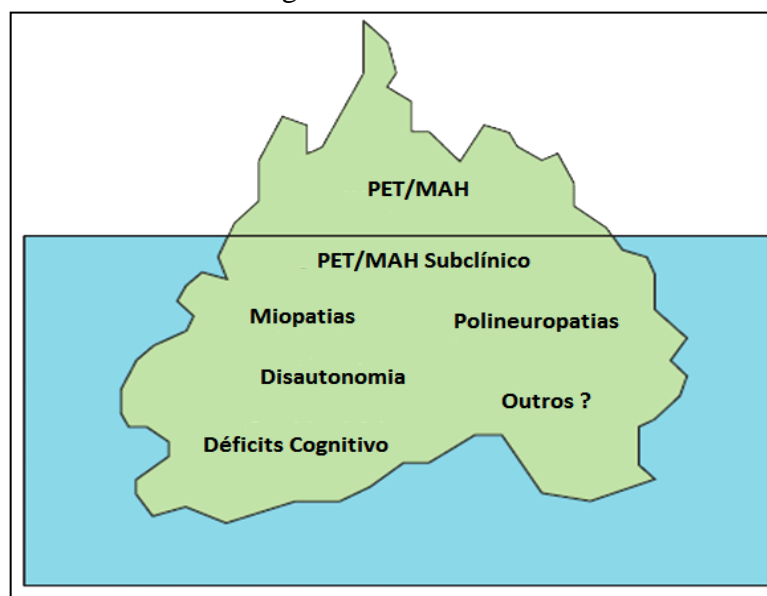
2.8 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA PET/MAH

A lesão celular na medula espinal, resultante da inflamação provocada pela ação das citocinas inflamatórias induzidas pelo HTLV-1 no SNC, leva ao desenvolvimento da PET/MAH. Esta é a manifestação neurológica mais comum associada ao vírus. O HTLV-1 tem um amplo espectro de manifestações neurológicas, denominado de complexo neurológico (Figura 9) (ARAÚJO; SILVA, 2006; SHOEIBI et al., 2013).

A PET/MAH se desenvolve tipicamente em mulheres (relação mulher/homem 2-3:1) na quarta década de vida. A principal característica clínica da doença é a paraparesia espástica

(perda parcial das funções motoras dos membros inferiores associado ao aumento do tônus muscular) de evolução lenta e progressiva com distúrbios neurológicos vesicais. É tipicamente uma doença com início insidioso, seguido por uma evolução crônica e estável (ARAUJO; SILVA, 2006; COOPER; VAN DER LOEFF; TAYLOR, 2009; GONÇALVES et al., 2008; YAMANO; SATO, 2012; SHOEIBI et al., 2013).

Figura 9 - Representação esquemática do complexo neurológico do HTLV-1: o modelo do iceberg.



Fonte: Adaptado de Araujo e Silva, 2006.

O desenvolvimento de incapacidade neurológica ocorre normalmente durante o primeiro ou segundo ano do curso da doença. Isto indica uma possível fase inflamatória inicial, seguida por uma fase degenerativa prolongada (ARAUJO; SILVA, 2006; COOPER; VAN DER LOEFF; TAYLOR, 2009; GONÇALVES et al., 2008; SHOEIBI et al., 2013).

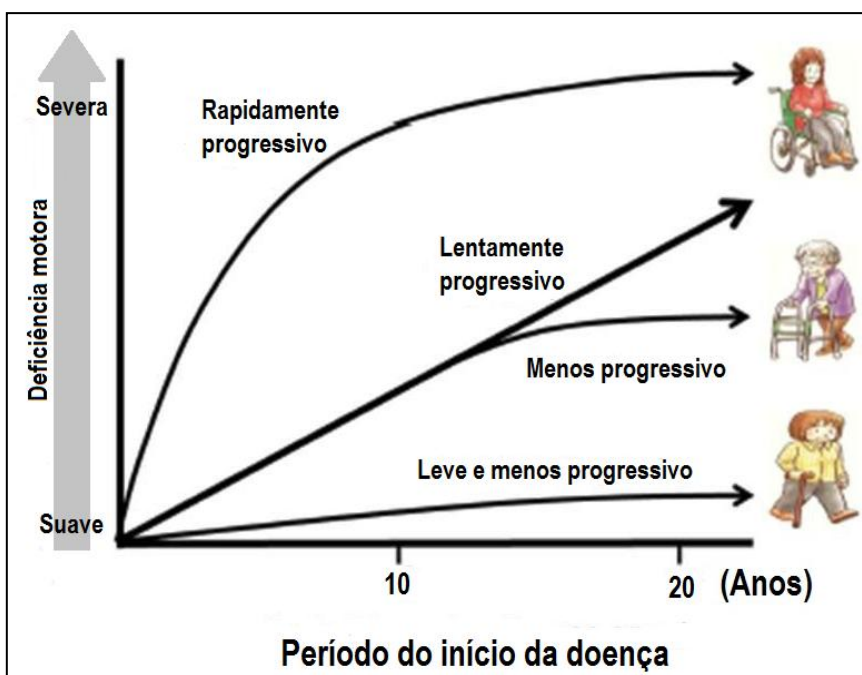
A evolução da PET/MAH ocorre de forma mais rápida em mulheres do que em homens. A razão para esta diferença de progressão entre homens e mulheres ainda é desconhecida, porém hormônios sexuais femininos podem estar associados ao avanço do quadro neurológico da PET/MAH. Também estão associados como possíveis causa de progressão da doença da PET/MAH aqueles indivíduos que apresentam altas cargas virais, sugerindo aumento da proliferação e migração de linfócitos infectados para o SNC, assim como indivíduos imunossuprimidos (ARAUJO; SILVA, 2006; GONÇALVES et al., 2008; SHOEIBI et al., 2013).

As características clínicas da doença envolvem distúrbios motores, sensoriais e autonômicos. Estas manifestações clínicas podem ser divididas em sinais e sintomas apresentados pelos pacientes com PET/MAH (COOPER; VAN DER LOEFF; TAYLOR, 2009; SHOEIBI et al., 2013; YAMANO; SATO, 2012).

Os principais sintomas motores descritos pelos pacientes incluem distúrbios na marcha, com queixas iniciais de tropeços durante a deambulação, com tendência a risco de quedas, além de fraqueza muscular. Estes sintomas relacionados aos membros inferiores apresentam distribuição assimétrica em fases iniciais, e, principalmente, distribuição simétrica com a progressão da doença. Já os sinais motores característicos da PET/MAH são a paraparesia espástica, onde os pacientes apresentam a marcha do tipo espástica, com fraqueza de membros inferiores, a qual é mais evidente proximalmente, além de hiperreflexia, presença de clônus e sinal de Babinski. A hiperreflexia nos membros superiores pode ser observada em alguns pacientes. No que diz respeito à força muscular nos membros superiores, observa-se a preservação da força durante todo o curso da doença (COOPER; VAN DER LOEFF; TAYLOR, 2009; GONÇALVES et al., 2008; SHOEIBI et al., 2013; YAMANO; SATO, 2012).

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 (como já foi mencionado anteriormente), 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, acometendo principalmente os músculos adutores do quadril, extensores de joelho e flexores plantares de tornozelo; assim como severo encurtamento e fraqueza dos músculos pélvicos. Os passos tornam-se arrastados e lentos, comprometendo as fases da marcha. Os movimentos perdem sua seletividade, provocando deficiência no sinergismo funcional entre as cinturas escapulares e pélvica, com acentuada imobilidade da articulação sacro-ilíaca. O grau de espasticidade e fraqueza muscular tornam-se, portanto, os principais fatores limitantes da marcha, sendo necessários dispositivos que os auxiliem na deambulação. Ocorre uma progressão dos auxiliares na marcha durante o desenvolvimento da PET/MAH, onde em estágios mais avançados estes pacientes estarão confinados a cadeira de rodas (Figura 10) (ARAÚJO et al., 2009; CAROD-ARTAL et al., 2008; COOPER; VAN DER LOEFF; TAYLOR, 2009; GONÇALVES et al., 2008; ROMANELLI; CARAMELLI; PROIETTI, 2010; SANTOS; MUNIZ; CARVALHO, 2009; SHOEIBI et al., 2013; YAMANO; SATO, 2012).

Figura 10 – Evolução clínica da PET/MAH.



Fonte: Adaptado de Yamano e Sato, 2012.

Os sintomas sensoriais relatados pelos pacientes incluem dor e dormência na região lombar e nos membros inferiores. Em alguns casos, a dor é intensa e mais angustiante do que os distúrbios da marcha. Já os sinais sensoriais que são característicos da PET/MAH incluem parestesias nos pés, podendo ocorrer nas mãos, e, quando acontece, é de forma leve. Ocorrem alterações da sensibilidade tátil, dolorosa e vibratória nos membros inferiores. O nível sensorial é compatível com alterações na medula torácica inferior, porém o nível medular exato do acometimento da sensibilidade é incomum (COOPER; VAN DER LOEFF; TAYLOR, 2009; GONÇALVES et al., 2008; SHOEIBI et al., 2013; YAMANO; SATO, 2012).

Os sintomas de disfunção autonômica incluem os distúrbios vesicais/intestinais e disfunção sexual, estes sintomas são geralmente insidioso, mas ocasionalmente podem ocorrer de forma abrupta ao longo de semanas. Sintomas de bexiga neurogênica como frequência urinária, urgência, incontinência e/ou retenção são muito comuns e visto como os sintomas iniciais no curso da doença; às vezes estes sintomas precedem o desenvolvimento do quadro de paraparesia. Os sinais mais comuns de disfunção autonômica incluem bexiga neurogênica, bexiga hiperativa, peristaltismo diminuído e disfunção erétil no homem. Os sinais e sintomas menos comuns presentes nos indivíduos com PET/MAH incluem sinais cerebelares, neurite e atrofia óptica e nistagmo (COOPER; VAN DER LOEFF; TAYLOR, 2009; GONÇALVES et al., 2008; SHOEIBI et al., 2013; YAMANO; SATO, 2012).

Outro aspecto clínico importante diz respeito aos exames de imagens. Com o processo degenerativo, envolvendo o SNC que ocorre na PET/MAH, as imagens de ressonância magnética são importantes para caracterizar este quadro de atrofia medular, principalmente na região torácica inferior (Figura 11). Estes exames são de grande valia para o diagnóstico clínico desta enfermidade (COOPER; VAN DER LOEFF; TAYLOR, 2009).

Figura 11 – Imagem de ressonância magnética (RM) mostrando atrofia da medula torácica em paciente com PET/MAH, como mostra pela seta branca.



Fonte: Adaptado de Cooper; Van Der Loeff; Taylor, 2009.

2.9 DIAGNÓSTICO DA PET/MAH

O diagnóstico da PET/MAH é baseado na combinação de características clínicas e confirmação laboratorial da infecção por HTLV-1, além da exclusão de outras patologias que podem levar a paraparesia espástica (COOPER; VAN DER LOEFF; TAYLOR, 2009; SHOEIBI et al., 2013; SLATER; RIBEIRO; PUCCIONI-SOHLER, 2012; YAMANO; SATO, 2012).

Após as descrições patológicas da PET/MAH e a associação com o HTLV-1, um marco importante foi o estabelecimento de critérios de diagnóstico desta patologia. A Organização Mundial da Saúde (OMS), em 1988, propôs critérios específicos para se chegar ao diagnóstico de PET/MAH, sendo estes critérios revisados em 1989 (COOPER; VAN DER

LOEFF; TAYLOR, 2009; DE CASTRO-COSTA et al., 2006; SHOEIBI et al., 2013; SLATER; RIBEIRO; PUCCIONI-SOHLER, 2012).

Os critérios preconizados pela OMS apresentam uma vasta lista de itens capazes de se chegar ao diagnóstico preciso de PET/MAH, porém estes inúmeros critérios a tornaram, muitas das vezes, difícil de aplicar. Buscando otimizar os critérios de diagnóstico para PET/MAH, tornado-os mais viável e de fácil execução, De Castro-Costa et al., em 2006, elaboraram uma proposta para o diagnóstico de PET/MAH, baseando-se nos critérios da OMS e na experiência de profissionais. De acordo com os autores os níveis são chamados de definitivos, prováveis e possíveis. Cada nível contém três critérios, os quais devem ser cumpridos para que o diagnóstico seja realizado como os sintomas de mielopatia, achados sorológicos e/ou detecção do DNA proviral do HTLV-1 e a exclusão de outros distúrbios, como:

DEFINITIVO:

- A paraparesia espástica progressiva não-remitente com marcha prejudicada o suficiente para ser percebida pelo paciente. Sinais ou sintomas sensoriais podem ou não estar presente. Quando presentes, eles permanecem sutil e sem um nível sensorial claro. Sinais e sintomas de esfíncter urinário e anal podem ou não estar presente.
- Presença de anticorpos anti-HTLV-1 no soro e LCR confirmado por Western blot e/ou PCR positivo para HTLV-1 no sangue e/ou líquido.
- Exclusão de outras doenças que podem se assemelhar a PET/MAH.

PROVÁVEL:

- Apresentação monossintomática: espasticidade ou hiperreflexia nos membros inferiores ou sinal de Babinski isolado, com ou sem sutis sinais e sintomas sensoriais, ou bexiga neurogênica somente confirmado por testes urodinâmicos.
- Presença de anticorpos anti-HTLV-1 no soro e/ou LCR confirmado por Western blot e/ou PCR positivo para HTLV-1, em sangue e/ou líquido.
- Exclusão de outras doenças que podem se assemelhar a PET/MAH.

POSSÍVEL:

- Apresentação clínica completa ou incompleta.
- Presença de anticorpos anti-HTLV-1 no soro e/ou LCR confirmado por Western blot e/ou PCR positivo para HTLV-1, em sangue e/ou líquido.

- Distúrbios que podem se assemelhar a PET/MAH não deve ser excluído.

Para a confirmação da infecção por HTLV-1, a triagem sorológica para detecção de anticorpos anti-HTLV pode ser realizada utilizando o método de ensaio imunoenzimático (ELISA). O teste confirmatório para o rastreamento positivo é necessário nos indivíduos para eliminar falsos positivos e discriminar entre HTLV-1 e HTLV-2. Confirmação sorológica pode ser realizada por meio do teste de Western Blot ou através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) (COOPER; VAN DER LOEFF; TAYLOR, 2009; SHOEIBI et al., 2013; YAMANO; SATO, 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar o padrão de resposta imunológica periférica dos portadores do HTLV-1 e sua correlação com as manifestações neurológicas funcionais nos indivíduos com PET/MAH.

3.2 ESPECÍFICOS

- Mensurar o grau de força muscular nos pacientes acometidos por PET/MAH;
- Avaliar a espasticidade nos pacientes acometidos por PET/MAH;
- Avaliar o equilíbrio e a marcha nos pacientes acometidos por PET/MAH;
- Graduar o auxílio da marcha nos pacientes acometidos por PET/MAH;
- Quantificar a expressão gênica das citocinas $\text{INF-}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$, IL-4, IL-10 e $\text{TGF-}\beta$ nos portadores do HTLV-1;
- Correlacionar a expressão gênica das citocinas ($\text{IFN-}\gamma$ e $\text{TNF-}\alpha$; IL-4; $\text{TGF-}\beta$ e IL-10) com as manifestações neurológicas dos pacientes acometidos por PET/MAH;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo observacional descritivo e analítico do tipo transversal.

4.2 SELEÇÃO DOS CASOS

Os participantes que compuseram a amostra foram selecionados por conveniência entre os indivíduos que compareceram para acompanhamento clínico de rotina em serviço de média complexidade em saúde no Laboratório de Clínica e Epidemiologia de Doenças Endêmicas do Núcleo de Medicina Tropical (NMT) da UFPA no período de Agosto de 2010 a Agosto de 2014. Estes pacientes foram incluídos no estudo respeitando a ordem de chegada no serviço e o preenchimento dos critérios de inclusão. Os indivíduos chegavam ao serviço com diagnóstico sorológico (ELISA) de infecção por HTLV-1. Posteriormente, as sorologias positivas foram confirmadas e tipadas pelo laboratório de Biologia Celular e Molecular do NMT, através da técnica da PCR.

4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram considerados critérios de inclusão indivíduos de ambos os sexos, maiores de 18 anos, sorologia e PCR positivos para o HTLV-1, com ou sem disfunção neurológica, não infectados pelo HIV-1 e que estivessem em atendimento no Laboratório de Clínica e Epidemiologia de Doenças Endêmicas do NMT da UFPA.

4.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

A não observância de um dos critérios acima implicou na exclusão do indivíduo da pesquisa. Assim como aqueles pacientes que se encontravam fazendo uso de fármacos imunossupressores e com diagnóstico diferencial de Esclerose Múltipla; Meningite Carcinomatosa; Paraparesia Espástica Familiar; Mielite Transversa; Esclerose Lateral Primária; Síndromes Paraneoplásicas; Siringomielia; Doença de Lyme; Deficiência de B12 e Folato; Doença de Behçet; Neurosífilis; Neurotuberculose; Sarcoidose; Mielopatia Vacuolar por HIV; Doenças do Colágeno; Mielopatias Auto-imune; Síndrome de Sjögren; Mielopatias

tóxicas; Esclerose Lateral Amiotrófica; Mielopatia por fungos; Fístula Vertebral Arteriovenosa; Mielopatia Hepática; Mielopatia Parasitárias (*Toxocara canis* e *Ascaris suum*); Compressão da medula espinhal (Tumor espinhal, Espondilose cervical, Tumor cerebral, etc); Mielopatias regionais endêmicas com manifestações clínicas semelhantes (incluindo esquistossomose e neurocisticercose).

4.5 AVALIAÇÃO FUNCIONAL

Foram estabelecidos dois grupos, ambos com diagnóstico de infecção pelo HTLV-1. O primeiro grupo composto por 43 pacientes sem PET/MAH e o segundo grupo com 26 pacientes com PET/MAH. Para o diagnóstico de PET/MAH utilizou-se os critérios propostos por De Castro-Costa et al. (2006), que são: a paraparesia espástica progressiva não-remitente com marcha prejudicada o suficiente para ser percebida pelo paciente. Sinais ou sintomas sensoriais que podem ou não estar presentes; sinais e sintomas de disfunção do esfíncter urinário e anal que podem ou não estar presente; presença de anticorpos anti-HTLV-1 no soro e LCR (Líquido cefalorraquidiano) confirmado por Western blot e/ou PCR positivo para HTLV-1 no sangue e/ou líquido; Além de exclusão de outras doenças que podem se assemelhar a PET/MAH.

A avaliação clínica dos pacientes infectados pelo HTLV-1 foi realizada de forma conjunta por médicos e fisioterapeuta. A equipe foi composta por uma médica Infectologista, dois médicos Reumatologistas e uma Neurologista. A partir desta avaliação, os pacientes foram diagnosticados como portadores de PET/MAH ou não. A interação destes profissionais na avaliação destes pacientes proporcionou visão global da situação clínica apresentada por estes indivíduos. Esta avaliação multidisciplinar foi importante para a homogeneidade na coleta dos dados, como também na tentativa de proporcionar ao paciente qualidade no atendimento e manejo clínico dos sintomas apresentados por eles.

Na avaliação neurológica funcional (Apêndice A) foram utilizados instrumentos que fornecessem dados mais objetivos ou que quantificassem o quadro clínico neurológico dos pacientes com PET/MAH. Para que a avaliação fosse mais criteriosa e ao mesmo tempo menos cansativa ao indivíduo avaliado, foram aplicadas escalas de fácil execução, rápida aplicabilidade e fidedignidade nos resultados obtidos. As escalas utilizadas na fisioterapia se encaixam neste perfil e englobam uma vasta lista de instrumentos que qualificam e quantificam alterações no sistema neurológico, onde neste estudo foi avaliada funcionalmente a força muscular, tônus muscular, equilíbrio e alterações na marcha.

4.6.1 Força muscular

A avaliação da força muscular foi realizada pela Escala do Conselho de Pesquisa Médica – Escala MRC (*Medical Research Council*), baseado nos estudos de Paternostro-Sluga et al. (2008) (Anexo A). Esta escala consiste na graduação da força de 0 a 5, de acordo com a seguinte classificação: Grau 0 (Sem contração); Grau 1 (Contração muscular visível ou palpável sem movimentação); Grau 2 (Movimento ativo com eliminação da gravidade); Grau 3 (Movimento ativo contra a gravidade); Grau 4 (Movimento ativo contra gravidade e resistência) e Grau 5 (Força normal). Foram avaliadas a contração dos músculos do quadril (região proximal), solicitando a flexão; para os músculos do joelho (região distal) foram solicitados movimentos de extensão; e para os músculos do tornozelo (região distal), foram solicitados os movimentos de flexão plantar, e, todos os pacientes estavam na posição sentada durante a realização do teste para que se pudesse obter padronização durante a avaliação.

4.6.2 Tônus muscular

Foi tomada como referência de avaliação, para a espasticidade muscular, a escala de Ashworth Modificada (Anexo B) segundo Bohannon e Smith (1987), onde a movimentação passiva da extremidade inferior seria 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 padronização da avaliação e homogeneidade na coleta dos dados.

Esta escala apresenta 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 flexores plantares de tornozelo são os principais músculos acometidos na espasticidade de membro inferior. Estes músculos foram usados como referência para a classificação geral destes pacientes, de acordo com os estudos de Ghotbi et al. (2011).

4.6.3 Escala de Equilíbrio e Mobilidade de Tinetti

Foi utilizada a Escala de Equilíbrio e Mobilidade de Tinetti (*Tinetti Performance-Oriented Mobility Assessment - POMA*) (Anexo C), de acordo com Tinetti (1986) e validado para língua portuguesa por Gomes (2003). Tem sido usada para avaliar o equilíbrio e as anormalidades da marcha. O teste consiste de 16 itens, divididos em duas escalas. A primeira (Para o equilíbrio) é avaliada nove itens divididos em: sentar sozinho, incapacidade de ficar em pé, instabilidade para girar/virar e instabilidade quando o esterno é empurrado para trás. A segunda é avaliada sete itens relacionados à marcha dentre eles, início da marcha, simetria e continuidades dos passos. A contagem para cada exercício varia de 0 a 1 ou de 0 a 2, com uma contagem mais baixa que indica uma habilidade física mais pobre. A pontuação total do índice é de 28 pontos. Pontuação menor que 19 indica alto risco de quedas; 19 a 24 pontos indica risco médio de quedas e 25 a 28 pontos indica baixo risco de quedas.

4.6.4 Grau de auxílio na marcha

O grau de auxílio na marcha foi caracterizado identificando quais dispositivos eram utilizados por eles durante a deambulação. Estes dispositivos foram classificados em ordem crescente segundo o grau de necessidade do auxílio. Foi criada assim uma escala progressiva (Apêndice B), onde o número zero (0) era aquele indivíduo cuja deambulação seria sem auxílio; o número um (1) era com auxílio de terceiros; o número dois (2) com o uso de bengala ou muleta unilateral; o três (3) com o uso de muleta bilateral; o quatro (4) seria com o uso de andador e o cinco (5) por cadeira de rodas. Sabe-se que alguns pacientes apresentavam diferentes mecanismos que os auxiliam 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.

4.7 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.

4.7.1 Coleta de sangue, separação e contagem das células linfomononucleares

Após a avaliação funcional, 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-paqueTM 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 pellete de células no fundo do tubo. A estas células restantes, foram acrescidos 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.

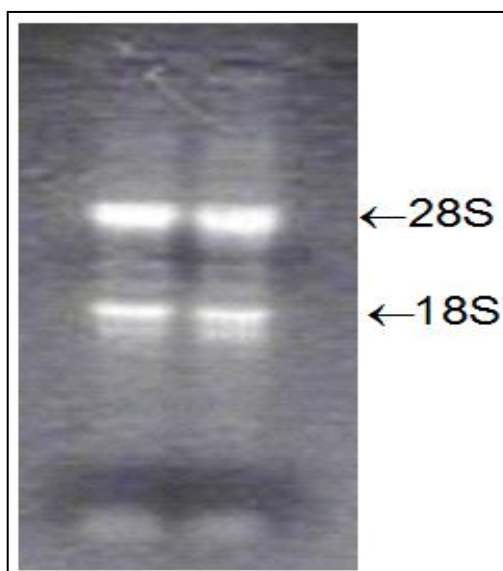
Para a contagem celular foi utilizada a câmara de Neubauer. Este procedimento utilizou-se os 10µL de células (retirados anteriormente) que foram diluídas em 90µL de PBS (diluição de 1:10). A contagem foi realizada utilizando os quatro quadrantes maiores laterais e após este procedimento, o número total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

4.7.2 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 1000 μ L de Trizol (Trizol[®] Reagent – Invitrogen) e 200 μ L 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^oC. Após este período, o sobrenadante de cada tubo foi transferido para outro microtubo de 1,5mL, contendo 500 μ L de isopropanol (Merk) e em seguida homogeneizado manualmente. Este microtubo foi armazenado em refrigerador a -20^oC 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 pellete de RNA no lado e no fundo do tubo, e a este RNA precipitado foi acrescentado 1000 μ L 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 pellete de RNA foi desidratado por evaporação a 37^oC, e diluído em 30 μ L de água DEPC. A análise de qualidade do RNA foi realizada em gel de agarose e formaldeído (Figura 12).

Figura 12 - Corrida eletroforética em gel de agarose com fomaldeído para RNA, evidenciando as bandas de RNAs ribossômicos 28S e 18S.



Neste gel foi avaliada a contaminação por DNA genômico e pôde-se verificar se ocorreu degradação da amostra. No gel deveria 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 deveria ser submetida à re-extração por Trizol.

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.

4.7.3 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). 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, ao término desta incubação, 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 volume final de 30µL.

4.7.4 Quantificação da expressão gênica das citocinas para os perfis de resposta imunológica periférica do tipo Th1, Th2 e Treg

No presente estudo, foi realizada 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 *primers* para as citocinas IFN-γ e TNF-α característica do perfil de resposta imunológica do tipo Th1; *primers* para a citocina IL-4 característica do perfil de resposta imunológica do tipo Th2 e *primers* para as citocinas IL-10 e TGF-β, características do perfil de resposta imunológica para as células T-reg.

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 20 μ L. Após o 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 estava 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 $2^{-\Delta\text{CT}}$, sendo este o valor a ser trabalhado como representante da expressão relativa para cada gene.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O *software* Excel 2010 foi adotado para entrada dos dados, bem como para a confecção das tabelas. A análise estatística e a confecção dos gráficos foi realizada por meio dos *softwares* BioEstat 5.0 e o *GraphPad Prism 5.0*.

Utilizou-se o teste D'Agostino-Pearson para a avaliação da normalidade dos dados. As variáveis apresentadas neste estudo revelaram-se com distribuição não normal o que foi necessário a utilização de testes não paramétrico para a análise estatística deste trabalho.

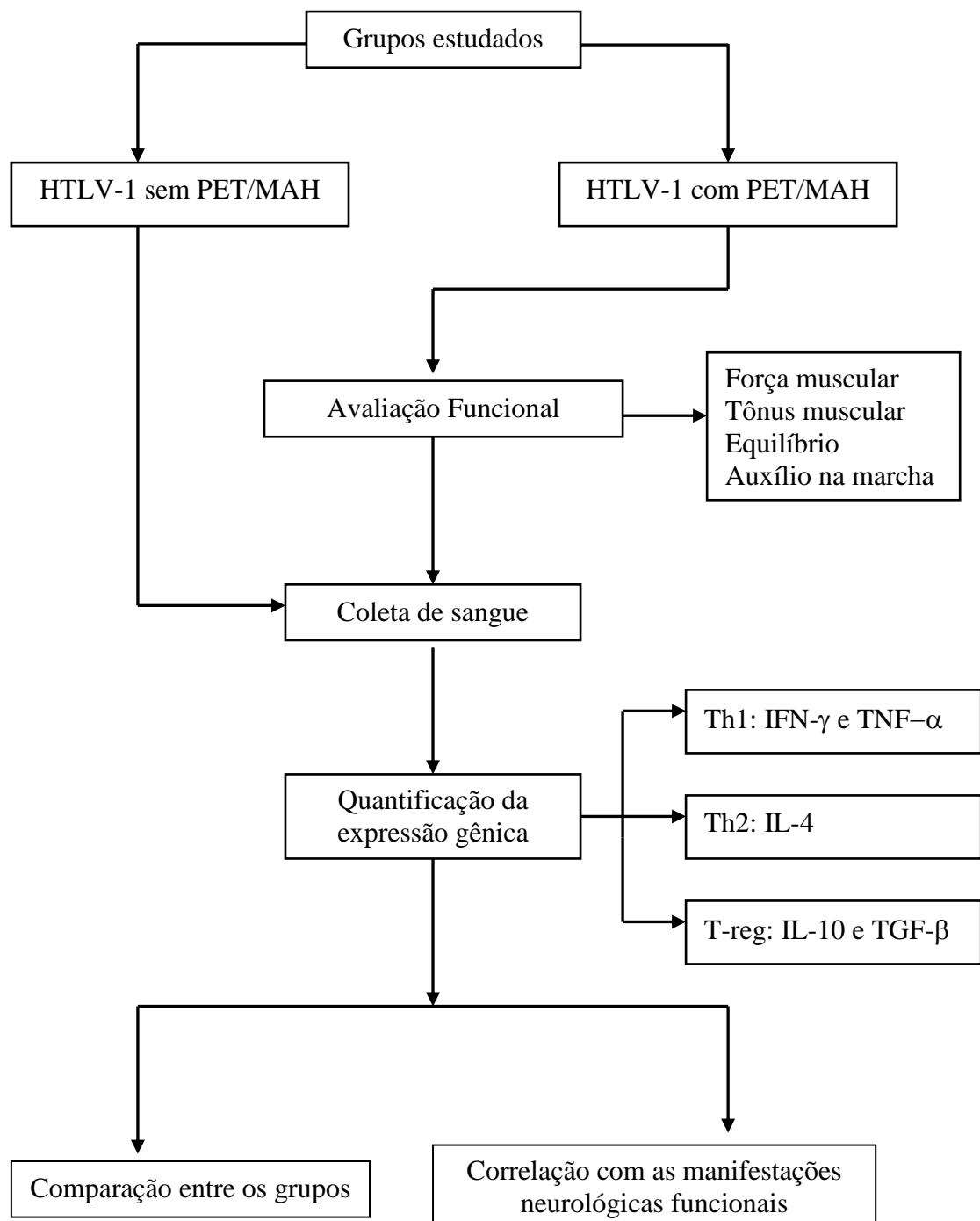
Na análise univariada, as variáveis categóricas foram apresentadas como frequências e as numéricas por meio de medidas de tendência central e dispersão. A significância dos dados foi avaliada pelo teste G (Aderência).

Para a comparação das variáveis numéricas entre dois grupos, foi utilizado o teste de Mann-Whitney e as correlações entre estas variáveis foram avaliadas pelo teste de Correlação de Spearman.

Na análise multivariada, buscando a relação dos perfis de resposta imunológica periférica (Variável independente) e as manifestações clínicas (Variável dependente), foi realizado teste de Regressão Linear Múltipla.

Todos os resultados foram considerados estatisticamente significativos no nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

4.9 FLUXOGRAMA DOS PROCEDIMENTOS REALIZADOS



4.10 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (CEP) do NMT sob parecer número 038/2010-CEP/NMT (Anexo E), 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 C) 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 DESCRIÇÃO DOS PACIENTES

Foram incluídos no estudo 69 indivíduos, classificados de acordo com a sintomatologia neurológica. Diante deste critério, foi dividido em dois grupos com denominação de pacientes HTLV-1 sem PET/MAH e HTLV-1 com PET/MAH.

Dos 69 pacientes com HTLV-1, 43 (62,32%) não apresentavam PET/MAH e 26 (37,68%) foram diagnosticados com PET/MAH. Dentre os HTLV-1 sem PET/MAH, 34 indivíduos (79,07%) era do sexo feminino e 9 (20,93%) do sexo masculino. A média e a mediana de idade nestes indivíduos foram $48,4 \pm 13,4$ anos e 48 anos, respectivamente. Entre os pacientes HTLV-1 com PET/MAH, 17 (65,38%) era do sexo feminino e 9 (34,62%) do sexo masculino, a média e a mediana de idade foram $51,2 \pm 10,05$ anos e 54,5 anos, respectivamente, como mostra a tabela 1.

Não foi observada diferença nas variáveis sexo ($p = 0,33$) e idade ($p = 0,39$) entre os grupos estudados, como mostra a tabela 1. Este resultado demonstra que as amostras são semelhantes para estas variáveis. E diante deste fato, a variável idade não representa um viés de confundimento quando se analisou as variáveis clínicas nos pacientes com PET/MAH.

Tabela 1 – Distribuição demográfica dos pacientes infectados pelo HTLV-1 avaliados no Laboratório de Clínica e Epidemiologia de Doenças Endêmicas do NMT da UFPA no período de Agosto de 2010 a Agosto de 2014, Belém - Pará.

Variáveis	Geral (N=69)		HTLV-1 sem PET/MAH (N=43)		HTLV-1 com PET/MAH (N=26)	
	N	%	N	%	N	%
Sexo						
Masculino	18	26,09%	9	20,93%	9	34,62%
Feminino	51	73,91%	34	79,07%	17	65,38%
P-valor	-		0,33*			
Idade						
Mínimo	18 anos	-	18 anos	-	35 anos	-
Máximo	76 anos	-	76 anos	-	69 anos	-
Mediana	49 anos	-	48 anos	-	54,5 anos	-
Média± DP	$49,5 \pm 12,2$ anos	-	$48,4 \pm 13,4$ anos	-	$51,2 \pm 10,05$ anos	-
P-valor			0,39**			

(-) Dado numérico igual a zero. DP = Desvio Padrão.

*Teste G (Contingência) $p \leq 0,05$.

**Teste ANOVA, $p \leq 0,05$.

5.2 MANIFESTAÇÃO CLÍNICA DOS PACIENTES COM PET/MAH

Dentre os pacientes HTLV-1 com PET/MAH, alguns indivíduos não completaram a avaliação neurológica funcional. Três pacientes não completaram a avaliação da força muscular e um não completou a avaliação do equilíbrio.

Vale a pena ainda ressaltar que todos os pacientes com PET/MAH encontravam-se em tratamento fisioterapêutico durante a coleta dos dados e, também, a sua grande maioria usava medicação no controle da espasticidade como os antiespásticos (Baclofeno).

Em relação às manifestações neurológicas, foram avaliadas variáveis como força muscular, tônus muscular, equilíbrio e grau de auxílio da marcha.

Na análise descritiva da força muscular, dos 23 pacientes avaliados, foi observada que os graus variaram de 2 a 5, tanto nas região proximal quanto na região distal. Conforme mostra a tabela 2, a região proximal apresentou um número expressivo de pacientes com grau 4 na escala de força muscular, significando discreta fraqueza muscular. A fraqueza muscular predominou no membro inferior esquerdo com 11 indivíduos com graduação 4 (Movimento ativo contra resistência), já no membro inferior direito observou-se um número de 8 pacientes com graduação 3 e 4 (Movimento ativo contra a gravidade e movimento ativo contra resistência, respectivamente). Quando se analisou a região distal, ambos os membros apresentaram maior número de pacientes (10 indivíduos) para o grau 5 (grau de força normal).

Tabela 2 – Distribuição do grau de força muscular segundo a escala do *Medical Research Council* nos pacientes com PET/MAH avaliados no Laboratório de Clínica e Epidemiologia de Doenças Endêmicas do NMT da UFPA no período de Agosto de 2010 a Agosto de 2014, Belém - Pará.

Grau	ESCALA DO MEDICAL RESEARCH COUNCIL							
	Poximal Direito		Poximal Esquerdo		Distal Direito		Distal Esquerdo	
	N	%	N	%	N	%	N	%
0	-	-	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-	-	-
2	2	8,70%	1	4,35%	1	4,35%	1	4,35%
3	8	34,78%	7	30,43%	5	21,74%	3	13,04%
4	8	34,78%	11	47,83%	7	30,43%	9	39,13%
5	5	21,74%	4	17,39%	10	43,48%	10	43,48%
Total	23	100%	23	100%	23	100%	23	100%
Mediana	4		4		4		4	
P-valor	0,74				0,78			

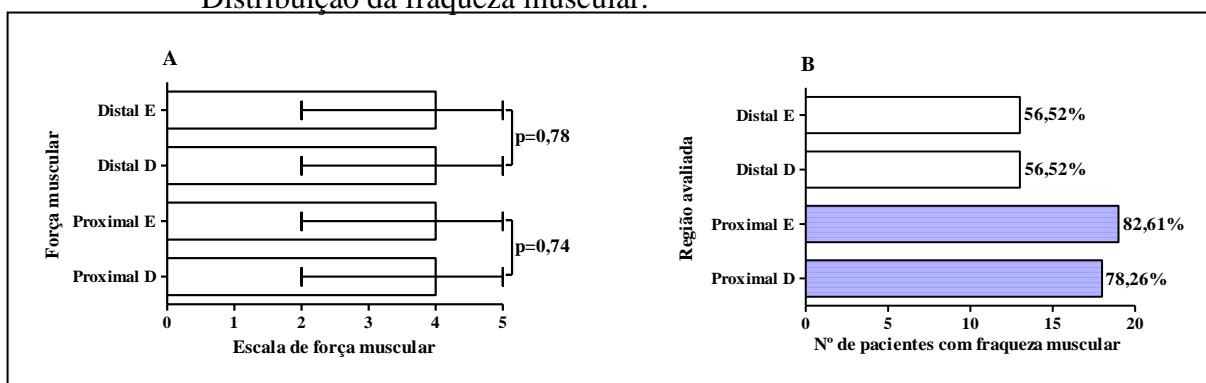
(-) Dado numérico igual a zero.

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

Foi observado também que a variável força muscular apresentou mediana para o grau 4 na escala de força muscular, implicando dizer que estes pacientes apresentam fraqueza muscular nos membros inferiores em ambas as regiões. Porém não existe diferença estatística quando se compara a fraqueza muscular entre os membros, tanto na região proximal quanto na distal ($p=0,74$ e $p=0,78$, respectivamente), conforme mostra o gráfico 13A.

Como foi observada variação dos escores obtidos na avaliação da força muscular, foi realizada nova análise. Aqueles indivíduos que apresentaram graduação de força ≤ 4 foram considerados apresentando fraqueza muscular. A partir desta observação, os pacientes que apresentaram grau de força muscular 5 (força normal) foram excluídos para poder ser realizada análise descritiva da fraqueza muscular, e, assim, verificar a região mais acometida e o membro predominante. A partir desta análise, foi observado que a maioria dos pacientes apresentou fraqueza muscular na região proximal, principalmente no membro inferior esquerdo ($n=19$, 82,61%) quando comparado a região distal ($n=13$, 56,52% em ambos os membros), conforme mostra o gráfico 13B. Isso mostra um acometimento da fraqueza muscular maior na região proximal do que na região distal.

Gráfico 13 – (A) Comparação da força muscular, entre os membros inferiores, para as regiões proximais e distais de acordo com a escala do *Medical Research Council*, $p=0,74$ e $p=0,78$ respectivamente. Teste de Mann-Whitney, $p \leq 0,05$. (B) Distribuição da fraqueza muscular.



Na avaliação do tônus muscular utilizou-se como referência a escala de Ashworth Modificada. Houve diferentes escores obtidos pela escala, variando entre o grau 1 a 3 nos músculos testados. Nem sempre todos os três músculos avaliados foram acometidos pela espasticidade. Alguns pacientes apresentavam acometimento apenas de um músculo enquanto que outros apresentavam acometimento de dois ou dos três músculos avaliados. Diante disso, observou-se que o número de pacientes que não apresentavam aumento do tônus muscular na escala de Ashworth Modificada foi maior para os músculos Flexores Plantares de tornozelo e

menor para os músculos Adutores de Quadril, indicando acometimento maior da espasticidade na região proximal do que na região distal, conforme mostra a tabela 3. Outro fato importante é que nenhum paciente avaliado apresentou grau 4 nesta escala, ou seja, nenhum paciente apresentava grau máximo de espasticidade.

Tabela 3 – Distribuição do grau de espasticidade segundo a escala de Ashworth Modificada nos pacientes com PET/MAH avaliados no Laboratório de Clínica e Epidemiologia de Doenças Endêmicas do NMT da UFPA no período de Agosto de 2010 a Agosto de 2014, Belém - Pará.

Grau	ESCALA DE ASHWORTH MODIFICADA											
	Ad D		Ad E		Qd D		Qd E		FP D		FP E	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
0	3	11,54%	4	15,38%	4	15,38%	4	15,38%	7	26,92%	6	23,08%
1	9	34,62%	7	26,92%	6	23,08%	5	19,23%	5	19,23%	6	23,08%
1+	5	19,23%	5	19,23%	5	19,23%	6	23,08%	3	11,54%	4	15,38%
2	5	19,23%	5	19,23%	6	23,08%	8	30,77%	4	15,38%	4	15,38%
3	4	15,38%	5	19,23%	5	19,23%	3	11,54%	7	26,92%	6	23,08%
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	26	100%	26	100%	26	100%	26	100%	26	100%	26	100%
Mediana	1+		1+		1+		1+		1+		1+	
P-valor	0,85				0,92				0,96			

Ad D – Músculo Adutor direito; Ad E – Músculo Adutor esquerdo; Qd D – Músculo Quadríceps direito; Qd E – Músculo Quadríceps esquerdo; FP D – Músculos Flexores plantares direito; FP E – Músculo Flexores plantares esquerdo.

(-) Dado numérico igual a zero.

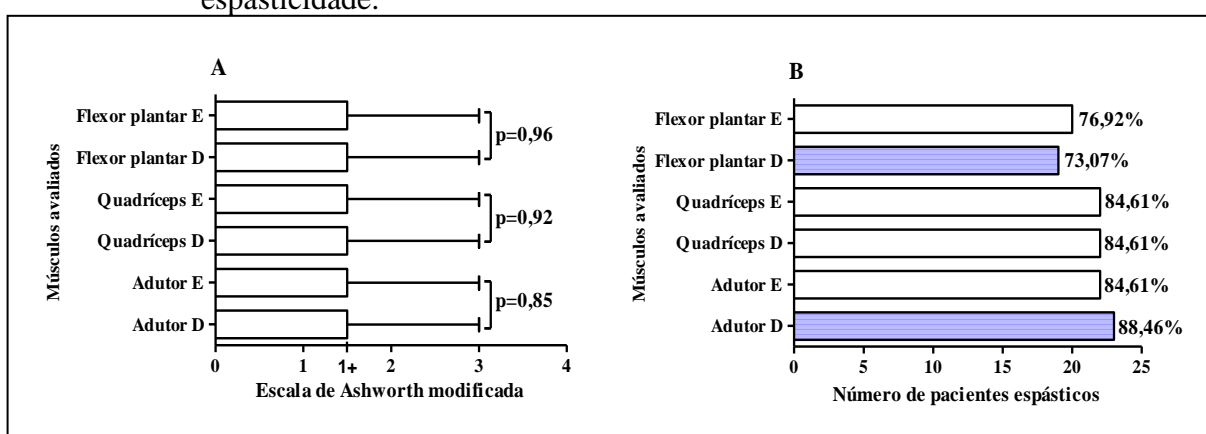
Teste de Mann-Whitney, $p \leq 0,05$.

Nos pacientes HTLV-1 com PET/MAH, todos os músculos avaliados apresentaram mediana para o grau 1+ (leve aumento do tônus muscular), não observando resultados estatisticamente significantes para os músculos Adutores de quadril, Quadríceps femoral e Flexores Plantares de tornozelo, quanto à diferença entre os membros avaliados ($p=0,85$, $p=0,92$ e $p=0,96$, respectivamente) conforme ilustrado no gráfico 14A.

Segundo esta escala de avaliação do tônus muscular, aqueles indivíduos que obtém escore ≥ 1 já apresentam espasticidade. A partir desta observação, os pacientes que apresentaram escore 0 caracterizados como sem aumento do tônus muscular foram excluídos para poder ser realizada nova análise descritiva, e, assim, verificar qual o músculo mais acometido pela espasticidade bem como o membro predominante. A partir desta análise,

pode-se observar que a maioria dos pacientes apresentou espasticidade nos músculos Adutores de quadril direito (n=23, 88,46%) e Adutores de quadril esquerdo (n=22, 84,61%) e uma porcentagem menor para os Flexores Plantares de tornozelo direito (n=19, 73,07%) e esquerdo (n=20, 76,92%). Pode-se inferir através deste resultado, que os pacientes avaliados neste estudo realmente apresentaram espasticidade principalmente na região proximal e diminuição na região distal, conforme mostra o gráfico 14B.

Gráfico 14 – (A) Comparação da espasticidade, entre os membros inferiores, para os músculos adutores de quadril, quadríceps femoral e flexores plantares (p=0,85, p=0,92 e p=0,96). Teste de Mann-Whitney, $p \leq 0,05$. (B) Distribuição da espasticidade.



Outra variável avaliada foi o equilíbrio nestes pacientes. Através da escala de equilíbrio e mobilidade de Tinetti, pode-se observar se o indivíduo apresenta baixo, médio ou alto risco de queda. Dos 26 pacientes incluídos no estudo, apenas em um (01) indivíduo não foi possível concluir esta avaliação. Dentre os 25 pacientes restantes, cinco indivíduos não foram testados, pois estavam confinados a cadeira de rodas tornando inviável a aplicação do teste. Assim, apenas 20 pacientes HTLV-1 com PET/MAH completaram a avaliação do equilíbrio.

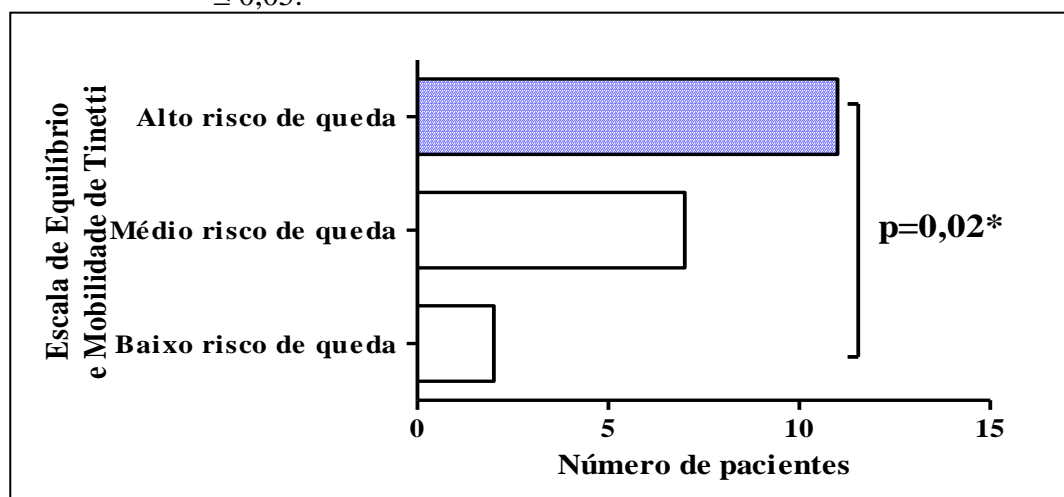
A análise descritiva dos dados mostrou que os pacientes apresentaram mediana para o escore 17, ou seja, os pacientes com PET/MAH apresentaram alto risco de queda, com resultado estatisticamente significativo ($p = 0,02^*$). Dentre os pacientes que completaram a avaliação, 11 pacientes (55%) apresentaram alto risco de queda, sete (07) pacientes (35%) com médio risco de queda e dois (02) pacientes (10%) baixo risco de queda, conforme apresentado na tabela 4 e o gráfico 15.

Tabela 4 – Distribuição do risco de quedas segundo a escala de Equilíbrio e Mobilidade de Tinetti nos pacientes com PET/MAH avaliados no Laboratório de Clínica e Epidemiologia de Doenças Endêmicas do NMT da UFPA no período de Agosto de 2010 a Agosto de 2014, Belém - Pará.

ESCALA DE EQUILÍBRIO E MOBILIDADE DE TINETTI						
Descrição	N	%	Mínimo	Máximo	Mediana	P-valor
Baixo risco de queda (25 a 28 pontos)	2	10%				
Médio risco de queda (19 a 24 pontos)	7	35%				
Alto risco de queda (<19 pontos)	11	55%	6	24	17	0,02*
Total	20	100%				

*Teste estatisticamente significante. Teste G (Aderência), $p \leq 0,05$.

Gráfico 15 - Comparação do equilíbrio e mobilidade nos pacientes HTLV-1 com PET/MAH para o risco de queda, $p=0,02^*$. Teste G (Aderência), $p \leq 0,05$.



Na avaliação do grau de auxílio da marcha, muito dos indivíduos com PET/MAH apresentaram mecanismos que os auxiliavam durante a deambulação. Dos 26 pacientes avaliados neste estudo, sete (07) pacientes (26,92%) deambulavam sem auxílio, três (03) pacientes (11,54%) apresentavam marcha com auxílio de terceiros, nove (09) pacientes (34,62%) necessitavam de bengala ou muleta unilateral, nenhum paciente (0%) apresentou auxílio de muleta bilateral, dois (02) pacientes (7,69%) necessitaram de andador e cinco (05) pacientes (19,23%) necessitavam de cadeira de rodas para se locomover, conforme mostra a tabela 5.

Tabela 5 – Distribuição do grau de auxílio na marcha nos pacientes HTLV-1 com PET/MAH avaliados no Laboratório de Clínica e Epidemiologia de Doenças Endêmicas do NMT da UFPA no período de Agosto de 2010 a Agosto de 2014, Belém - Pará.

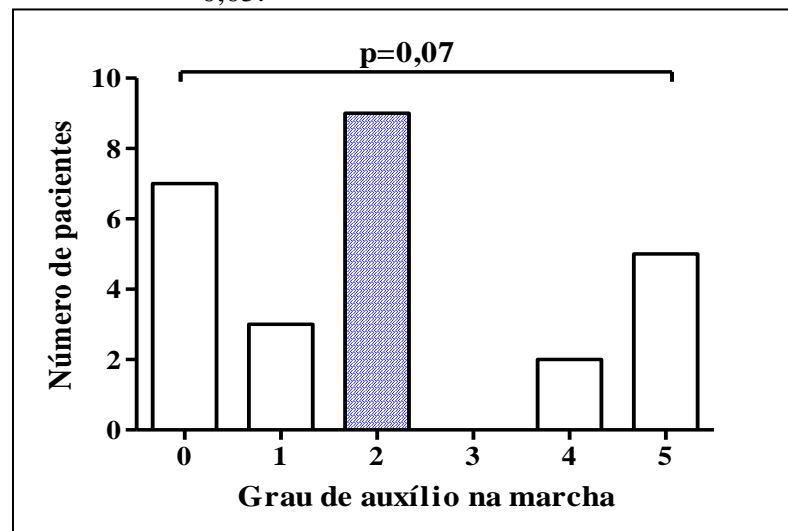
Graduação	GRAU DE AUXÍLIO NA MARCHA					
	N	%	Mínimo	Máximo	Mediana	P-valor
0	7	26,92%				
1	3	11,54%				
2	9	34,62%				
3	-	0%	0	5	2	0,07
4	2	7,69%				
5	5	19,23%				
Total	26	100%				

(-) Dado numérico igual a zero.

Teste G (Aderência), $p \leq 0,05$.

Nos indivíduos HTLV-1 com PET/MAH, de acordo com o grau de auxílio na marcha, os pacientes apresentaram mediana para o grau 2, ou seja, o grau de auxílio predominante foi de bengala ou muleta unilateral com valor de p próximo da significância estatística ($p = 0,07$) conforme mostra o gráfico 16.

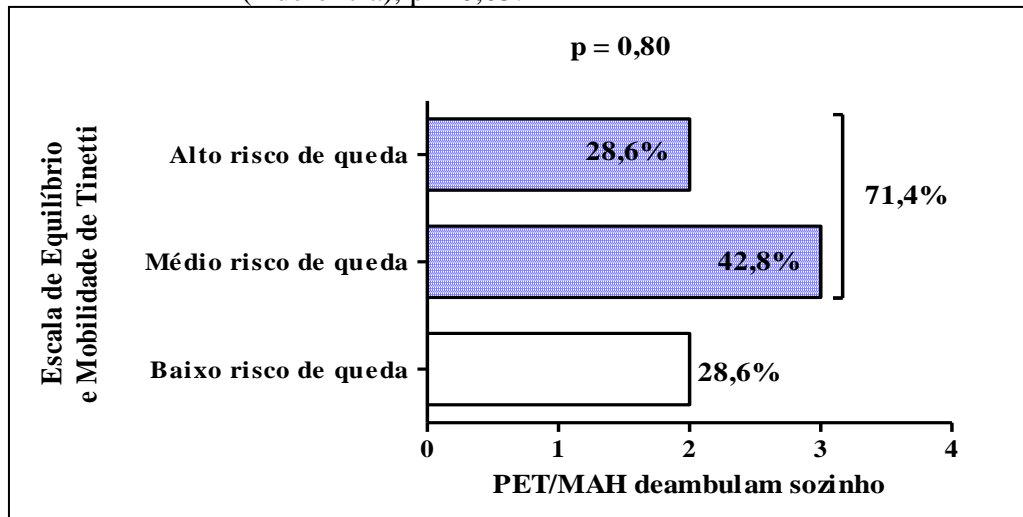
Gráfico 16 – Grau de auxílio na marcha dos pacientes com PET/MAH, $p=0,07$. Teste G (Aderência), $p \leq 0,05$.



Conforme observado na análise descritiva do grau de auxílio da marcha, sete pacientes não apresentavam qualquer tipo de auxílio durante a deambulação. Diante deste fato, avaliou-se o equilíbrio nestes pacientes. Observou-se que 71,4% apresentavam risco consideráveis de

queda, ou seja, 42,8% apresentavam médio risco de queda e 28,6% apresentavam alto risco de queda, conforme mostra o gráfico 17.

Gráfico 17 – Distribuição do grau de risco de queda em indivíduos PET/MAH que deambulavam sem auxílio, $p = 0,80$. Teste G (Aderência), $p \leq 0,05$.

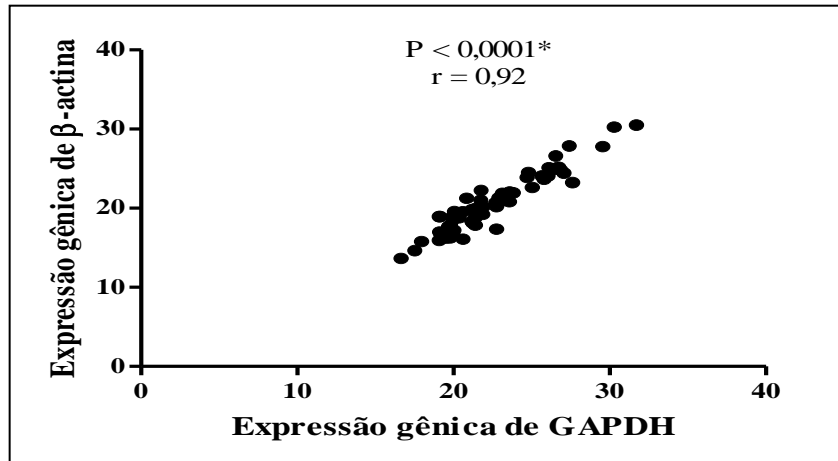


5.3 VALIDAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DA EXPRESSÃO GÊNICA DAS CITOCINAS IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-10 E TGF- β .

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 o gráfico 18, houve forte correlação entre os valores de CT destes dois genes ($r = 0,92$) e com valor de p altamente significativo ($p < 0,0001$), evidenciando valor conjugado de ambos, o que valida o seu comportamento como genes constitutivos nos indivíduos em questão.

Gráfico 18 – Correlação da expressão dos genes constitutivos dos pacientes infectados pelo HTLV-1, de acordo com o CT em escala linear, $r = 0,92$, $p < 0,0001$. Correlação de Spearman, $p \leq 0,05$.



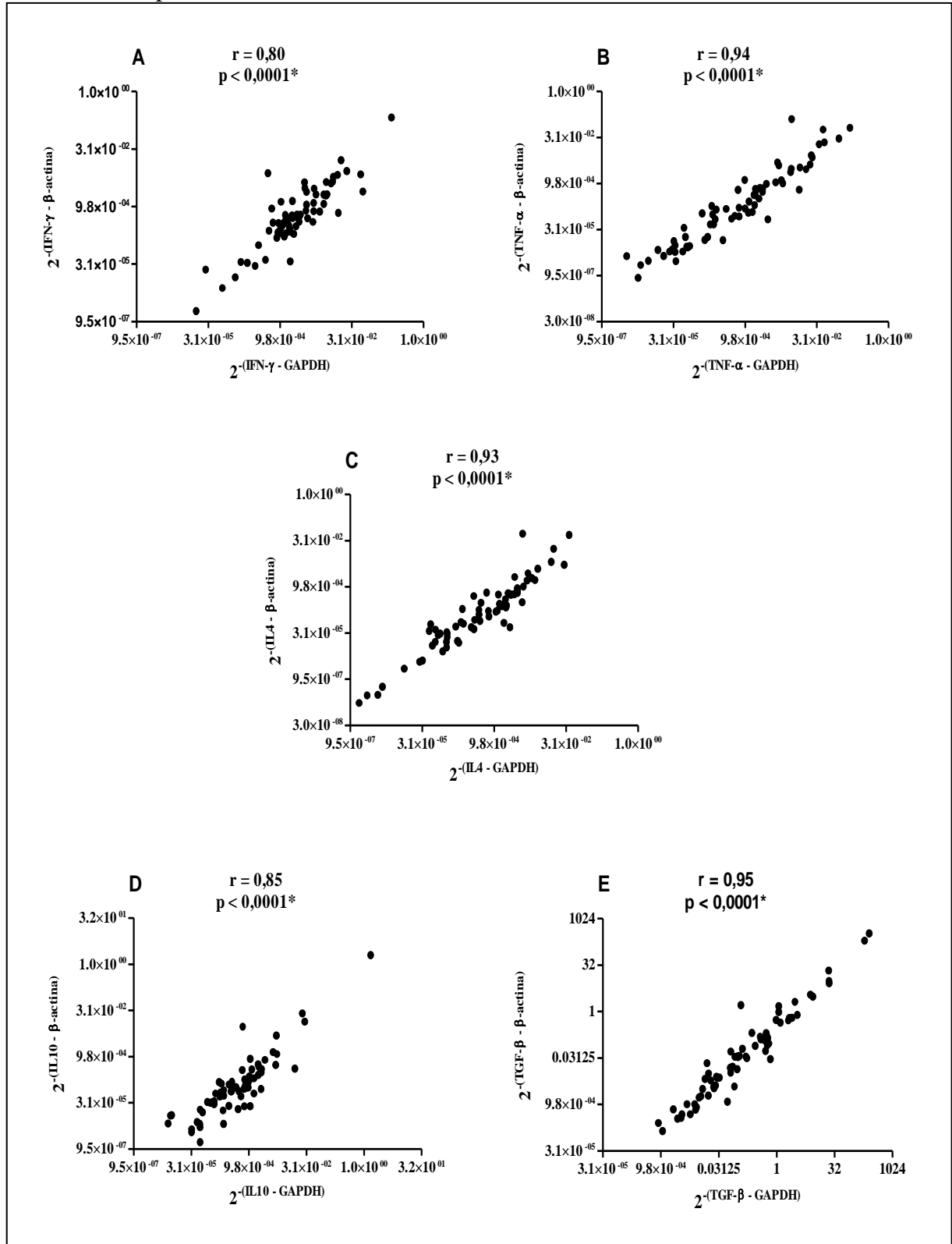
Em seguida foi calculado o $2^{-\Delta CT}$ de cada gene estudado (IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-10 e TGF- β) para todos os pacientes, utilizando os CTs de GAPDH e β -actina. A partir destes resultados, foram realizadas as correlações entre os valores de $2^{-\Delta CT}$ de cada gene, calculados com os diferentes genes constitutivos. Os resultados foram significantes e mostraram boa correlação para os cinco genes estudados, como mostra a tabela 6 e também o gráfico 19. Para os genes TNF- α , IL-4 e TGF- β , observou-se forte correlação ($r = 0,94$, $r = 0,93$ e $r = 0,95$, respectivamente) e para IFN- γ e IL-10 observou-se correlação moderada ($r = 0,80$ e $r = 0,85$, 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 6 – Correlação entre $2^{-\Delta CT}$ dos genes constitutivos, GAPDH e β -actina, e a expressão gênica das citocinas nos pacientes infectados pelo HTLV-1, analisados no Laboratório de Imunopatologia do NMT da UFPA no período de Agosto de 2010 a Agosto de 2014, Belém - Pará.

Citocinas	N	(r) Spearman	(p) valor
IFN- γ	69	0,80	<0,0001*
TNF- α	69	0,94	<0,0001*
IL-4	69	0,93	< 0,0001*
IL-10	69	0,85	< 0,0001*
TGF- β	69	0,95	<0,0001*

*Correlação estatisticamente significante (Correlação de Spearman, $p \leq 0,05$).

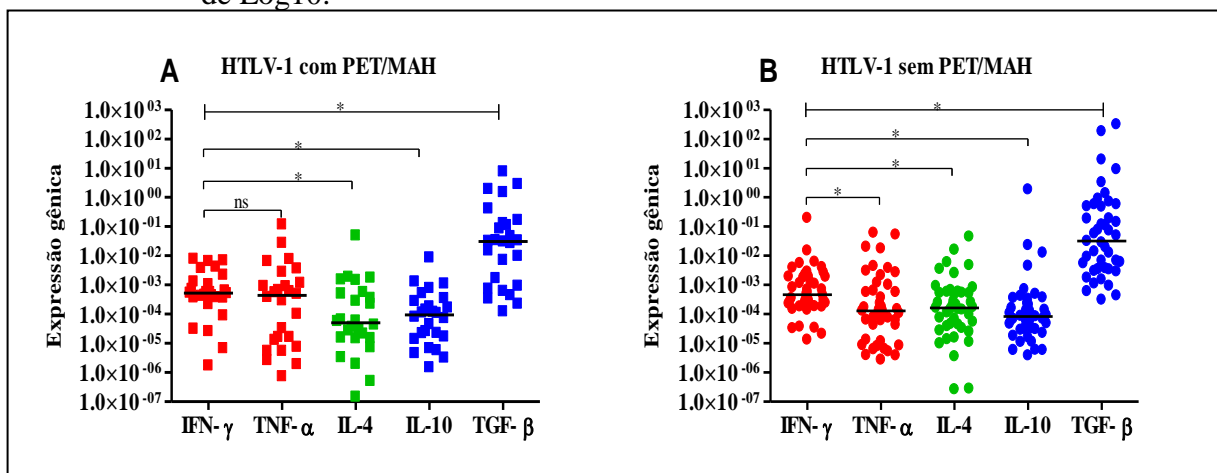
Gráfico 19 – Correlação entre os valores de $2^{-\Delta CT}$ de cada gene das citocinas estudadas segundo os CTs de GAPDH e β -actina, representada em escala Log2. **(A)** Correlação do gene de IFN- γ , $r = 0,80$, $p < 0,0001^*$. **(B)** Correlação do gene de TNF- α , $r = 0,94$, $p < 0,0001^*$. **(C)** Correlação do gene de IL-4, $r = 0,93$, $p < 0,0001^*$. **(D)** Correlação do gene de IL-10, $r = 0,85$, $p < 0,0001^*$. **(E)** Correlação do gene de TGF- β , $r = 0,95$, $p < 0,0001^*$. Correlação de Spearman, $p \leq 0,05$.



5.4 PERFIL CITOCÍNICO DOS PACIENTES INFECTADOS PELO HTLV-1 COM E SEM PET/MAH

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 dos genes estudados, realizando comparações entre os indivíduos HTLV-1 com e sem PET/MAH, como mostra o gráfico 20.

Gráfico 20 – Perfil da expressão relativa dos genes das citocinas estudadas. (A) Pacientes HTLV-1 com PET/MAH e (B) Pacientes HTLV-1 sem PET/MAH em escala de Log10.



*Resultado estatisticamente significativo (Teste de Mann-Whitney, $p \leq 0,05$).
ns (Resultado não significativo).

Comparando a expressão gênica de **IFN- γ** e **TNF- α** nos pacientes estudados, foi observado que no grupo HTLV-1 com PET/MAH as expressões destas citocinas foram equivalentes. Porém, nos pacientes HTLV-1 sem PET/MAH a expressão gênica de IFN- γ foi maior, com resultados significantes ($p = 0,004^*$).

Ao analisar a diferença da expressão gênica entre **IFN- γ** e **IL-4**, foi observado que houve maior expressão de IFN- γ , tanto nos pacientes com PET/MAH ($p = 0,006^*$) como nos pacientes sem PET/MAH ($p = 0,004^*$). Fato semelhante aconteceu na comparação da expressão gênica entre **IFN- γ** e **IL-10**. A expressão gênica de IFN- γ foi maior, em ambos os grupos ($p = 0,001^*$ e $p < 0,0001^*$, respectivamente).

Quando se verificou a expressão gênica entre **IFN- γ** e **TGF- β** , tanto no grupo HTLV-1 com PET/MAH quanto no grupo HTLV-1 sem PET/MAH houve predomínio de expressão gênica de TGF- β , com resultados estatisticamente significantes ($p < 0,0001^*$, em ambos os grupos).

Analisando a diferença da expressão gênica entre **TNF- α** e **IL-4** nos grupos estudados, mesmo sem significância estatística, foi observado que nos indivíduos HTLV-1 com PET/MAH a expressão de TNF- α foi maior ($p = 0,260$). Porém, nos indivíduos HTLV-1 sem PET/MAH os níveis de expressão gênica de TNF- α foi ligeiramente menor ($p = 0,736$).

Em relação à expressão gênica entre **TNF- α** e **IL-10** foi observado que mesmo sem resultados significantes, tanto nos pacientes HTLV-1 com PET/MAH com nos indivíduos HTLV-1 sem PET/MAH, a expressão gênica de TNF- α foi maior ($p = 0,237$ e $p = 0,359$, respectivamente).

Comparando a expressão gênica entre **TNF- α** e **TGF- β** , em ambos os grupos estudados houve predomínio de expressão gênica de TGF- β , com resultados estatisticamente significantes ($p < 0,0001^*$, em ambos os grupos).

Na análise comparativa entre a expressão de **IL-4** e **IL-10**, mesmo sem resultados significantes, foi observado que a expressão de IL-4 foi menor em pacientes HTLV-1 com PET/MAH ($p = 0,963$). No entanto, foi observado padrão de expressão inverso nos pacientes HTLV-1 sem PET/MAH. A expressão de IL-4 apresentou-se ligeiramente maior ($p = 0,132$).

Em relação à expressão gênica entre **IL-4** e **TGF- β** , foi observado que em ambos os grupos os níveis de expressão de TGF- β se mantiveram elevados em relação à expressão de IL-4, com resultados estatisticamente significantes ($p < 0,0001^*$, em ambos os grupos). Fato semelhante ocorreu entre as expressões de **IL-10** e **TGF- β** , os níveis de expressão gênica de TGF- β mantiveram-se elevados em ambos os grupos com resultados significantes ($p < 0,0001^*$, em ambos os grupos).

A comparação da expressão gênica das citocinas estudadas nos pacientes HTLV-1 com PET/MAH e sem PET/MAH apresentaram-se, na sua grande maioria de forma semelhante, porém houve situações de expressões gênicas que chamaram atenção. Nos pacientes HTLV-1 com PET/MAH a expressão do TNF- α se mostrou elevado, equiparando-se a expressão de IFN- γ . E a expressão de IL-4 se mostrou com expressão diminuída quando comparada ao grupo HTLV-1 sem PET/MAH, conforme pode ser observado inicialmente pelo gráfico 20 e ilustrado na tabela 7.

Tabela 7 – Análise comparativa da expressão gênica relativa das citocinas estudadas nos pacientes HTLV-1 com PET/MAH e HTLV-1 sem PET/MAH, analisados no Laboratório de Imunopatologia do NMT da UFPA no período de Agosto de 2010 a Agosto de 2014, Belém - Pará.

Citocinas	HTLV-1 com PET/MAH		HTLV-1 sem PET/MAH	
	Mediana (10^{-4})	(p) valor	Mediana (10^{-4})	(p) valor
IFN- γ x TNF- α	5,2 x 4,4	0,415	4,6 x 1,2	0,004*
IFN- γ x IL-4	5,2 x 0,5	0,006*	4,6 x 1,6	0,004*
IFN- γ x IL-10	5,2 x 0,9	0,001*	4,6 x 0,8	< 0,0001*
IFN- γ x TGF- β	5,2 x 310,6	< 0,0001*	4,6 x 319,0	< 0,0001*
TNF- α x IL-4	4,4 x 0,5	0,260	1,2 x 1,6	0,736
TNF- α x IL-10	4,4 x 0,9	0,237	1,2 x 0,8	0,359
TNF- α x TGF- β	4,4 x 310,6	< 0,0001*	1,2 x 319,0	< 0,0001*
IL-4 x IL-10	0,5 x 0,9	0,936	1,6 x 0,8	0,132
IL-4 x TGF- β	0,5 x 310,6	< 0,0001*	1,6 x 319,0	< 0,0001*
IL-10 x TGF- β	0,9 x 310,6	< 0,0001*	0,8 x 319,0	< 0,0001*

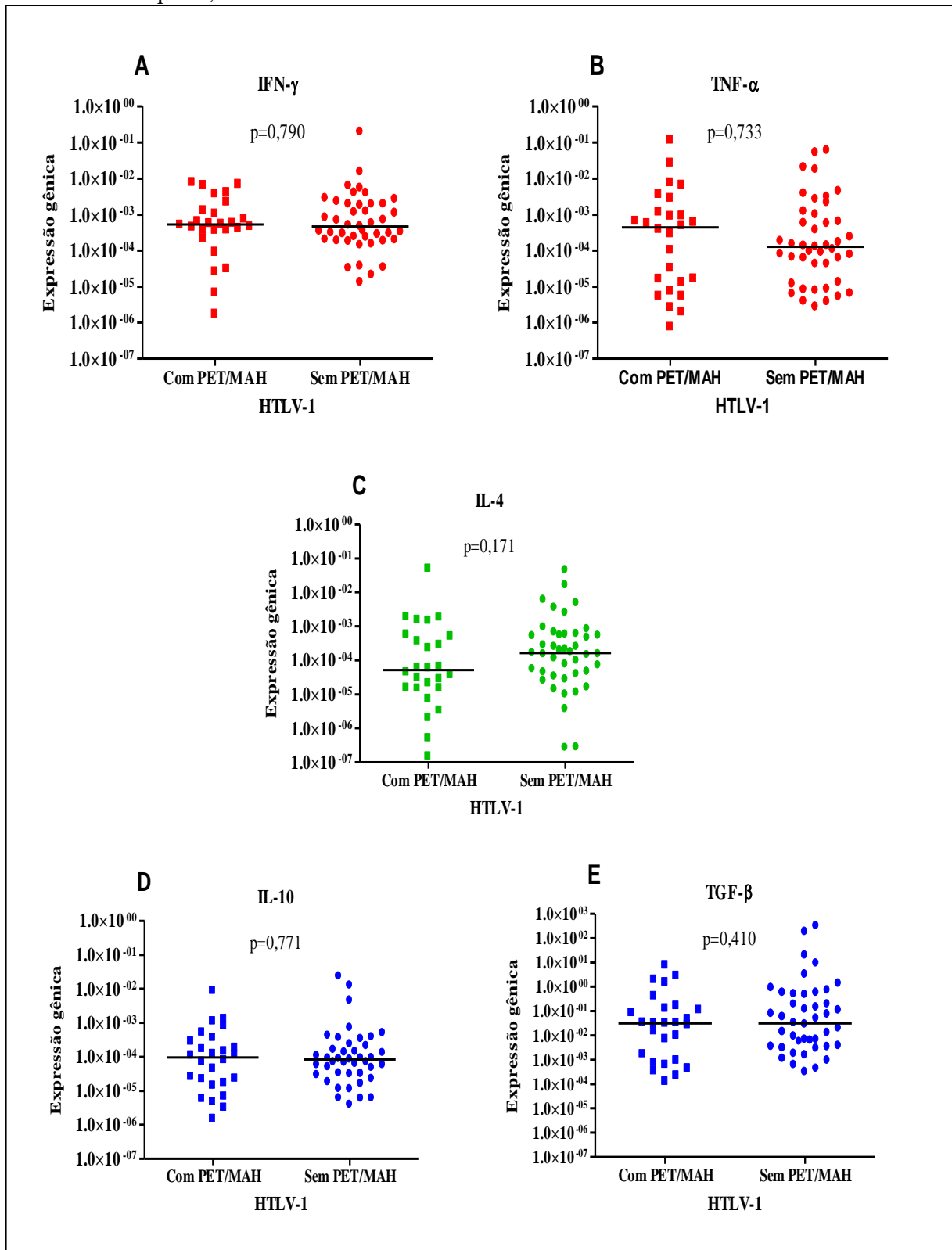
*Diferença estatisticamente significativa (Mann-Whitney, $p \leq 0,05$).

5.5 ANÁLISE COMPARATIVA DO PERFIL CITOCÍNICO ENTRE OS PACIENTES HTLV-1 COM PET/MAH E SEM PET/MAH

Visto que os pacientes que desenvolveram PET/MAH e os que não a desenvolveram apresentaram perfil semelhante de expressão gênica, exceto para a expressão do TNF- α , a próxima análise foi comparar a expressão de cada citocina entre os dois grupos propostos pela pesquisa.

Mesmo sem resultados significantes, a comparação da expressão gênica de IFN- γ entre os grupos estudados mostrou níveis de expressão semelhantes. Para o TNF- α , nos pacientes HTLV-1 com PET/MAH, a expressão foi maior. Para a IL-4, a expressão foi menor nos pacientes HTLV-1 com PET/MAH. Na expressão de IL-10, em ambos os grupos, os níveis de expressão foram equivalentes. E por fim, a expressão de TGF- β , apresentou discreto aumento de expressão nos pacientes HTLV-1 sem PET/MAH, conforme mostra o gráfico 21.

Gráfico 21 – Diferença de expressão gênica relativa das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-10 e TGF- β nos pacientes HTLV-1 com e sem PET/MAH em escala de Log10. **(A)** Diferença de expressão gênica de IFN- γ ($p = 0,790$). **(B)** Diferença de expressão gênica de TNF- α ($p = 0,733$). **(C)** Diferença de expressão gênica de IL-4 ($p = 0,171$). **(D)** Diferença de expressão gênica de IL-10 ($p = 0,771$). **(E)** Diferença de expressão gênica de TGF- β ($p = 0,410$). Teste de Mann-Whitney, $p \leq 0,05$.



5.6 CORRELAÇÃO DA EXPRESSÃO CITOCÍNICA NOS PACIENTES HTLV-1 COM E SEM PET/MAH

Uma vez realizada comparação das citocinas estudadas, outro passo foi realizar a correlação do perfil citocínico nos pacientes HTLV-1 com e sem PET/MAH, visto que estas citocinas são antagônicas entre si. Esta análise foi realizada para verificar um possível padrão de inversão dos perfis citocínicos.

Em relação à expressão entre **IFN- γ** e **TNF- α** , em ambos os grupos, não houve correlação da expressão gênica entre as citocinas ($p = 0,515$ e $p = 0,56$). No que diz respeito à expressão gênica entre **IFN- γ** e **IL-4**, nos pacientes HTLV-1 com e sem PET/MAH, houve correlação positiva ($p = 0,003^*$, em ambos os grupos). Ao se analisar a expressão gênica entre **IFN- γ** e **IL-10**, nos grupos estudados, foi observado que nos pacientes com PET/MAH não houve correlação ($r = 0,3$ e $p = 0,08$), porém nos pacientes HTLV-1 sem PET/MAH foi observada correlação positiva estatisticamente significativa ($r = 0,3$ e $p = 0,02^*$). E a expressão gênica entre **IFN- γ** e **TGF- β** , mostrou-se correlação positiva moderada tanto em HTLV-1 com PET/MAH quanto em sem PET/MAH ($r = 0,7$; $p < 0,0001^*$ e $r = 0,6$ e $p < 0,0001^*$, respectivamente), conforme mostra a tabela 8.

Na análise da expressão entre **TNF- α** e **IL-4**, não houve correlação da expressão gênica nos pacientes HTLV-1 com PET/MAH ($r = 0,2$ e $p = 0,172$). Já nos indivíduos HTLV-1 sem PET/MAH houve correlação positiva fraca ($r = 0,4$ e $p = 0,0006^*$). Na expressão gênica entre **TNF- α** e **IL-10** não houve correlação entre as citocinas nos pacientes HTLV-1 com PET/MAH ($r = 0,3$ e $p = 0,08$). Porém, em comparação aos indivíduos HTLV-1 sem PET/MAH foi observada correlação positiva fraca ($r = 0,4$ e $p = 0,006^*$) entre estas citocinas. E em relação à expressão gênica entre **TNF- α** e **TGF- β** não foi observada correlação da expressão gênica em ambos os grupos ($r = 0,3$; $p = 0,07$ e $r = 0,0$ e $p = 0,92$), conforme mostra a tabela 8.

Na análise da expressão gênica entre **IL-4** e **IL-10**, nos pacientes HTLV-1 com PET/MAH não houve correlação entre estas citocinas ($r = 0,3$ e $p = 0,06$). Já nos pacientes HTLV-1 sem PET/MAH observou-se correlação positiva moderada ($r = 0,6$ e $p < 0,0001^*$) e ao se analisar a expressão gênica entre **IL-4** e **TGF- β** , em ambos os grupos, houve correlação da expressão entre as citocinas estudadas. No grupo HTLV-1 com PET/MAH a correlação foi moderada ($r = 0,6$ e $p = 0,001^*$) e no grupo HTLV-1 sem PET/MAH a correlação foi fraca ($r = 0,4$ e $p = 0,004^*$), conforme mostra a tabela 8.

Por fim, na análise da expressão gênica entre **IL-10** e **TGF- β** , nos pacientes HTLV-1 com e sem PET/MAH, não houve correlação entre estas citocinas ($r = 0,1$; $p = 0,358$ e $r = 2$ e $p = 0,12$), como mostra a tabela 8.

Tabela 8 – Correlação da expressão relativa dos genes estudados nos grupos de pacientes HTLV-1 com PET/MAH e HTLV-1 sem PET/MAH, analisados no Laboratório de Imunopatologia do NMT da UFPA no período de Agosto de 2010 a Agosto de 2014, Belém - Pará.

Correlação entre as citocinas	HTLV-1 com PET/MAH		HTLV-1 sem PET/MAH	
	R	(p) valor	r	(p) valor
IFN- γ x TNF- α	0,1	0,515	0,0	0,56
IFN- γ x IL-4	0,5	0,003*	0,4	0,003*
IFN- γ x IL-10	0,3	0,082	0,3	0,02*
IFN- γ x TGF- β	0,7	< 0,0001*	0,6	< 0,0001*
TNF- α x IL-4	0,2	0,172	0,4	0,0006*
TNF- α x IL-10	0,3	0,086	0,4	0,006*
TNF- α x TGF- β	0,3	0,079	0,0	0,92
IL-4 x IL-10	0,3	0,063	0,6	<0,0001*
IL-4 x TGF- β	0,6	0,001*	0,4	0,004*
IL-10 x TGF- β	0,1	0,358	0,2	0,12

*Correlação estatisticamente significante (Correlação de Spearman, $p \leq 0,05$).

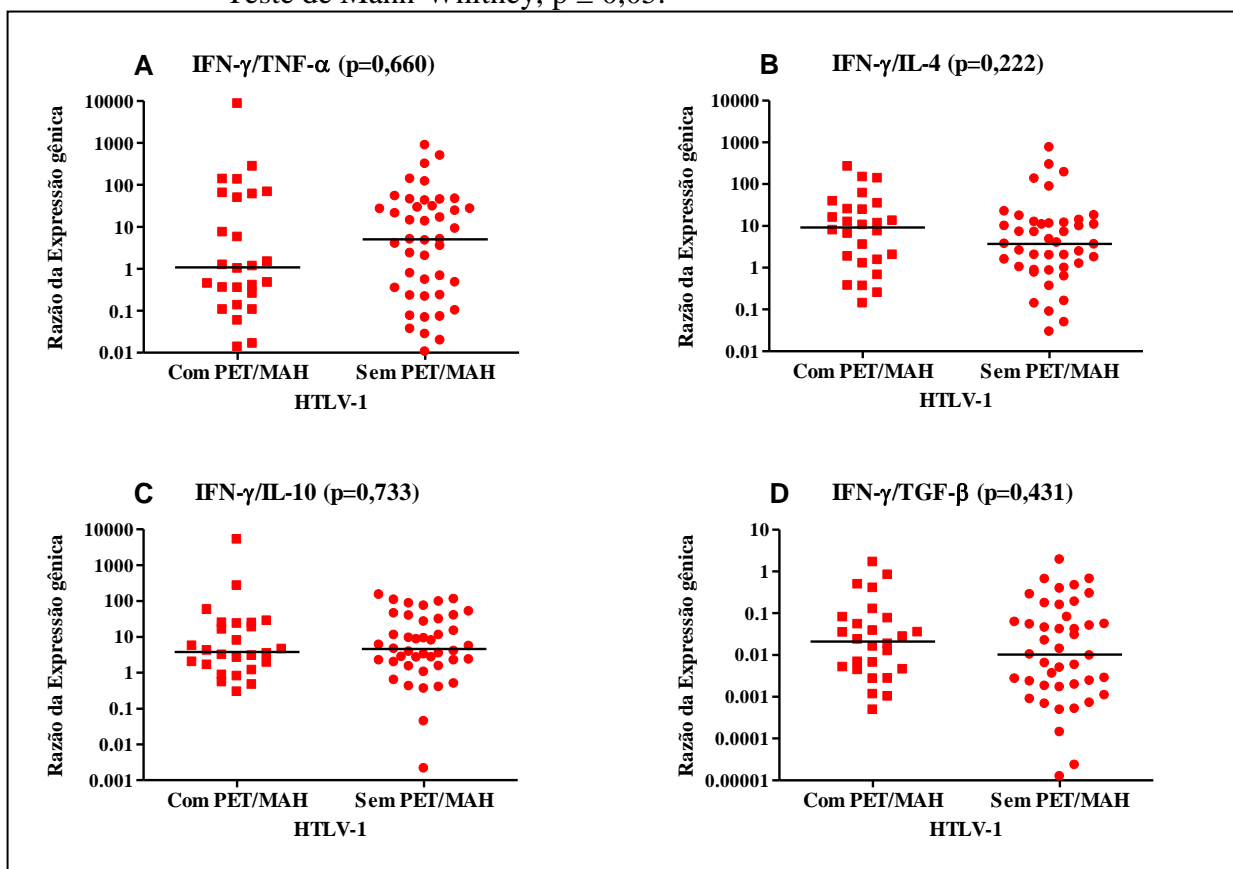
5.7 RAZÃO ENTRE OS PERFIS DE RESPOSTA IMUNOLÓGICA

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 HTLV-1 com e sem PET/MAH. Mesmo não apresentando significância estatística, os resultados obtidos nesta análise foram interessantes, principalmente no que diz respeito à predominância da expressão gênica de um perfil citocínico sobre o outro.

Ao se analisar a predominância de expressão gênica do perfil Th1 (**IFN- γ**), foi observada que a razão entre as citocinas **IFN- γ /TNF- α** , foi quatro vezes maior nos pacientes sem PET/MAH (Mediana: 5,057) quando comparado aos pacientes HTLV-1 com PET/MAH (Mediana: 1,084). A razão da expressão entre **IFN- γ /IL-4**, foi duas vezes maior nos pacientes

com PET/MAH (Mediana: 9,184) em relação aos sem PET/MAH (Mediana: 3,681). A razão da expressão entre **IFN- γ /IL-10**, foi uma vez maior nos pacientes sem PET/MAH (Mediana: 4,666) do que nos HTLV-1 com PET/MAH (Mediana: 3,794). E a razão da expressão entre **IFN- γ /TGF- β** , foi duas vezes maior nos pacientes com PET/MAH (Mediana: 0,021) do que nos pacientes HTLV-1 sem PET/MAH (Mediana: 0,010), conforme mostra o gráfico 22.

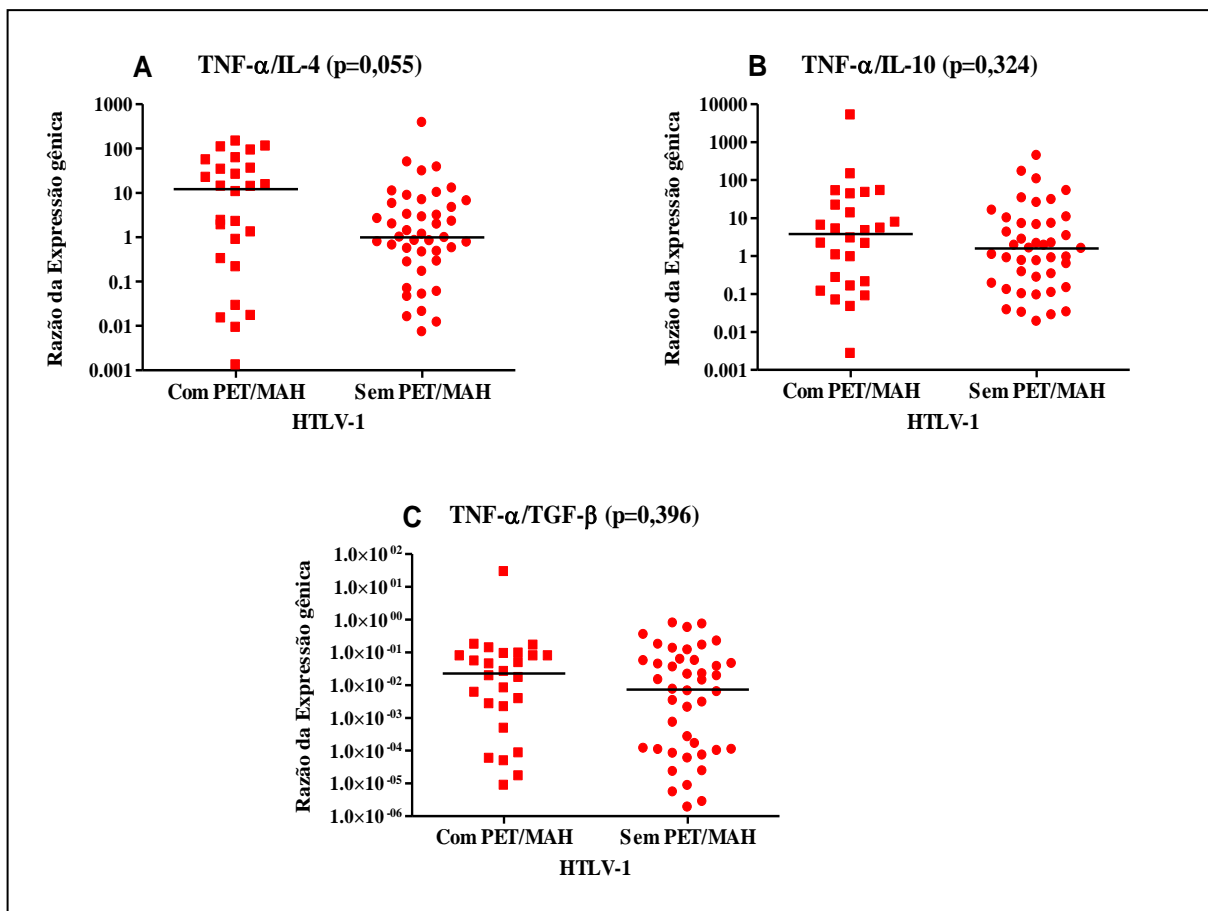
Gráfico 22 – Diferença na expressão gênica relativa entre as razões das citocinas nos indivíduos HTLV-1 com e sem PET/MAH em escala de Log₁₀. **(A)** Razão de IFN- γ /TNF- α ($p = 0,660$). **(B)** Razão de IFN- γ /IL-4 ($p = 0,222$). **(C)** Razão de IL-4/IL-10 ($p = 0,733$). **(D)** Razão de IFN- γ /TGF- β ($p = 0,431$). Teste de Mann-Whitney, $p \leq 0,05$.



Analisando ainda a predominância de expressão gênica do perfil Th1 agora com outra citocina (**TNF- α**), foi observada razão de expressão gênica maiores para o grupo de indivíduos HTLV-1 com PET/MAH. A razão entre **TNF- α /IL-4** apresentou-se doze vezes mais expresso nos pacientes com PET/MAH (Mediana: 12,26) quando comparado aos pacientes sem PET/MAH (Mediana: 0,99). A razão entre **TNF- α /IL-10** apresentou-se duas vezes mais expresso nos pacientes com PET/MAH (Mediana: 3,796) em relação aos sem

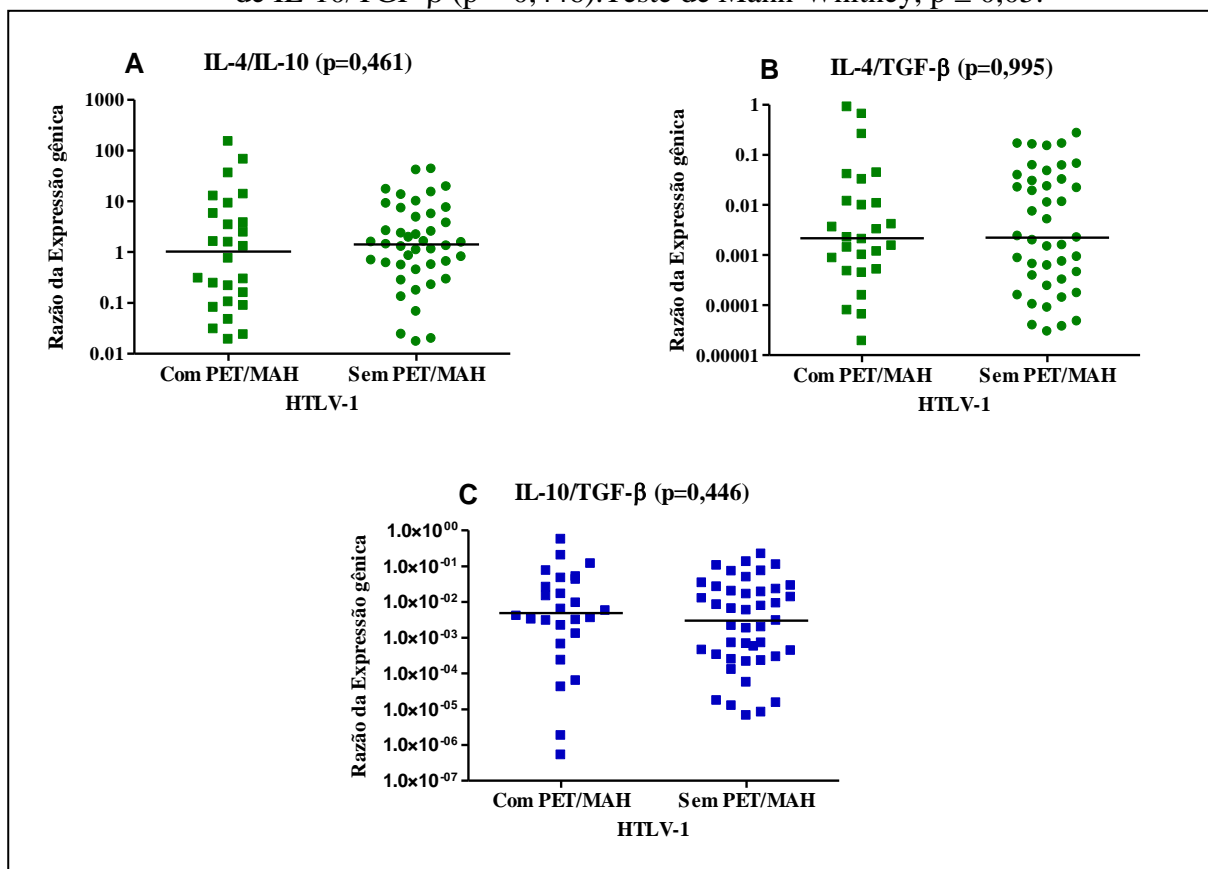
PET/MAH (Mediana: 1,585). E a razão entre **TNF- α /TGF- β** foi três vezes mais expressa em HTLV-1 com PET/MAH (Mediana: 0,022) quando comparado ao grupo HTLV-1 sem PET/MAH (Mediana: 0,007), conforme mostra o gráfico 23.

Gráfico 23 – Diferença na expressão gênica relativa entre as razões das citocinas nos indivíduos HTLV-1 com e sem PET/MAH em escala de Log10. **(A)** Razão de TNF- α /IL-4 ($p = 0,055$). **(B)** Razão de TNF- α /IL-10 ($p = 0,324$). **(C)** Razão de TNF- α /TGF- β ($p = 0,396$). Teste de Mann-Whitney, $p \leq 0,05$.



Analisando a predominância de expressão gênica do perfil Th2 (**IL-4**), foi observada que a razão entre as citocinas **IL-4/IL-10**, foi uma vez mais expressa nos pacientes sem PET/MAH (Mediana: 1,414) do que nos pacientes com PET/MAH (Mediana: 1,022). Já a razão de expressão entre **IL-4/TGF- β** , a razão se manteve igual em ambos os grupos (Mediana: 0,002). Analisando a razão de expressão gênica do perfil Treg (**IL-10/TGF- β**), observou-se razão uma vez mais expressa nos pacientes com PET/MAH (Mediana: 0,004) quando comparado aos pacientes HTLV-1 sem PET/MAH (Mediana: 0,003), conforme mostra o gráfico 24.

Gráfico 24 – Diferença na expressão gênica relativa entre as razões das citocinas nos indivíduos HTLV-1 com e sem PET/MAH em escala de Log10. **(A)** Razão de IL-4/IL-10 ($p = 0,461$). **(B)** Razão de IL-4/ TGF- β ($p = 0,995$). **(C)** Razão de IL-10/TGF- β ($p = 0,446$). Teste de Mann-Whitney, $p \leq 0,05$.



5.8 CORRELAÇÃO DOS PERFIS DE RESPOSTA IMUNOLÓGICA PERIFÉRICA E OS SINAIS CLÍNICOS DOS PACIENTES COM PET/MAH

Para realizar as correlações dos dados clínicos com os dados imunológicos da expressão gênica das citocinas estudadas, foi realizada a regressão linear múltipla buscando a associação dessas variáveis.

Primeiramente foi realizada a correlação de cada dado clínico com todas as citocinas estudadas. Posteriormente estas mesmas citocinas foram estratificadas de acordo com o perfil citocínico estudado. Estes perfis citocínicos foram divididos em dois grupos: perfil citocínico inflamatório (IFN- γ , TNF- α e IL-4) e o perfil citocínico antiinflamatório (IL-10 e TGF- β).

Foi observado que não houve associação entre as citocinas estudadas e o grau de força muscular de acordo com a escala do *Medical Research Council*, mesmo quando estratificada por perfil citocínico, conforme mostram as tabelas 9 e 10.

Tabela 9 - Regressão linear múltipla das citocinas estudadas relacionadas com a escala do *Medical Research Council*, nos pacientes HTLV-1 com PET/MAH (n=23), analisados no Laboratório de Imunopatologia do NMT da UFPA no período de Agosto de 2010 a Agosto de 2014, Belém - Pará.

VARIÁVEIS	VARIÁVEIS INDEPENDENTES										MODELO DE REGRESSÃO
	Citocinas										
	IFN- γ		TNF- α		IL-4		IL-10		TGF- β		
	t	p	t	p	t	p	t	p	t	p	
FP D	-0,55	0,58	0,44	0,66	0,60	0,55	-1,02	0,31	-0,20	0,84	F=0,3709;p=0,86
FP E	-0,55	0,58	0,36	0,72	0,28	0,78	-0,53	0,59	-0,31	0,75	F=0,2777;p=0,91
FD D	-1,06	0,29	0,65	0,52	0,21	0,83	-0,71	0,48	0,40	0,69	F=0,3744;p=0,85
FD E	-1,03	0,31	0,49	0,62	-0,63	0,53	0,51	0,61	0,39	0,69	F=0,3618;p=0,86

FP D: Força proximal direita; FP E: Força proximal esquerda; FD D: Força distal direita; FD E: Força distal esquerda.

F (Regressão); t (Coeficiente de regressão); Teste de Regressão Linear Múltipla ($p \leq 0,05$).

Tabela 10 - Regressão linear múltipla dos perfis citocínicos relacionado com a escala do *Medical Research Council*, nos pacientes HTLV-1 com PET/MAH (n=23), analisados no Laboratório de Imunopatologia do NMT da UFPA no período de Agosto de 2010 a Agosto de 2014, Belém - Pará.

VARIÁVEIS DEPENDENTES	VARIÁVEIS INDEPENDENTES						MODELO DE REGRESSÃO
	Citocinas inflamatórias						
	IFN- γ		TNF- α		IL-4		
	t	p	t	p	t	p	
FP D	-0,7987	0,43	0,3769	0,71	-0,1764	0,86	F = 0,2800 ; p = 0,84
FP E	-0,9983	0,33	0,3678	0,71	-0,1508	0,88	F = 0,3795 ; p = 0,77
FD D	-0,9919	0,33	0,5526	0,58	-0,4151	0,68	F = 0,3948 ; p = 0,76
FD E	-1,1674	0,25	0,5284	0,60	-0,3907	0,83	F = 0,5228 ; p = 0,70
Citocinas antiinflamatórias							
	IL-10		TGF- β				
	t	p	t	p			
FP D	0,2171	0,83	-0,5720	0,57	F = 0,1794 ; p = 0,83		
FP E	0,2763	0,78	-0,8627	0,39	F = 0,3956 ; p = 0,68		
FD D	-0,2001	0,84	-0,2849	0,77	F = 0,0649 ; p = 0,93		
FD E	-0,0540	0,95	-0,5539	0,58	F = 0,1577 ; p = 0,85		

FP D: Força proximal direita; FP E: Força proximal esquerda; FD D: Força distal direita; FD E: Força distal esquerda.

F (Regressão); t (Coeficiente de regressão); Teste de Regressão Linear Múltipla ($p \leq 0,05$).

Também não foi observado associação entre as citocinas estudadas e a escala de Ashworth Modificada, mesmo quando estratificada por perfil citocínico, conforme mostram as tabelas 11 e 12.

Tabela 11 - Regressão linear múltipla das citocinas estudadas relacionadas com a escala de Ashworth Modificada, nos pacientes HTLV-1 com PET/MAH (n=26), analisados no Laboratório de Imunopatologia do NMT da UFPA no período de Agosto de 2010 a Agosto de 2014, Belém - Pará.

VARIÁVEIS	VARIÁVEIS INDEPENDENTES										MODELO DE REGRESSÃO
	Citocinas										
	IFN- γ		TNF- α		IL-4		IL-10		TGF- β		
	t	p	t	p	t	p	t	p	t	p	
Ad D	0,71	0,48	0,03	0,97	-1,92	0,06	2,26	0,03	-0,38	0,70	F=1,2625;p=0,31
Ad E	0,90	0,37	0,02	0,97	-1,19	0,24	1,31	0,20	-0,83	0,41	F=0,6882;p=0,63
Qd D	-0,25	0,79	-0,48	0,63	-1,01	0,32	1,67	0,10	-0,28	0,78	F=0,7904;p=0,57
Qd E	0,66	0,51	-0,47	0,63	-0,38	0,70	0,76	0,45	-0,81	0,42	F=0,3993;p=0,84
FP D	0,75	0,46	-0,88	0,38	-0,69	0,49	1,36	0,18	-0,40	0,68	F=0,9572;p=0,53
FP E	1,55	0,13	-0,20	0,83	-0,64	0,52	0,58	0,56	-0,89	0,38	F=0,9480;p=0,67

Ad D e E: Músculos adutores de quadril direito e esquerdo; Qd D e E: Músculo quadríceps direito e esquerdo; FP D e E: Músculos flexores plantares direito e esquerdo.

F (Regressão); t (Coeficiente de regressão); Teste de Regressão Linear Múltipla ($p \leq 0,05$).

Tabela 12 - Regressão linear múltipla dos perfis citocínicos relacionado com a escala de Ashworth Modificada, nos pacientes HTLV-1 com PET/MAH (n=26), analisados no Laboratório de Imunopatologia do NMT da UFPA no período de Agosto de 2010 a Agosto de 2014, Belém - Pará.

VARIÁVEIS DEPENDENTES	VARIÁVEIS INDEPENDENTES						MODELO DE REGRESSÃO
	Citocinas inflamatórias						
	IFN- γ		TNF- α		IL-4		
	t	p	t	p	t	p	
Ad D	0,3704	0,71	0,3130	0,75	-0,4626	0,64	F = 0,1805 ; p = 0,90
Ad E	0,4361	0,66	0,2205	0,82	-0,3813	0,70	F = 0,1837 ; p = 0,90
Qd D	-0,5873	0,56	-0,2538	0,80	0,1888	0,85	F = 0,2629 ; p = 0,85
Qd E	0,2396	0,81	-0,3658	0,71	0,2053	0,83	F = 0,1767 ; p = 0,91
FP D	0,5026	0,62	-0,6960	0,49	0,3390	0,73	F = 0,8324 ; p = 0,50
FP E	1,2379	0,22	-0,1090	0,91	-0,3312	0,74	F = 1,1632 ; p = 0,34
Citocinas antiinflamatórias							
	IL-10		TGF- β				
	t	p	t	p			
Ad D	-0,0569	0,95	-0,4984	0,62	F = 0,1289 ; p = 0,87		
Ad E	-0,1960	0,84	-0,7646	0,45	F = 0,3256 ; p = 0,72		
Qd D	-0,1849	0,85	-0,8295	0,41	F = 0,3758 ; p = 0,69		
Qd E	-0,3582	0,72	-0,7844	0,44	F = 0,3968 ; p = 0,68		
FP D	-1,0170	0,31	-0,3929	0,69	F = 0,6302 ; p = 0,54		
FP E	-1,1903	0,24	-0,3594	0,72	F = 0,8123 ; p = 0,54		

Ad D e E: Músculos adutores de quadril direito e esquerdo; Qd D e E: Músculo quadríceps direito e esquerdo; FP D e E: Músculos flexores plantares direito e esquerdo.

F (Regressão); t (Coeficiente de regressão); Teste de Regressão Linear Múltipla ($p \leq 0,05$).

Os pacientes que desenvolvem PET/MAH apresentam alterações na força e no tônus muscular. Estes fatores, quando associados, levam a alteração no equilíbrio e mobilidade destes pacientes os tornando suscetíveis a quedas.

A partir destes dados foram realizadas correlações do equilíbrio, através da escala de equilíbrio e mobilidade de Tinetti e a expressão gênica das citocinas estudadas. Foi observado, através do modelo de regressão utilizado, que não houve associação entre a escala de Tinetti e a expressão gênica, porém os resultados obtidos foram próximos da significância estatística ($p = 0,09$), conforme mostra a tabela 13.

Tabela 13 - Regressão linear múltipla das citocinas estudadas relacionadas com a escala de Equilíbrio e Mobilidade de Tinetti, nos pacientes HTLV-1 com PET/MAH ($n=25$), analisados no Laboratório de Imunopatologia do NMT da UFPA no período de Agosto de 2010 a Agosto de 2014, Belém - Pará.

VARIÁVEIS INDEPENDENTES	VARIÁVEL DEPENDENTE		
	Escala de Tinetti		
	T	P	Modelo de regressão
IFN- γ	2,9176	0,008	
TNF- α	-0,4984	0,62	
IL-4	-0,8606	0,40	F = 2,2097
IL-10	1,2927	0,21	p = 0,09
TGF- β	-0,3283	0,74	

F (Regressão); t (Coeficiente de regressão); Teste de Regressão Linear Múltipla ($p \leq 0,05$).

Como foi observado que os resultados desta primeira associação não foram estatisticamente significantes, mas o valor de p foi próximo de se obter resultados significativos, buscou-se a análise de regressão pelo perfil citocínico inflamatório e antiinflamatório. Nesta análise foi observado que para o perfil citocínico inflamatório houve correlação estatisticamente significativa através do modelo de regressão linear múltipla ($p = 0,05^*$), mostrando que houve associação desta escala com as citocinas inflamatórias. Dentre as variáveis independentes estudadas, foi observado que somente a expressão gênica de IFN- γ foi estatisticamente significativa ($p = 0,006^*$) com o risco de queda. Ou seja, quanto maior a expressão gênica de IFN- γ , maior o risco de queda nos pacientes que desenvolvem PET/MAH. Já para o perfil citocínico antiinflamatório, os resultados mostram que não houve associação das citocinas estudadas com a escala de equilíbrio e mobilidade de Tinetti, conforme ilustrado na tabela 14.

Tabela 14 - Regressão linear múltipla dos perfis citocínicos relacionado com a escala de Equilíbrio e Mobilidade de Tinetti, nos pacientes HTLV-1 com PET/MAH (n=25), analisados no Laboratório de Imunopatologia do NMT da UFPA no período de Agosto de 2010 a Agosto de 2014, Belém - Pará.

VARIÁVEL DEPENDENTE	VARIÁVEIS INDEPENDENTES						MODELO DE REGRESSÃO
	Citocinas inflamatórias						
	IFN- γ		TNF- α		IL-4		
	t	p	t	p	t	p	
Escala de Tinetti	2,9943	0,006*	-0,3772	0,70	0,0769	0,93	F = 3,0219 ; p = 0,05*
	Citocinas antiinflamatórias						
	IL-10			TGF- β			
	t	p	t	p	t	p	
Escala de Tinetti	0,2919	0,77	0,8051	0,42			F = 0,3868 ; p = 0,68

F (Regressão); t (Coeficiente de regressão); *Regressão Linear Múltipla estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).

As alterações na força e no tônus muscular levam também a um quadro clínico de alteração funcional da marcha. Esta alteração leva o paciente com PET/MAH à necessidade de dispositivos que os auxiliem para esta atividade no decorrer evolutivo da doença.

Foi realizada a correlação entre o grau de auxílio na marcha e a expressão gênica das citocinas estudadas. Observou-se que, através do modelo de regressão utilizado, não houve associação entre o auxílio na marcha e a expressão gênica, porém os resultados obtidos foram próximos da significância estatística ($p = 0,06$), conforme mostra a tabela 15.

Tabela 15 - Regressão linear múltipla das citocinas estudadas relacionadas com o grau de auxílio na marcha, nos pacientes HTLV-1 com PET/MAH (n=26), analisados no Laboratório de Imunopatologia do NMT da UFPA no período de Agosto de 2010 a Agosto de 2014, Belém - Pará.

VARIÁVEIS INDEPENDENTES	VARIÁVEL DEPENDENTE		
	Auxílio na marcha		
	t	p	Modelo de regressão
IFN- γ	3,4324	0,002	
TNF- α	-1,0833	0,29	F = 2,5530
IL-4	0,4409	0,66	
IL-10	0,0260	0,97	p = 0,06
TGF- β	-1,1798	0,25	

F (Regressão); t (Coeficiente de regressão); Teste de Regressão Linear Múltipla ($p \leq 0,05$).

Como não houve associação entre as citocinas estudadas e o grau de auxílio na marcha foi realizado nova análise de regressão, utilizando os perfis citocínicos inflamatório e antiinflamatório. Nesta análise foi observado que para o perfil citocínico inflamatório houve

correlação estatisticamente significativa através do modelo de regressão linear múltipla ($p = 0,02^*$). Dentre as variáveis independentes estudadas, foi observado que somente a expressão gênica de IFN- γ foi estatisticamente significativa ($p = 0,003^*$) com o grau de auxílio na marcha. Isso significa dizer que quanto maior é a expressão gênica de IFN- γ , maior é o grau de auxílio na marcha apresentados pelos pacientes com PET/MAH. Já para o perfil citocínico antiinflamatório não foi observado correlação significativa conforme mostra a tabela 16.

Tabela 16 - Regressão linear múltipla dos perfis citocínicos relacionado com o grau de auxílio na marcha, nos pacientes HTLV-1 com PET/MAH (n=26), analisados no Laboratório de Imunopatologia do NMT da UFPA no período de Agosto de 2010 a Agosto de 2014, Belém - Pará.

VARIÁVEL DEPENDENTE	VARIÁVEIS INDEPENDENTES						MODELO DE REGRESSÃO
	Citocinas inflamatórias						
	IFN- γ		TNF- α		IL-4		
	t	p	t	p	t	p	
Auxílio na marcha	3,2980	0,003*	-1,0703	0,29	0,6484	0,52	F = 3,8733 ; p = 0,02*
	Citocinas antiinflamatórias						
	IL-10			TGF- β			
	t	p	t	p	t	p	
Auxílio na marcha	-0,1441	0,88	0,4202	0,67			F = 0,0944 ; p = 0,90

F (Regressão); t (Coeficiente de regressão); *Regressão Linear Múltipla estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$).

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 2,5 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 etiológicamente associada ao vírus. Esta doença 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 ao desequilíbrio na resposta imunológica, resultando no aumento do processo inflamatório contra o vírus (GONÇALVES et al., 2010; SANTOS et al., 2006; SOUZA et al., 2012).

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. Outra questão importante é que alguns trabalhos relatam a infecção de células T CD4⁺ reguladoras pelo HTLV-1. Estas células são responsáveis por manter a homeostase da resposta imunológica, produzindo citocinas antiinflamatórias, como IL-10 e TGF- β . Nesse caso, o que foi mostrado é que em pacientes que desenvolvem LLcTA, expressavam mais estas citocinas, e conseqüentemente apresentavam imunossupressão. Já em relação aos pacientes que desenvolvem PET/MAH, o que é descrito é o oposto, mostrando diminuição destas citocinas, explicando a resposta inflamatória aumentada (GONÇALVES et al., 2010; MONTANHEIRO et al., 2009; SANTOS et al., 2006).

Tendo em vista esta desregulação imunológica apresentada nos indivíduos que desenvolvem a doença associada ao HTLV-1, este trabalho avaliou o perfil imunológico

periférico dos pacientes infectados pelo HTLV-1 que desenvolveram ou não a PET/MAH e também avaliou alguns sinais clínicos somente nos pacientes que desenvolveram a doença. A resposta imunológica destes indivíduos foi correlacionada com os achados clínicos apresentados por eles, focando na fraqueza muscular, na espasticidade, equilíbrio e no auxílio da marcha.

Todos os indivíduos participantes do estudo foram avaliados no Laboratório de Clínica e Epidemiologia de Doenças Endêmicas do NMT da UFPA. Durante as consultas médicas ficou evidente 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, tanto os pacientes HTLV-1 que ainda não tinham desenvolvido PET/MAH quanto aqueles que já haviam desenvolvido a doença, apresentavam sintomatologias como artrites, artroses e síndrome sicca, sendo estas manifestações clínicas características de processo inflamatório.

Outro ponto importante na clínica destes pacientes diz respeito ao quadro algico (Dor). Este sintoma foi bastante relatado pelos pacientes, 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. Além do quadro doloroso, as alterações de sensibilidade (tátil e dolorosa) e dos reflexos miotáticos profundos também estavam presentes em alguns indivíduos HTLV-1 que ainda não haviam sido diagnosticados como PET/MAH.

Deste modo, pode-se constatar que estes indivíduos atendidos no NMT, que não apresentavam diagnóstico confirmado de PET/MAH, não poderiam ser considerados como HTLV-1 assintomáticos. Diante desta constatação, neste estudo foi utilizado o critério neurológico para poder classificar os indivíduos participantes da pesquisa. Foi utilizado o estudo de De Castro-Costa et al. (2006), onde os autores propuseram um critério de fácil diagnóstico para a PET/MAH, diferente do que era proposto pela OMS onde se utilizavam uma vasta lista de critérios para se chegar a confirmação da doença. Este critério tem sido bastante utilizado em pesquisas clínicas envolvendo a PET/MAH, conforme pode ser observado no trabalho de Nozuma et al. (2014) onde avaliou os sinais clínicos destes pacientes e utilizou esta escala para realizar a triagem dos seus pacientes, bem como nos trabalhos de Starling et al. (2013) e Costa et al. (2012) que também utilizaram esta mesma

escala em seus estudos. Assim, os pacientes inseridos neste estudo foram divididos em dois grupos: HTLV-1 sem PET/MAH e HTLV-1 com PET/MAH.

Vakili et al. (2013) realizou um estudo com três amostras populacionais de PET/MAH, incluindo Japão, Iran e Brasil. Os sinais clínicos apresentados pelas três populações apresentaram resultados diferentes em termos de frequência dos sintomas. Porém, o interessante registrado foi em relação a população brasileira que possuía PET/MAH. Foi relatado pelos autores que 100% dos PET/MAH brasileiros apresentaram síndrome piramidal em membros inferiores (principalmente fraqueza e espasticidade) e 73% apresentaram incapacidade motora. Esses resultados mostram a importância clínica de se pesquisar as variáveis neurológicas presentes neste estudo.

Os autores citados anteriormente e alguns outros pesquisadores, quando realizam estudos envolvendo os PET/MAH brasileiros comparando a outras nacionalidades, utilizam como referência os pacientes provenientes de Salvador, por ser um grande centro de pesquisa em HTLV-1. Mas, será que a população de Belém apresenta esta mesma característica clínica? As variáveis neurológicas escolhidas neste estudo são pertinentes ao questionamento principal deste trabalho? Todos estes questionamentos podem ser respondidos baseados em estudos iniciais de Ishak et al. (2002) onde relatou, pela primeira vez em Belém, três casos de PET/MAH apresentando sintomatologia de fraqueza muscular e disfunção vesical. Assim como o estudo de 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. Estes autores mostram que os PET/MAH de Belém também apresentam as mesmas variáveis neurológicas avaliadas neste estudo, ou seja, os pacientes apresentam fraqueza muscular principalmente na região proximal, espasticidade muscular também maior na região proximal, risco de quedas aumentado e necessidade de auxílio para se locomover.

Assim, após a caracterização dos pacientes, analisou-se a quantificação relativa das citocinas IFN- γ e TNF- α para resposta Th1, IL-4 para resposta Th2 e IL-10 e TGF- β para resposta reguladora.

O gráfico 20 mostra que as citocinas ligadas a resposta Th1 (IFN- γ e TNF- α) se apresentaram mais expressas nos dois grupos em relação à IL-4 (Th2). Um fato interessante é

que em relação ao IFN- γ , nos pacientes HTLV-1 sem PET/MAH, todas as citocinas apresentaram menor expressão de forma estatisticamente significativa (Tabela 7). Já para os pacientes com PET/MAH, a IL-4 estava significativamente menos expressa, porém TNF- α apresentou a expressão muito semelhante em relação ao IFN- γ . Estes resultados sugerem que talvez para o desenvolvimento da PET/MAH, o TNF- α tenha uma participação importante. Os resultado de Brito-Melo et al. (2007) foram semelhantes a este, uma vez que os autores utilizando a citometria de fluxo, verificaram que os níveis de INF- γ mesmo sem significância estatística, foi maior nos pacientes com PET/MAH, quando comparados aos grupos controle, assintomáticos e oligosintomáticos. E para o TNF- α , os achados mostraram níveis elevados de forma significativa para os pacientes com PET/MAH quando comparado ao grupo assintomático.

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. Não houve diferenças significativas entre os dois grupos, apenas uma tendência de maior expressão de IFN- γ e TNF- α em indivíduos que desenvolveram PET/MAH e uma tendência de maior expressão de IL-4 nos pacientes que não desenvolveram PET/MAH (Gráfico 21).

Muniz et al. (2006) quantificaram, através do método de ELISA, os níveis desta citocina no soro de pacientes infectados pelo HTLV-1. Os autores mostram que os indivíduos com PET/MAH apresentaram altos níveis de IFN- γ quando comparado aos assintomáticos. Sendo assim, os resultados foram divergentes. Porém, deve-se levar em conta que, primeiramente os pacientes descritos por Muniz et al. (2006) foram ditos assintomáticos, já os pacientes deste estudo não puderam ser considerados assintomáticos e sim que não desenvolveram PET/MAH. Com isso, a alteração na expressão poderia estar menos acentuada. Outra explicação para essa controversa pode decorrer de eventos epigenéticos, que podem interferir na tradução do mRNA, influenciando a produção final da citocina.

Em relação ao TNF- α , mesmo não apresentando resultados significantes, houve maior expressão do TNF- α em indivíduos HTLV-1 com PET/MAH (Gráfico 21). Estes resultados assemelham-se com os encontrados no estudo de Starling et al. (2013) e Brito-Melo et al. (2007), onde analisou o TNF- α por citometria de fluxo. Starling et al. (2013) mostrou nos pacientes com PET/MAH níveis elevados do TNF- α , de forma significativa, quando comparado aos assintomáticos. E mesmo sem significância estatística, os níveis de TNF- α foram maiores quando comparados ao grupo possível PET/MAH. Brito-Melo et al. (2007)

mostraram que os pacientes com PET/MAH apresentaram TNF- α significativamente maior quando comparado aos assintomáticos e ao grupo controle e, mesmo sem significância estatística, os níveis de TNF- α foram maiores quando comparados aos oligosintomáticos. Também no estudo de Santos et al. (2012), através do método de ELISA, os resultados obtidos apontaram para maior concentração TNF- α nos pacientes com PET/MAH de forma significativa, quando comparados aos grupos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e aqueles que desenvolveram hiperatividade de bexiga. Brito-Melo et al. (2007) afirma que muito se estuda sobre a resposta imunológica adaptativa e pouco se estuda sobre a inata. TNF- α também faz parte da resposta inata, tendo grande importância na resposta inflamatória, podendo contribuir para a evolução da PET/MAH, e Starling et al. (2013) complementa a idéia de que o TNF- α possua papel central na coordenação da resposta inflamatória.

Outro ponto importante foi em relação à expressão de IL-4, que é a citocina de “assinatura” do subgrupo Th2. Nos pacientes com PET/MAH, a IL-4 apresentou expressão menor quando comparada aos indivíduos sem PET/MAH, como mostra o gráfico 21. Mesmo não apresentando significância estatística ($p = 0,171$), os pacientes com PET/MAH apresentaram expressão de IL-4 três vezes menor (Mediana: $0,5 \times 10^{-4}$), quando comparados aos pacientes sem PET/MAH (Mediana: $1,6 \times 10^{-4}$). Este resultado compartilha dos resultados obtidos por Furukawa et al. (2003) e Brito-Melo et al. (2007) onde através da citometria de fluxo, mostrou que a maior intensidade de fluorescência de IL-4 foi nos indivíduos assintomáticos e oligosintomáticos 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.

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 e TGF- β . Sabe-se que o HTLV-1 pode infectar as células Treg e alterar sua função (ARAYA et al., 2011). Sendo assim, analisou-se neste estudo a expressão de IL-10 e TGF- β . Nos indivíduos HTLV-1 com e sem PET/MAH a expressão de IL-10 foi significativamente menor quando comparado ao IFN- γ . Em relação ao TNF- α , mesmo sem significância estatística, a expressão de IL-10 também foi menor, conforme mostram o gráfico 20 e a tabela 7. 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. Em relação à expressão de IL-4, IL-10 apresentou expressão semelhante para os dois grupos (Tabela 7).

O gráfico 21 mostra a comparação da expressão de IL-10 em ambos os grupos. Os resultados mostram que não houve diferença de expressão gênica desta citocina, ou seja, os níveis de expressão foram praticamente iguais entre os indivíduos HTLV-1 com PET/MAH e sem PET/MAH (Mediana: $0,9 \times 10^{-4}$ e mediana: $0,8 \times 10^{-4}$, respectivamente). Estes achados divergem daqueles obtidos por 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.

O TGF- β , considerado outra citocina antiinflamatória para o perfil das células Treg, apresentou níveis de expressão gênica intrigantes. Quando se comparou a expressão de TGF- β com a expressão de IFN- γ , TNF- α , IL-4 e IL-10, em ambos os grupos, foi observado maior expressão de TGF- β em relação a estas citocinas, e de forma significativa, como mostram o gráfico 20 e a tabela 7. Comparando a expressão desta citocina entre os grupos, foi observado que não houve diferença significativa, apresentando níveis de expressão equivalentes (Gráfico 21). Com esses dados, pode-se supor que o papel do TGF- β não estaria relacionado com a função de imunossupressão, e sim, que poderia estar associado a outras funções. Esta citocina tem ação pleomorfa, e diante disso, neste estudo ela poderia estar participando de uma ação que aumentaria a resposta inflamatória. Já foi descrito que o TGF- β quando associado com a IL-6 é capaz de diferenciar células CD4 para o perfil Th17. Outra função do TGF- β poderia estar ligada a reparação tecidual, conforme relatam os autores Voumvourakis et al. (2011) e Harry (2013). O aumento desta citocina justifica-se na tentativa de reparar a lesão tecidual causada pela inflamação. Sabendo que existe nesses pacientes um estado de inflamação crônica que leva a um quadro de desmielinização, é plausível que o organismo tente reparar esse tecido lesionado.

O próximo passo foi analisar a correlação entre as citocinas. Nos pacientes sem PET/MAH, nota-se que há correlações positivas, mesmo que fracas, e que são significantes estatisticamente, entre as citocinas Th1, Th2 e IL-10. Isso mostra que a resposta imunológica, apesar de apresentar uma tendência para Th1, ainda ocorre homeostase da resposta. Em relação aos pacientes com PET/MAH, verifica-se que as correlações são mais discretas e vale ressaltar que não há correlação de INF- γ e TNF- α com IL-10, o que pode indicar uma menor ação anti-inflamatória nesses pacientes, conforme mostra a tabela 8. Estes achados sugerem

então que há expressão prejudicada de IL-10 nos pacientes com PET/MAH, levando a um quadro inflamatório persistente nos pacientes que desenvolvem a doença associada. O que pode ser sustentado pelos estudos de Nascimento et al. (2009) onde o autor mostrou que não havia diferença entre na dosagem de IL-10 nos grupos saudáveis, infectados pelo HTLV-1 que desenvolveram ou não a PET/MAH. Já Ramirez et al. (2010) mostrou em seu estudo que a IL-10 tinha níveis iguais entre PET/MAH e indivíduos saudáveis.

O equilíbrio entre as respostas Th1 e Th2 se mostra de forma importante no controle do desenvolvimento de doenças inflamatórias. Gonçalves et al. (2008) relata que várias doenças inflamatórias mostram desequilíbrio entre estas respostas. Através do cálculo da razão entre as expressões de $IFN-\gamma/IL-4$ e $TNF-\alpha/IL-4$, pode-se verificar o quanto seria a predominância da resposta Th1 sobre a Th2. Os gráficos 22 e 23 mostram predominância do perfil Th1 nos indivíduos com PET/MAH quando comparado aos sem PET/MAH. Mesmo sem significância estatística, os pacientes com PET/MAH apresentaram razão de $IFN-\gamma/IL-4$ duas vezes maior (Mediana: 9,184), quando comparado aos sem PET/MAH (Mediana: 3,681). E os pacientes com PET/MAH apresentaram razão de $TNF-\alpha/IL-4$ doze vezes maior (Mediana: 12,26) quando comparado aos sem PET/MAH (Mediana: 0,99), conforme mostra o gráfico 23. 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). Além de Starling et al. (2013) mostrar em seus resultados por citometria de fluxo, realizando o cálculo da razão entre $IFN-\gamma/IL-4$, que os pacientes com PET/MAH apresentaram níveis elevados, de forma significativa, quando comparado ao grupo controle e possível PET/MAH. Já a razão $TNF-\alpha/IL-4$ não obteve resultados significantes entre os grupos.

Nos gráficos 22, 23 e 24, pode-se verificar a razão entre $IFN-\gamma/IL-10$, $TNF-\alpha/IL-10$ e $IL-4/IL-10$ para pacientes com e sem PET/MAH. Os resultados das razões de $IFN-\gamma/IL-10$ foram praticamente equivalente nos grupos com e sem PET/MAH (Mediana: 3,794 e Mediana: 4,666, respectivamente), ocorrendo o mesmo para a razão de $IL-4/IL-10$ (Mediana: 1,022 e Mediana: 1,414, respectivamente). Porém, a razão de $TNF-\alpha/IL-10$ foi duas vezes maior nos pacientes com PET/MAH (Mediana: 3,796) em relação aos pacientes sem PET/MAH (Mediana: 1,585). Mais uma vez, há um forte indício da participação do $TNF-\alpha$ na resposta inflamatória.

Sabe-se que a alteração na resposta imunológica pode levar a danos no tecido nervoso central, e, conseqüentemente, o aparecimento dos sinais clínicos característicos que levam ao

diagnóstico de PET/MAH. Nota-se durante a rotina de atendimento dos pacientes infectados por HTLV-1 que desenvolveram PET/MAH, e alguns pacientes que não desenvolveram a PET/MAH, que há sinais clínicos informando que a doença está progredindo. Esta progressão está associada à desregulação da resposta imunológica.

Para verificar a associação das manifestações clínicas apresentadas pelos indivíduos que desenvolveram a doença e a alteração na resposta imunológica, foi realizada avaliação neurológica funcional destes indivíduos. Para isso, foram utilizadas escalas funcionais de fácil e rápida aplicabilidade. Neste trabalho, a análise dos sintomas neurológicos foi direcionado em relação a motricidade. Este critério de avaliação foi escolhido baseado em sua importância clínica para a progressão da doença levando a alterações importantes no que diz respeito a independência funcional, e, conseqüente, alteração na qualidade de vida destes pacientes, como descrito nos estudos de Shoeibi et al. (2013).

A fraqueza proximal é uma das características clínicas presentes nos indivíduos com PET/MAH. Esta informação foi coletada utilizando a escala do *Medical Research Council*, onde mostra que quanto menor é a graduação obtida por ela, maior é o grau de fraqueza muscular. Esta escala é bastante utilizada para medir a força muscular nos pacientes infectados pelo HTLV-1, como pode ser observado no estudo de Costa et al. (2012), onde o autor avaliou os sinais clínicos neurológicos de pacientes infectados pelo HTLV-1 com bexiga hiperativa. Nos pacientes com PET/MAH, presentes neste estudo, foi observada mediana para o escore 4 em ambas as regiões (Direita e esquerda), mostrando que há fraqueza muscular nestes indivíduos, conforme mostra a tabela 2. Foi observado também que a fraqueza muscular é mais evidente na região proximal, principalmente no membro inferior esquerdo, conforme mostra o gráfico 13. Este achado corrobora com o que diz a literatura, onde relatam que a fraqueza muscular nestes indivíduos inicia-se proximalmente e progride para distal (ARAÚJO e SILVA, 2006; BRASIL, 2013). Além de Poetker et al. (2011) em seu estudo das manifestações clínicas dos pacientes com PET/MAH, demonstrarem que a fraqueza muscular de membros inferiores são as manifestações iniciais da doença, principalmente na região proximal.

A expressão de citocinas inflamatórias podem estar implicadas no aparecimento deste sinal clínico. Buscando associar a fraqueza muscular com a desregulação da expressão gênica das citocinas estudadas, foi realizada análise de regressão linear múltipla. Esta análise mostrou que não há associação desta escala com as citocinas estudadas, mesmo quando estratificada em perfil citocínico inflamatório e antiinflamatório, conforme mostram as tabelas 9 e 10. A não existência de associação entre estas variáveis pode ser explicada pelo fato de

que todos os pacientes realizam tratamento fisioterapêutico. E um dos grandes objetivos da terapêutica aplicada é o ganho de força muscular, pois é uma das principais queixas relatadas pelos pacientes, juntamente com a espasticidade. Como estes pacientes estão em processo de reabilitação é sabido que ocorre a melhora da força muscular, implicando em viés quando se realiza a associação desta variável com a expressão das citocinas estudadas.

No que diz respeito à avaliação da espasticidade dos indivíduos com doença associada, utilizou-se como instrumento de avaliação a escala de Ashworth Modificada. Foi tomado 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), Ghotbi et al. (2011), Kira (2013) e Britto, Correa e Vincent (2014), em que eles utilizam esta mesma escala de avaliação, assim como estes mesmos músculos citados.

Os resultados mostraram que não houve diferença estatística do acometimento da espasticidade entre os membros inferiores, conforme mostra o gráfico 14. Pode-se perceber ainda, neste estudo, que todos os pacientes com PET/MAH apresentaram aumento de tônus muscular (Mediana para o escore 1+), porém de forma variada conforme mostra tabela 3. Esta variação do acometimento da espasticidade mostrou um fato interessante, pois na análise descritiva pode-se verificar que a espasticidade apresenta a mesma tendência de acometimento da fraqueza muscular, ambos na região proximal. Foi observado que o aumento do tônus muscular é maior na região proximal direita (Músculo adutor de quadril) e menor na região distal direita (Músculos flexores plantares de tornozelo), conforme mostra o gráfico 14.

Sabe-se que quanto maior é a lesão no trato medular específico para controle do tônus muscular, maior é o grau de espasticidade. Diante do exposto, não foram encontrados estudos que fizessem esta correlação entre a 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. Neste estudo não foi observada esta correlação. As tabelas 11 e 12 mostram, através da regressão linear múltipla, que tanto para as citocinas estudadas como estratificado para os perfis citocínicos, não foram obtidos resultados estatisticamente significantes. Este fato pode ser explicado pelo tratamento o qual a maioria dos pacientes estava sendo submetido durante as avaliações. Alguns pacientes faziam uso de medicação antiespástica (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. Outro fato que poderia ter interferido nos resultados, foi que muitos destes pacientes estavam em tratamento fisioterapêutico para a normalização do tônus muscular, através dos recursos eletroterápicos e cinesioterapêuticos pertinentes as sessões de fisioterapia.

A presença de fraqueza muscular, principalmente na região proximal, associada ao aumento do tônus muscular, leva a um quadro disfuncional na marcha. A deambulação quando deixa de ser uma atividade automática e passa a se tornar uma atividade em que o indivíduo necessita de novas estratégias para se locomover, e, com isso, passa a dispor de um gasto energético maior para realizar esta atividade, a consequência desta alteração funcional é levar o indivíduo a maior predisposição a quedas. Diante disso, a variável equilíbrio foi escolhida por estar intimamente relacionada com a alteração de força e de tônus muscular. Conforme pode ser observado nos estudos já citados anteriormente.

Nos indivíduos com PET/MAH pode ser verificado que os pacientes apresentavam alto risco de quedas, com resultados estatisticamente significantes ($p = 0,02^*$), conforme mostra o gráfico 15. Apesar dos pacientes estarem em processo de reabilitação para a melhora do quadro clínico, o risco de queda ainda se mantém elevado. Isso mostra que tanto a fraqueza muscular quanto a espasticidade são variáveis importantes como preditoras de progressão da doença.

Buscando verificar a associação da escala de Equilíbrio e Mobilidade de Tinetti com as citocinas estudadas, foi observado que não houve associação através do modelo de regressão linear múltipla, apesar do valor de p ser próximo da significância estatística ($p = 0,09$), conforme mostra a tabela 13. Diante desta constatação, realizou a estratificação pelo perfil citocínico e ficou evidente que existia associação entre o perfil citocínico inflamatório e a escala de Tinetti ($p = 0,05^*$). E dentre as variáveis independentes, a expressão de IFN- γ foi estatisticamente significativa ($p = 0,006^*$), conforme mostra a tabela 14. Isso implica dizer que quanto maior é a expressão de IFN- γ , maior é o risco de queda nestes indivíduos.

Ficou comprovado que os pacientes com PET/MAH estão predispostos a sofrerem quedas, e, com a progressão da doença, estes indivíduos ficam dependentes de dispositivos que os auxiliem durante a deambulação. De acordo com a literatura, a progressão natural da doença leva os pacientes a necessitarem de aparelhos que os ajudem cada vez mais durante a marcha. Os indivíduos com PET/MAH inicialmente necessitam de bengalas e em estágio mais avançado da doença, ficam confinados a cadeira de rodas conforme é relatado no estudo de revisão sobre a fisiopatologia clínica da PET/MAH de Yamano e Sato (2012).

Os pacientes com PET/MAH avaliados neste estudo, segundo a escala do grau de auxílio na marcha, apresentaram mediana para o escore 2 (Uso de bengala e muleta unilateral), conforme mostra a tabela 5 e o gráfico 16, onde os resultados obtidos para esta variável chegaram próximos da significância estatística ($p = 0,07$). Estes achados corroboram com o estudo de Franzoi e Araújo (2007) em que avaliaram as incapacidades e performance da marcha nos pacientes com PET/MAH, e observaram que a grande maioria usavam muletas e também um número expressivo deambulavam sem auxílio.

Não obter resultados significantes nesta variável foi um fato esperado, pois foi visto que sete (07) pacientes não apresentavam auxílio na marcha, ou seja, deambulavam sozinhos. Não porque eles estavam aptos a realizar esta atividade de forma segura, pelo contrário, a maioria precisaria de auxílio. Durante a análise do risco de quedas, somente neste indivíduos, foi observado que a grande maioria (71,4%) apresentavam risco considerável de queda, conforme ilustrado no gráfico 17. Então por que estes pacientes não estavam usando dispositivos que os auxiliassem durante a demabulação? A resposta para esta pergunta esta fundamentada no quesito “preconceito”. Os pacientes relatam que ao usarem algum auxílio durante a marcha eles irão estar expostos a questionamentos de amigos, vizinhos e familiares sobre sua condição de saúde. É sabido que muitos desses pacientes escondem de familiares e amigos que são portadores do HTLV-1, e, que por causa desta infecção, apresentam doença incapacitante. Por desconhecimento a respeito do modo de transmissão e das consequências que esta infecção pode causar, eles podem estar sujeito a estigmas na sociedade e no seu ambiente doméstico. Há ainda outra questão importante, muitos dos pacientes ainda não aceitam sua condição clínica, ou seja, ainda não estão preparados psicologicamente para saber lidar com uma doença crônica e progressiva. O fato de necessitar de algum dispositivo durante a marcha, é sinal de que a doença está progredindo e isso não está errado, como pode ser observado na análise de regressão realizada neste estudo. O que precisa ser feito é um trabalho psicológico de conscientização de que o uso do auxílio na marcha é uma maneira de torná-lo mais funcional, independente, e, sobretudo, prevenindo o risco de quedas e assim melhorar a qualidade de vida.

O auxílio da marcha como variável preditora de progressão da PET/MAH está bastante relatado na literatura atual. Com base nesta informação, ainda não existem estudos que associem a expressão gênica de citocinas e o grau de auxílio na marcha. Buscou-se, neste estudo, verificar a associação do grau de auxílio na marcha com os níveis de expressão gênica nestes pacientes. Na primeira associação do grau de auxílio na marcha com as citocinas estudadas, não houve associação entre estas variáveis, apesar do valor de p da análise de

regressão linear múltipla ter sido próximo da significância estatística ($p = 0,06$), conforme mostra a tabela 15. Mas, ao realizar a análise de regressão estratificada pelo perfil citocínico, foi observado associação significativa somente para o perfil citocínico inflamatório ($p = 0,02^*$), conforme mostra a tabela 16. Dentre as variáveis independentes analisadas, apenas a expressão de IFN- γ mostrou resultado significativo ($p = 0,003^*$). Isso mostra que quanto maior foi 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.

Os resultados obtidos com a correlação entre os sintomas clínicos e a expressão das citocinas, mostra a importância do IFN- γ no desenvolvimento e progressão da clínica dos pacientes com PET/MAH. Sua maior expressão nos pacientes com PET/MAH e sua forte associação com equilíbrio e auxílio de marcha, não deixam dúvidas em relação a sua importância com a resposta inflamatória. Apesar dos relatos na literatura não associarem a expressão de citocinas com o quadro clínico, os trabalhos mostram que o IFN- γ está intimamente relacionado com o desenvolvimento da PET/MAH como já descrito por Montanheiro et al. (2009), Yamano et al. (2009) e Gonçalves et al. (2008).

A não associação da expressão do TNF- α com os sintomas clínicos foi intrigante. Talvez isso tenha ocorrido por estar envolvido em outros processos relacionados a instalação da doença e não em sua progressão.

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, quando comparados aos pacientes sem PET/MAH. Entretanto, não se pode, na maioria das análises encontrar significância estatística. Porém, existem outros fatores que podem interferir na tradução do mRNA em proteína. Lembrando que a expressão gênica não se baseia em apenas quantificação de mRNA, mas também o estudo de outros mecanismos que podem interferir até a tradução deste, como os microRNAs. Com isso, estes resultados mostram que a resposta inflamatória do tipo Th1 é importante para o desenvolvimento e progressão da PET/MAH, porém existem mais mecanismos que necessitam ser estudados para que este desvio para Th1 seja mesmo danoso e leve ao desenvolvimento da PET/MAH. E assim, será possível entender o porquê muitos pacientes permanecem sem desenvolver as doenças relacionadas ao HTLV-1 e talvez traçar estratégias mais eficazes para tratar os pacientes acometido por alguma dessas doenças.

7 CONCLUSÕES

- Não houve diferença significativa entre os sexos nos pacientes estudados, porém, foi observado que o sexo feminino apresentou número elevado de pacientes em ambos os grupos. Em relação à idade não houve diferença significativa entre os grupos, o que mostra característica semelhante para esta variável, não podendo ser um viés de confundimento na análise funcional dos indivíduos com PET/MAH.
- Os pacientes com PET/MAH apresentaram fraqueza muscular de membro inferior tanto na região proximal quanto distal, mesmo não apresentando diferença significativa entre os lados direito e esquerdo, porém, a fraqueza muscular foi mais evidente na região proximal do membro inferior esquerdo.
- Graus variados de espasticidade no membro inferior foram observados nos pacientes com PET/MAH, não havendo diferenças entre os lados direito e esquerdo, porém, a espasticidade foi maior na região proximal direita.
- Alto risco de queda foi observado nos pacientes com PET/MAH.
- Os pacientes com PET/MAH apresentaram dispositivos variados durante a deambulação. O uso de muleta bilateral não foi observado entre os pacientes e, mesmo sem resultados significantes, o dispositivo predominante foi o uso de bengala ou muleta unilateral. E um número expressivo de pacientes não apresentavam auxílio durante a marcha.
- A expressão gênica das citocinas estudadas entre os dois grupos foi semelhante, tendo a tendência para Th1, com maior expressão de IFN- γ em relação a IL-4 nos dois grupos.
- A expressão de TNF- α apresentou a tendência de maior expressão em pacientes com PET/MAH em relação aos pacientes que não desenvolveram PET/MAH. Este resultado sugere que esta citocina também poderia estar envolvida no processo da patogênese da PET/MAH.
- A expressão de IL-10 foi semelhante nos dois grupos estudados.

- A expressão de TGF- β se mostrou equivalente em ambos os grupos. A ação desta citocina poderia estar implicada em outros processos inflamatórios que poderiam participar da patogênese da PET/MAH.
- A força muscular não apresentou correlação com a expressão gênica das citocinas, em particular com o IFN- γ que poderia estar envolvida na patogênese e progressão desta doença. Isso pode ser devido à interferência do programa de reabilitação funcional realizado nestes pacientes;
- Em relação à expressão gênica relativa das citocinas estudadas e ao grau de espasticidade, não houve associação entre estas variáveis. Este fato ocorreu, provavelmente, devido uma possível interferência da medicação (Baclofeno) e da reabilitação funcional realizada nestes pacientes;
- A avaliação de Equilíbrio e Mobilidade de Tinetti se mostrou associado à expressão de IFN- γ , indicando que quanto maior a expressão desta citocina, maior o risco de queda nestes pacientes.
- O grau de auxílio na marcha também foi associado a expressão de IFN- γ , ou seja, quanto maior a expressão de IFN- γ maior é o grau de auxílio na marcha;

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**, Switzerland, v. 3, n. 9, p. 1532-1548, 2011.
- 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.1 28, 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, 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.**, United States, 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.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais. **Guia de manejo clínico da infecção pelo HTLV**. Brasília: MS, 2013.p.1-82

- 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.**, Oxford, v. 147, n. 1, p. 35-44, 2007.
- BRITTO, V. L.; CORREA, R.; VINCENT, M. B. Proprioceptive neuromuscular facilitation in HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Rev Soc Bras Med Trop.**, Rio de Janeiro v. 47, n. 1, p. 24-9, 2014.
- CALATTINI, S. et al. Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. **Retrovirology**, London, v. 9, n. 2, p. 30, 2005.
- 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.
- CASSEB, J.; OLIVEIRA, A. C. P. HTLV. Disponível em: <http://www.htlv.com.br/index.htm>. Acessado em: 21/02/2014.
- 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.
- 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.
- CATALAN-SOARES, B.; CARNEIRO-PROIETTI, A. B.; 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**, Rio de Janeiro, 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.**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 6, p. 668-672, 2010.
- COOPER, S. A.; VAN DER LOEFF, M. S.; TAYLOR, G. P. The neurology of HTLV-1 infection. **Pract Neurol**, Oxford, v. 9, n. 1, p. 16-26, 2009.
- COSTA, D. T. et al. Neurological symptoms and signs in HTLV-1 patients with overactive bladder syndrome. **Arq Neuropsiquiatr**, São Paulo, v. 70, n. 4, p. 252-6, 2012.
- CARNEIRO-PROIETTI, A. B. et al. HTLV in the Americas: challenges and perspectives. **Rev Panam Salud Publica.**, Washington, v. 19, n. 1, p. 44-53, 2006.
- DE CASTRO-COSTA, C.M. et al. Proposal for diagnostic criteria of tropical spastic paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy (TSP/HAM). **AIDS Res Hum Retroviruses**, New York, v. 22, n. 10, p. 931-5, 2006.
- DEFINO, H. L. A. Trauma raquimedular. **Medicina**, São Paulo, v. 32, p. 388-400, 1999.

DIAS-BASTOS, M. R.; OLIVEIRA, C. D.; CARNEIRO-PROIETTI, A. B. Decline in prevalence and asymmetric distribution of human T cell lymphotropic virus 1 and 2 in blood donors, State of Minas Gerais, Brazil, 1993 to 2007. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v. 43, n. 6, p. 615-9, 2010. Dissertação (Mestrado).

DOURADO, I. et al. HTLV-I in the general population of Salvador, Brazil: a city with African ethnic and sociodemographic characteristics. **J Acquir Immune Defic Syndr.**, New York, v. 34, n. 5, p. 527-531, 2003.

FRANZOI, A. C.; ARAÚJO, A. Q. Disability and determinants of gait performance in tropical spastic paraparesis/HTLV-I associated myelopathy (HAM/TSP). **Spinal Cord.**, Houndmills, v. 45, n. 1, p. 64-8, 2007.

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.

GALVÃO-CASTRO, B. et al. Epidemiologia e origem do HTLV-1 em Salvador estado da Bahia: a cidade com a mais elevada prevalência desta infecção no Brasil. **Gaz Méd Bahia.**, Bahia, v. 79, n. 1, p. 3-10, 2009.

GESSAIN, A. et al. Antibodies to human T lymphotropic virus type I in patients with tropical spastic paraparesis. **Lancet**, London, v. 2, n. 8452, p. 407-10, 1985.

GESSAIN, A.; MAHIEUX, R. Tropical spastic paraparesis and HTLV-1 associated myelopathy: clinical, epidemiological, virological and therapeutic aspects. **Rev Neurol.**, Paris, v. 168, n. 3, 2012.

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

GOMES, Giselle de Cássia. **Tradução, adaptação transcultural e exame das propriedades de medida da escala “performance-oriented mobility assessment”(POMA) para uma amostragem de idosos brasileiros institucionalizados.** 2003. 110 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós - Graduação em Gerontologia, Faculdade de Educação, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

GONÇALVES, D. U. et al. HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) inflammatory network. **Inflamm Allergy Drug Targets.**, Saif Zone, 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.**, Washington, v. 23, n. 3, p.577-589, 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.

HARRY, G. J. Microglia during development and aging. **Pharmacol Ther.**, Oxford, v. 139, n. 3, p. 313-26, 2013.

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.

HOSHINO, H. Cellular Factors Involved in HTLV-1 Entry and Pathogenicity. **Front Microbiol**, Lausanne, v. 3, p. 222, 2012.

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.**, Rio de Janeiro, v. 35, n. 3, p. 243-246, 2002.

IZUMO, S. Neuropathology of HTLV-1-associated myelopathy (HAM/TSP). **Neuropathology**, Sendai, v. 30, p. 480-85, 2010.

JACOB, F. et al. Performances of HTLV serological tests in diagnosing HTLV infection in high-risk population of São Paulo, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, São Paulo, v. 49, n. 6, p. 361-364, 2007.

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.

KALYANARAMAN, V. S. et al. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. **Science**, New York, v. 218, n. 4572, p. 571-3, 1982.

KANNIAN, P.; GREEN, P. L. Human T Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1): Molecular Biology and Oncogenesis. **Viruses**, Basel, v. 2, n. 9, p. 2037-77, 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.

KIRA, J. Therapeutic benefits of an oral vitamin B1 derivative for human T lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). **BMC Med.**, London, v. 15, n. 11, p. 183, 2013.

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

LAIRMORE, M. D. et al. Molecular determinants of human T-lymphotropic virus type 1 transmission and spread. **Viruses**, Basel, v. 3, n. 7, p. 1131-65, 2011.

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**, São Paulo, v. 46, n. 1, p. 13-7, 2004.

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

MAGRI, M. C. et al. Molecular characterization of HTLV-1 and HTLV-2 and routes of vírus transmission in HIV-infected patients from the southeastern and Southern Brazil. In: 16th International Conference on Human Retroviruses: HTLV and Related Viruses, 16, 2013, Montreal, Canadá, **Retrovirology**, v. 11, suppl 1, P 47. Disponível em: <http://www.retrovirology.com/content/pdf/1742-4690-11-S1-P47.pdf>. Acesso em: 7 Mar 2014.

MAHIEUX, R.; GESSAIN, A. New human retroviruses: HTLV-3 and HTLV-4. **Med Trop**, Marseille, v. 65, n. 6, p. 525-8, 2005.

MAHIEUX, R.; GESSAIN, A. The human HTLV-3 and HTLV-4 retroviruses: new members of the HTLV family. **Pathol Biol**, Paris, v. 57, n. 2, p. 161-6, 2009.

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

MARTINS, F. M.; REZENDE, N. P. M.; MAGALHÃES, M. H. C. G. Conhecendo o HTLV e suas implicações no atendimento odontológico. **Rev Gaucha Odontol**, Porto Alegre, v. 59, n. 2, p. 239-297, 2011.

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.

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.

MORGAN, O. HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: how far have we come? **West Indian Med J.**, Mona, v. 60, n. 5, p. 505-12, 2011.

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.

NASCIMENTO, M. C. et al. Infective dermatitis has similar immunological features to human T lymphotropic virus-type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Clin Exp Immunol.**, Oxford, v. 156, n. 3, p. 455-62, 2009.

Nejmeddine M. et al. Human T-lymphotropic virus, type 1, tax protein triggers microtubule reorientation in the virological synapse. **J Biol Chem.**, v. 280, n. 33, p. 29653-60, 2005.

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.

NOZUMA, S. et al. Familial clusters of HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 5, 2014.

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 Linfotrópico-T Humano tipo 1 (HTLV-1), síndromes clínicas associadas e transmissão vertical. **Rev. Patol. Trop.**, Goiânia, v. 36, n. 1, p. 17-34, 2007.

PATERNOSTRO-SLUGA, T. et al. Reliability and validity of the Medical Research Council (MRC) scale and a modified scale for testing muscle strength in patients with radial palsy. **J Rehabil Med.**, Stockholm, v. 40, n. 8, p. 665-71, 2008.

POETKER, S. K. et al. Clinical manifestations in individuals with recent diagnosis of HTLV type I infection. **J Clin Virol.**, Amsterdam, v. 51, n. 1, p. 54-8, 2011.

POIESZ, B. J.; et al. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. **Proc Natl Acad Sci., USA**, v.77, n.12, p.7415-9, 1980.

RAMIREZ, E. et al. In vivo fluctuation of Tax, Foxp3, CTLA-4, and GITR mRNA expression in CD4(+)CD25(+) T cells of patients with human T-lymphotropic virus type 1-associated myelopathy. **Braz J Med Biol Res.**, São Paulo, v. 43, n. 11, p. 1109-15, 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.

ROMÁN, G. C.; OSAME, M. Identity of HTLV-I-associated tropical spastic paraparesis and HTLV-I-associated myelopathy. **Lancet**, London, v.1, n.8586, p.651, 1988.

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, F. L. N.; LIMA, F. Epidemiologia, fisiopatogenia e diagnóstico laboratorial da infecção pelo HTLV-I. **J Bras Patol Med Lab**, Rio de Janeiro, v. 41, n. 2, p. 105-16, 2005.

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.

SANTOS, S. B. et al. Immunological and viral features in patients with overactive bladder associated with human T-cell lymphotropic virus type 1 infection. **J Med Virol.**, New York, v. 84, n. 11, p. 1809-17, 2012.

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.

SHOEIBI, A. et al. "HTLV-I Infection" Twenty-Year Research in Neurology Department of Mashhad University of Medical Sciences. **Iran J Basic Med Sci.**, Mashhad, v.16, n.3, p.202-7, 2013.

SILVA, C. M. S. et al. Prevalência de sorologia positiva para o HTLV-1 e HTLV-2 em gestantes atendidas em três serviços de pré-natal, São Luis, jul/08 a jul/09. **Cad Pesq São Luis**, São Luis, v. 16, n. 3, p. 39-44, Jul. 2009.

SLATER, C. M.; RIBEIRO, L. C.; PUCCIONI-SOHLER, M. Difficulties in HAM/TSP diagnosis. **Arq Neuropsiquiatr.**, São Paulo, v. 70, n. 9, p. 686-90, 2012.

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.

SOUZA A. et al. Immunopathogenesis and neurological manifestations associated to HTLV-1 infection. **Rev Soc Bras Med Trop**, Rio de Janeiro, v. 45, n. 5, p. 545-52, 2012.

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

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.

TINETTI, M. E. Performance-Oriented Assessment of Mobility Problems in Elderly Patients. **J Am Geriatr Soc.**, v. 34, p. 119-126, 1986. (Scoring description: PT Bulletin, Feb. 10, 1993).

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.

VAKILI, R. et al. Human T-lymphotropic Virus Type I (HTLV-I) Proviral Load and Clinical Features in Iranian HAM/TSP Patients: Comparison of HTLV-I Proviral Load in HAM/TSP Patients. **Iran J Basic Med Sci.**, v. 16, n. 3, p. 268-72, 2013.

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.

VOUMVOURAKIS, K. I. et al. TGF- β /BMPs: crucial crossroad in neural autoimmune disorders. **Neurochem Int.**, Oxford, v. 59, n. 5, p. 542-50, 2011.

WATANABE, T. Current status of HTLV-1 infection. **Int J Hematol.**, Amsterdam, v. 94, n. 5, p. 430-4, 2011.

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.

YAMANO, Y.; SATO, T. Clinical pathophysiology of human T-lymphotropic virus-type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Front Microbiol.**, Lausanne, v. 3, p. 389, 2012.

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.

YOSHIDA, M.; MIYOSHI, I.; HINUMA, Y. Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. **Proc Natl Acad Sci.**, Washington, v. 79, n. 6, p. 2031-5, 1982.

APÊNDICE

**APÊNDICE A - FICHA DE AVALIAÇÃO FISIOTERAPÊUTICA DOS PACIENTES
COM PET/MAH.**

FICHA DE AVALIAÇÃO DOS PACIENTES COM PET/MAH

G: _____

Nome: _____ Data: ____/____/____

Telefones: _____ Idade: ____ anos. Sexo: Masculino Feminino

Condição: Definitivo Possível Provável

Estado civil: _____ Profissão: _____ Escolaridade: _____

1 - Escala de força motora:

0	Sem contração (paralisia total)
1	Contração muscular visível ou palpável sem movimentação
2	Movimento ativo com eliminação da gravidade
3	Movimento ativo contra a gravidade
4	Movimento ativo contra resistência
5	Força normal

Proximal:

Direito ()

Esquerdo ()

Distal:

Direito ()

Esquerdo ()

2 - Graus de auxílio na marcha

(0) Sem auxílio

(1) Auxílio de terceiros

(2) Auxílio de bengala ou muleta unilateral

(3) Auxílio de muleta bilateral

(4) Auxílio de andador

(5) Auxílio de cadeira de rodas

3 - Teste de equilíbrio (Teste de Tinetti):

(Sujeito sentado em uma cadeira rígida sem braços)

1) Equilíbrio sentado	(0) Inclina-se ou desliza na cadeira (1) Estável, seguro
2) Levantar-se da cadeira	(0) Incapaz sem ajuda (1) Capaz, usa membros superiores para auxiliar (2) Capaz sem usar membros superiores
3) Tentativas para levantar	(0) Incapaz sem ajuda (1) Capaz, requer mais de uma tentativa (2) Capaz de se levantar, uma tentativa
4) Equilíbrio de pé imediato	(0) Instável (cambaleia, move os pés, oscila o tronco) (1) Estável, mas usa dispositivo de auxílio a marcha

(primeiros 5 segundos)	(2) Estável, sem dispositivo de auxílio
5) Equilíbrio de pé	(0) Instável (1) Instável, mas aumenta a base de suporte (entre os calcanhares > 10cm de afastamento), usa dispositivo de auxílio (2) Diminuição da base sem dispositivo de auxílio
6) Desequilíbrio no esterno (3 vezes de forma suave)	(0) Começa a cair (1) Cambaleia, se agarra e se segura em si mesmo (2) Estável
7) Olhos fechados	(0) Instável (1) Estável
8) Girar 360°	(0) Instabilidade (se agarra, cambaleia) (1) Passos descontinuados (2) Continuidade
9) Sentar-se	(0) Inseguro (não avalia bem a distância, cai na cadeira) (1) Usa os braços ou não tem movimentos suaves (2) Seguro, movimento suave
Escore de equilíbrio:	_____/16

4 – Teste de marcha (Teste de Tinetti): cont.

(Sujeito de pé com o examinador, caminha num corredor ou na sala, primeiro no seu ritmo usual e, em seguida, rápido, porém muito seguro, com os dispositivos de auxílio à marcha)

1) Iniciação da marcha	(0) Imediato e após o comando “Vá” (qualquer hesitação ou múltiplas tentativas para iniciar) (1) Sem hesitação
2) Comprimento e altura do passo	a) Perna D em balanceio (0) Não passa o membro E (1) Passa o membro E (0) Pé D não se afasta completamente do solo com o passo (1) Pé D se afasta completamente do solo b) Perna E em balanceio (0) Não passa o membro D (1) Passa o membro D (0) Pé E não se afasta completamente do solo com o passo (1) Pé E se afasta completamente do solo
3) Simetria do passo	(0) Passos D e E desiguais (1) Passos D e E parecem iguais
4) Continuidade do passo	(0) Parada ou descontinuidade entre passos (1) Passos parecem contínuos
5) Desvio da linha reta (Distância aproximada de 3m X 30cm)	(0) Desvio marcado (1) Desvio leve e moderado ou usa dispositivo de auxílio à marcha (2) Caminha em linha reta sem dispositivo de auxílio
6) Tronco	(0) Oscilação marcada ou usa dispositivo de auxílio à marcha (1) Sem oscilação, mas com flexão de joelhos ou dor lombar ou afasta os braços enquanto anda

	(2) Sem oscilação, sem flexão, sem uso dos braços ou de dispositivos de auxílio à marcha
7) Base de apoio	(0) Calcânhares afastados (1) Calcânhares quase se tocando durante a marcha
Escore de marcha:	_____/12

Escore total: ____/28

5 – 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.

Quadril:

Adutor direito: ()

Adutor esquerdo: ()

Joelho:

Quadríceps direito ()

Quadríceps esquerdo ()

Tornozelo:

Flexor plantar direito ()

Flexor plantar esquerdo ()

APÊNDICE B – ESCALA DO GRAU DE AUXÍLIO NA MARCHA

0	Marcha sem auxílio
1	Marcha com auxílio de terceiros
2	Marcha com auxílio de bengala ou muleta unilateral
3	Marcha com auxílio de muletas bilateral
4	Marcha com auxílio de andador
5	Uso de cadeira de rodas

APÊNDICE C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

PADRÃO DE RESPOSTA IMUNOLÓGICA PERIFÉRICA EM PACIENTES INFECTADOS PELO HTLV-1 E SUA CORRELAÇÃO COM AS MANIFESTAÇÕES NEUROLÓGICAS FUNCIONAIS NOS INDIVÍDUOS COM PET/MAH.

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 adoece. 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 Doutorado 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 este estudo. 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.

Participante

Belém __/__/20__

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

Pesquisador

Belém __/__/20__

ANEXOS

ANEXO A – ESCALA MANUAL DE FORÇA MUSCULAR

0	Sem contração (paralisia total)
1	Contração muscular visível ou palpável sem movimentação
2	Movimento ativo com eliminação da gravidade
3	Movimento ativo contra a gravidade
4	Movimento ativo contra resistência
5	Força normal

ANEXO B – 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.

ANEXO C – ESCALA DE EQUILÍBRIO E MOBILIDADE DE TINETTI

Teste de equilíbrio (Teste de Tinetti):

(Instruções: Sujeito sentado em uma cadeira rígida, sem braços)

1) Equilíbrio sentado	(0) Inclina-se ou desliza na cadeira (1) Estável, seguro
2) Levantar-se da cadeira	(0) Incapaz sem ajuda (1) Capaz, usa membros superiores para auxiliar (2) Capaz sem usar membros superiores
3) Tentativas para levantar	(0) Incapaz sem ajuda (1) Capaz, requer mais de uma tentativa (2) Capaz de se levantar, uma tentativa
4) Equilíbrio de pé imediato (primeiros 5 segundos)	(0) Instável (cambaleia, move os pés, oscila o tronco) (1) Estável, mas usa dispositivo de auxílio a marcha (2) Estável, sem dispositivo de auxílio
5) Equilíbrio de pé	(0) Instável (1) Instável, mas aumenta a base de suporte (entre os calcanhares > 10cm de afastamento), usa dispositivo de auxílio (2) Diminuição da base sem dispositivo de auxílio
6) Desequilíbrio no esterno (sujeito na posição de pé com os pés o mais próximo possível, o examinador empurra suavemente o sujeito na altura do esterno com a palma da mão 3 vezes seguidas:	(0) Começa a cair (1) Cambaleia, se agarra e se segura em si mesmo (2) Estável
7) Olhos fechados	(0) Instável (1) Estável
8) Girar 360°	(0) Instabilidade (se agarra, cambaleia) (1) Passos descontinuados (2) Continuidade
9) Sentar-se	(0) Inseguro (não avalia bem a distância, cai na cadeira) (1) Usa os braços ou não tem movimentos suaves (2) Seguro, movimento suave
Score de equilíbrio:	_____/16

Teste de marcha (Teste de Tinetti):

(Instruções: Sujeito de pé com o examinador, caminha num corredor ou na sala, primeiro no seu ritmo usual e, em seguida, rápido, porém muito seguro, com os dispositivos de auxílio à marcha usuais):

1) Iniciação da marcha	(0) Imediato e após o comando “Vá” (qualquer hesitação ou múltiplas tentativas para iniciar) (1) Sem hesitação
2) Comprimento e altura do passo	a) Perna D em balanceio (0) Não passa o membro E (1) Passa o membro E (0) Pé D não se afasta completamente do solo com o passo (1) Pé D se afasta completamente do solo b) Perna E em balanceio (0) Não passa o membro D (1) Passa o membro D (0) Pé E não se afasta completamente do solo com o passo (1) Pé E se afasta completamente do solo
3) Simetria do passo	(0) Passos D e E desiguais (1) Passos D e E parecem iguais
4) Continuidade do passo	(0) Parada ou descontinuidade entre passos (1) Passos parecem contínuos
5) Desvio da linha reta (Distância aproximada de 3m X 30cm)	(0) Desvio marcado (1) Desvio leve e moderado ou usa dispositivo de auxílio à marcha (2) Caminha em linha reta sem dispositivo de auxílio
6) Tronco	(0) Oscilação marcada ou usa dispositivo de auxílio à marcha (1) Sem oscilação, mas com flexão de joelhos ou dor lombar ou afasta os braços enquanto anda (2) Sem oscilação, sem flexão, sem uso dos braços ou de dispositivos de auxílio à marcha
7) Base de apoio	(0) Calcanares afastados (1) Calcanares quase se tocando durante a marcha
Escore de marcha:	_____/12

Escore total: ____/28

ANEXO D – 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:** Nº038/2010-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.