



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS
DOUTORADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS INFECCIOSAS

FLÁVIA DOS SANTOS SOUZA

Estudo de biomarcadores associados à lesão neuronal, inflamação, e migração celular no sistema nervoso central de pacientes com mielopatia associada ao HTLV-1

Rio de Janeiro
2020

Flávia dos Santos Souza

Estudo de biomarcadores associados à lesão neuronal, inflamação, e migração celular no sistema nervoso central de pacientes com mielopatia associada ao HTLV-1

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação *strictu sensu* do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas para obtenção do título de Doutor em Ciências na área de concentração: Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas.

Orientador: Abelardo de Queiroz Campos Araújo, M.D., Ph.D.

Coorientador: Otávio de Melo Espíndola, Ph.D.

Rio de Janeiro

2020

Flávia dos Santos Souza

Estudo de biomarcadores associados à lesão neuronal, inflamação, e migração celular no sistema nervoso central de pacientes com mielopatia associada ao HTLV-1

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação *strictu sensu* do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas para obtenção do título de Doutor em Ciências na área de concentração: Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas.

Orientador: Abelardo de Queiroz Campos Araújo, M.D., Ph.D.

Coorientador: Otávio de Melo Espíndola, Ph.D.

Rio de Janeiro

Aprovada em 22 de dezembro 2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcus Tullius Teixeira da Silva. INI / FIOCRUZ (Presidente).

Prof^a. Dr^a. Juliana Echevarria Neves de Lima. UFRJ (Revisora).

Prof^a. Dr^a. Iranaia Assunção Miranda. UFRJ.

Prof^a. Dr^a. Érica Louro da Fonseca. Biomanguinhos / FIOCRUZ.

Prof^a. Dr^a. Ana Teresa Gomes Fernandes. INI / FIOCRUZ.

Prof. Dr. Marco Antonio Sales Dantas de Lima. INI / FIOCRUZ (Suplente).

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado forças para prosseguir em momentos que achei que não fosse conseguir continuar e desistir.

A minha querida mãe Maria Nazaré, pela dedicação e esforços em me ajudar a cuidar do meu amado filho Miguel Cássio, que nasceu durante o período do curso de pós-graduação, e que sentiu minha falta em muitos momentos durante a realização desse trabalho.

Ao meu companheiro Ernandes Rodrigues pela compreensão pelos momentos de ausência.

Aos orientadores Dr. Abelardo Araujo e Dr. Otávio Espíndola. Em particular, ao Dr. Otávio Espíndola pela sua ajuda nos experimentos, pela paciência e orientação científica e apoio moral.

Aos pós-graduandos do Laboratório de Pesquisa Clínica em Neuroinfecções, pelo auxílio em alguns dos experimentos, ao meu orientador, Dr. Abelardo Araujo e aos demais médicos neurologistas do grupo de pesquisa, Dra. Ana Claudia Leite, Dr. Marco Lima, Dr. Marcus Tullius Silva, pela colaboração no recrutamento dos pacientes e realização de punção lombar para coleta dos materiais.

Ao Rafael Carvalho da Plataforma de Imuno-Análise do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da UFRJ pelo auxílio na utilização do citômetro de fluxo.

À Dra. Juliana Echevarria, do Departamento de Imunologia do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da UFRJ, pelo acompanhamento durante os Seminários.

À Pós-graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, aos coordenadores, docentes e secretárias.

Aos companheiros de trabalho do Setor de Imunodiagnóstico do INI: Aleksandra Faria, Carlos Otávio, Ermita Borges (que me substituiu prontamente e com eficiência nas minhas ausências do setor), Leonardo Neves, Maria Helena, Suely Carvalho e Stephanie Gomes por me ajudarem mesmo que indiretamente. Em particular, agradeço a responsável pelo laboratório, Ingebourg Georg, pela liberação das minhas atividades para realização de disciplinas e cursos.

Meu muito obrigada!!

RESUMO

O vírus linfotrófico para células T humanas do tipo 1 (HTLV-1) é um retrovírus que infecta células T e está associado ao desenvolvimento da mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP). A HAM/TSP resulta de uma resposta inflamatória no sistema nervoso central (SNC) mediada por células T CD8⁺ contra células T infectadas, e através da indução de IFN- γ e quimiocinas induzidas por IFN- γ , promove a desmielinização e degeneração de axônios, principalmente nos tratos corticoespinhais. Diferentes biomarcadores de lesão axonal e neuronal têm sido avaliados e associados a diversas doenças neurodegenerativas, tais como as isoformas da proteína Tau, de proteínas do neurofilamento, e a proteína prion celular (PrPc). Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar os níveis de proteínas associadas ao desenvolvimento de lesão axonal, de fatores proinflamatórios, e de migração celular como potenciais biomarcadores de evolução e/ou prognóstico para a HAM/TSP. Para tal, amostras pareadas de soro e líquido cefalorraquidiano (LCR) de 34 indivíduos, que incluíram 13 portadores assintomáticos (ACs) e 21 pacientes com HAM/TSP, foram analisadas para quantificação das proteínas Tau e sua isoforma fosforilada (pTau-Thr181), as cadeias leve e pesada do neurofilamento (NfL e NfP, respectivamente), PrPc, neopterina, e 13 quimiocinas proinflamatórias (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11, CCL17, CCL20, CXCL1, CXCL5, CXCL8, CXCL9, CXCL10 e CXCL11). Os níveis de Tau, NfL e NfP em amostras de LCR não apresentaram diferença entre os grupos, e pTau-Thr181 foi indetectável em todos os pacientes. Os níveis de PrPc no soro foram semelhantes entre os grupos (Mann-Whitney, $p=0,357$), enquanto no LCR foram observados níveis aumentados em pacientes com HAM/TSP (Mann-Whitney, $p=0,036$). As concentrações de neopterina foram mais elevadas em pacientes com HAM/TSP, tanto no LCR (Teste t de Student, $p<0,0001$) quanto no soro (Mann-Whitney, $p=0,047$). A razão entre os níveis de neopterina no LCR e no soro, que indica o grau de inflamação no SNC, demonstrou que todos os ACs incluídos no estudo apresentaram razão <1 , ou seja, com níveis mais elevados no sangue periférico, enquanto a maioria dos indivíduos com HAM/TSP apresentou razão >1 , sendo essa diferença significativa entre os grupos (Teste t de Student, $p<0,0001$). As quimiocinas CXCL9, CXCL10 e CXCL11 se mostraram elevadas no soro de pacientes com HAM/TSP, enquanto CCL3, CCL4, CCL17, CXCL5 e CXCL11 se mostraram elevadas no LCR nestes indivíduos, embora em baixas concentrações. CCL2 também se mostrou elevada no LCR de pacientes com HAM/TSP (Mann-Whitney, $p=0,034$), e a concentração de CXCL10 foi marcadamente mais elevada em pacientes com HAM/TSP, tanto no soro quanto no LCR (Mann-Whitney, $p=0,002$ e $p<0,0001$, respectivamente), sendo observada uma correlação positiva com a celularidade no LCR destes pacientes. Além disso, a correlação positiva entre o índice de progressão da doença com os níveis de neopterina no LCR permitiu diferenciar indivíduos com progressão rápida/moderada daqueles com progressão lenta. Em conclusão, NfL, NfP, Tau e PrPc não possibilitaram a discriminação entre pacientes com HAM/TSP e ACs. Por outro lado, as concentrações de neopterina, particularmente a razão entre os níveis no LCR e soro, e de CXCL10 no LCR se mostraram bons marcadores de inflamação no SNC e de progressão da HAM/TSP.

Palavras-chave: HTLV-1; Mielopatia Associada ao HTLV-1; biomarcadores; neopterina; quimiocinas.

ABSTRACT

Human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) is a retrovirus that infects T cells and is associated with the development of HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). HAM/TSP results from an inflammatory response in the central nervous system (CNS) mediated by CD8⁺ T cells against infected T cells, which induces IFN- γ and IFN- γ -induced chemokines, promoting demyelination and axon degeneration, particularly in the corticospinal tracts. Distinct biomarkers of axonal and neuronal injury have been evaluated and associated with several neurodegenerative diseases, such as isoforms of the Tau protein, neurofilament proteins, and the cellular prion protein (PrPc). Thus, the objective of this study was to assess the levels of proteins associated with the development of axonal injury, proinflammatory factors, and cell migration as potential biomarkers of evolution and/or prognosis for HAM/TSP. Paired samples of serum and cerebrospinal fluid (CSF) from 34 individuals, including 13 asymptomatic carriers (ACs) and 21 patients with HAM/TSP, were analyzed for the quantification of Tau and its phosphorylated isoform (pTau-Thr181), neurofilament light and heavy chains (NfL and NfP, respectively), PrPc, neopterin, and 13 proinflammatory chemokines (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11, CCL17, CCL20, CXCL1, CXCL5, CXCL8, CXCL9, CXCL10 and CXCL11). The levels of Tau, NfL and NfP in CSF samples did not show differences between groups, and pTau-Thr181 was undetectable in all patients. Serum PrPc levels were similar between groups (Mann-Whitney, $p = 0.357$), but increased in the CSF of patients with HAM/TSP (Mann-Whitney, $p = 0.036$). Neopterin levels were higher in patients with HAM/TSP compared to ACs, both in the CSF (Student's t test, $p < 0.0001$) and in the serum (Mann-Whitney, $p = 0.047$). The ratio between CSF and serum neopterin levels, which indicates inflammation in the CNS, demonstrated that all ACs included in the study had a ratio < 1 (higher levels in peripheral blood), while most individuals with HAM/TSP had a ratio > 1 , with a significant difference between groups (Student's t test, $p < 0.0001$). The levels of CXCL9, CXCL10 and CXCL11 chemokines were elevated in the serum of HAM/TSP patients, while CCL3, CCL4, CCL17, CXCL5 and CXCL11 were elevated in the CSF, although at low concentration. CCL2 was also elevated in the CSF of patients with HAM/TSP (Mann-Whitney, $p = 0.034$), and the concentration of CXCL10 was markedly higher in patients with HAM/TSP, both in serum and CSF (Mann-Whitney, $p = 0.002$ and $p < 0.0001$, respectively), and a positive correlation was observed with CSF cell counts in patients with HAM/TSP. In addition, a positive correlation between the disease progression rate and CSF neopterin levels allowed the differentiation between individuals with fast/moderate and slow disease progression. In conclusion, neurofilament proteins, Tau and PrPc did not allow discrimination between patients with HAM/TSP and ACs. On the other hand, neopterin concentration, particularly the ratio between the CSF and serum levels, and CXCL10 concentration in the CSF, proved to be good markers of CNS inflammation and HAM/TSP progression.

Keywords: HTLV-1; HTLV-1-Associated Myelopathy; biomarkers; neopterin; chemokines.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Distribuição geográfica da infecção pelo HTLV-1 em áreas endêmicas. .	17
Figura 2 – Taxa de prevalência de HTLV 1/2 em doadores de sangue de 26 Estados e do Distrito Federal do Brasil, no período 1995 a 2000.	18
Figura 3 – Logotipo do Dia Mundial do HTLV – 10 novembro.....	20
Figura 4 – Imagem e representação esquemática da partícula de HTLV-1.	21
Figura 5 – Estrutura genômica proviral do HTLV-1.	22
Figura 6 – Esquema das possíveis vias de transmissão de HTLV-1 através de barreira mucosa.....	24
Figura 7 – Ciclo de vida do HTLV-1.	26
Figura 8 – Modelo de transmissão de HTLV-1 por biofilme.	27
Figura 9 – Modelo de transferência de HTLV-1 por conduítes celulares e através de células dendríticas.....	28
Figura 10 – Áreas de migração de linfócitos.	34
Figura 11 – Mecanismo proposto para dano tecidual na HAM/TSP.....	35
Figura 12 – Estrutura da medula espinhal e ressonância magnética de uma medula espinhal atrofica em um paciente com HAM/TSP.	36
Figura 13 – Representação esquemática do curso clínico da HAM/TSP.	38
Figura 14 – Representação esquemática da estrutura das proteínas dos Neurofilamentos.	40
Figura 15 – Representação esquemática do processo de ação da proteína Tau.	42
Figura 16 – Processos fisiológicos e patológicos em que PrPc pode desempenhar um papel.	43
Figura 17 – Formação da 7,8-diidroneopterina e oxidação da neopterina.	45
Figura 18 – Receptores de quimiocinas e seus ligantes.	47
Figura 19 – Fluxograma do processo de seleção de pacientes.	52
Figura 20 – Fluxograma de processamento de amostras biológicas e realização de ensaios.....	54
Figura 21 – Análise do grau de incapacidade de pacientes com HAM/TSP em função do tempo.	63
Figura 22 – Dosagem de proteínas tTau, NfL e NfP em amostras de LCR de indivíduos infectados por HTLV-1.	Erro! Indicador não definido.
Figura 23 – Níveis totais de PrPc livre no soro e LCR.	66
Figura 24 – Quantificação de neopterina em amostras de portadores assintomáticos de infecção por HTLV-1 (AC) (n=13) e de pacientes com HAM/TSP (n=21).	68
Figura 25 – Correlação entre a razão dos níveis de neopterina no LCR e no soro e o índice de progressão de doença.	71
Figura 26 – Comparação dos níveis séricos de quimiocinas da subfamília CC entre ACs e pacientes com HAM/TSP.....	73
Figura 27 – Comparação dos níveis séricos de quimiocinas da subfamília CXC entre ACs e pacientes com HAM/TSP.....	75

Figura 28 – Comparação dos níveis no LCR de quimiocinas da subfamília CC entre ACs e pacientes com HAM/TSP.....	78
Figura 29 – Comparação dos níveis no LCR de quimiocinas da subfamília CXC entre ACs e pacientes com HAM/TSP.....	80
Figura 30 – Correlação entre a razão dos níveis de CXCL10 no LCR e no soro e o índice de progressão de doença.	81
Figura 31 – Razão entre as concentrações de quimiocinas no LCR e soro.	82

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Proteínas do HTLV-1 e suas funções.....	23
Quadro 2 – Perfil dos níveis de neopterinina em ACs.....	70
Quadro 3 – Perfil dos níveis de neopterinina em pacientes com HAM/TSP.	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Caracterização da população de indivíduos infectados por HTLV-1.....	59
Tabela 2 – Quadro clínico da população de indivíduos infectados com HTLV-1.....	60
Tabela 3 – Estatística descritiva de marcadores de lesão axonal.....	65
Tabela 4 – Estatística descritiva de marcadores inflamatórios: Neopterinina.	67
Tabela 5 – Estatística descritiva de marcadores inflamatórios: Quimiocinas séricas.	74
Tabela 6 – Estatística descritiva de marcadores inflamatórios: Quimiocinas séricas.	75
Tabela 7 – Estatística descritiva de marcadores inflamatórios: Quimiocinas no LCR.	77
Tabela 8 – Estatística descritiva de marcadores inflamatórios: Quimiocinas no LCR.	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACs – Portadores Assintomáticos
- APCs – Células Apresentadoras de Antígenos
- ATLL – Leucemia/Linfoma de células T do Adulto
- BHE – Barreira Hematoencefálica
- CPV – carga proviral
- GM-CSF – Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos-Macrófagos
- GTP – Trifosfato de guanosina
- HAM – Mielopatia Associada ao HTLV-1
- HAM/TSP – Mielopatia Associada ao HTLV-1/Paraparesia Espástica Tropical
- HBV – Vírus da Hepatite B
- HBZ – HTLV-1 *Basic leucine Zipper*
- HCV – Vírus da Hepatite C
- HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
- HSPGs – Proteoglicanos de Heparan Sulfato
- HTLV – Vírus Linfotrópico para Células T Humanas
- ICAM-1 – Moléculas de Adesão Intercelular 1
- IL – Interleucina
- IQ₂₅₋₇₅ – Intervalo interquartilico 25%-75%
- LCR – Líquido Cefalorraquidiano
- LTRs – *Long Terminal Repeats*
- MTOC – Centro Organizador de Microtúbulos
- Nf – Proteínas do Neurofilamento
- NfL – Neurofilamento de cadeia leve
- NfM – Neurofilamento de cadeia média
- NfP – Neurofilamento de cadeia pesada
- ORF – *Open Reading Frame*
- PBMC – Célula Mononuclear do Sangue Periférico
- pNfP – Neurofilamento de cadeia pesada fosforilada
- PrPc – Proteína Prion Celular
- pTau – Proteína Tau fosforilada
- SFB – Soro Fetal Bovino

SNP – Sistema Nervoso Periférico

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral alfa

TRE – Elementos Responsivos a Tax

TSP – Paraparesia Espástica Tropical

tTau – Proteína Tau total

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	EPIDEMIOLOGIA DO HTLV-1	16
1.2	O HTLV-1	21
1.3	INFECÇÃO E VIAS DE TRANSMISSÃO VIRAL	23
1.4	CICLO DE REPLICAÇÃO VIRAL	25
1.4.1	Os principais fatores de regulação da replicação viral: Tax e HBZ	29
1.5	PATOGÊNESE DO HTLV-1: PERSISTÊNCIA E RESPOSTA IMUNE	30
1.6	DOENÇA NEUROLÓGICA ASSOCIADA AO HTLV-1	35
1.7	BIOMARCADORES DE LESÃO AXONAL	38
1.7.1	Proteínas do Neurofilamento	39
1.7.2	Proteína Tau	41
1.7.3	Proteína príon celular (PrPc)	43
1.8	Marcadores de inflamação e migração celular: Neopterina e quimiocinas	44
2	JUSTIFICATIVA	48
3	OBJETIVO GERAL	49
4	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	50
5	METODOLOGIA	50
5.1	DESENHO DO ESTUDO E CASUÍSTICA	50
5.2	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO NA PESQUISA	51
5.3	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	51
5.4	CÁLCULO AMOSTRAL	52
5.5	PLANO DE RECRUTAMENTO	53
5.6	COLETA DE DADOS E DE MATERIAL BIOLÓGICO	53
5.7	RISCOS ASSOCIADOS	55
5.8	DETERMINAÇÃO DA CARGA PROVIRAL DE HTLV-1 EM PBMCs	55
5.9	DOSAGEM DE NEOPTERINA E DE QUIMIOCINAS PROINFLAMATÓRIAS NO SORO E NO LCR	55
5.10	DOSAGEM DE PROTEÍNAS ASSOCIADAS À LESÃO AXONAL E PRPC	56
5.11	ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS	57
5.12	PLANO DE ANÁLISE	58
6	RESULTADOS	59

6.1	ASPECTOS GERAIS E CLÍNICOS DA POPULAÇÃO DO ESTUDO	59
6.2	MARCADORES DE LESÃO NEURONAL	64
6.3	QUANTIFICAÇÃO DE NÍVEIS TOTAIS DE PrP _c	66
6.4	MARCADORES DE INFLAMAÇÃO E MIGRAÇÃO CELULAR: NEOPTERINA	67
6.5	MARCADORES DE INFLAMAÇÃO E MIGRAÇÃO CELULAR: QUIMIOCINAS	72
7	DISCUSSÃO	85
8	CONCLUSÕES	96
	REFERÊNCIAS	97
	ANEXO A	109
	ANEXO B	111
	ANEXO C	114
	ANEXO D	116
	APÊNDICE A – Caracterização da população do estudo: portadores assintomáticos.	122
	APÊNDICE B – Caracterização da população do estudo: pacientes com HAM/TSP.	123

1 INTRODUÇÃO

O Vírus Linfotrófico para Células T Humanas (HTLV) foi o primeiro retrovírus a ser descrito com potencial oncogênico para humanos, sendo identificado como agente etiológico da Leucemia/Linfoma de células T do Adulto (ATLL). O HTLV foi inicialmente isolado em 1980 a partir de fragmento de biópsia de pele de um paciente de 28 anos com linfoma cutâneo de células T. As partículas virais apresentavam diâmetro de 100 a 110 nm e continham RNA como material genético, e atividade de uma enzima que polimerizava moléculas de DNA a partir de moléculas de RNA, a Transcriptase Reversa (COFFIN, 2015; POIESZ et al., 1980). Nessa mesma época, pesquisadores japoneses isolaram um retrovírus denominado por eles de ATL (Vírus da Leucemia de Células T do Adulto). Posteriormente, foi demonstrado que o HTLV e ATL eram o mesmo vírus (TAKATSUKI, 2005). Esse vírus foi denominado HTLV-1 após o isolamento de um segundo HTLV a partir de amostra de um paciente de 37 anos com um tipo diferente de leucemia de células T, denominada tricoleucemia. O HTLV-2, apesar de distinto, se mostrava intimamente relacionado ao HTLV-1, e fora também descrito pelo grupo de pesquisa de Robert Gallo (COFFIN, 2015; KALYANARAMAN et al., 1982). Por sua vez, GESSAIN et al. (1985), demonstraram a relação do HTLV-1 com uma mielopatia comum nos trópicos, chamada de Paraparesia Espástica Tropical (TSP), em estudo conduzido na Martinica, Caribe. No ano seguinte, OSAME et al. (1986) demonstraram a associação de HTLV-1 com uma mielopatia em pacientes que viviam na região de Kagoshima, no sudoeste do Japão, e por não se tratar de um país tropical, o termo Mielopatia Associada ao HTLV-1 (HAM) foi proposto. Mais tarde, foi verificado que a TSP e a HAM se tratavam da mesma doença e, portanto, foi criado o termo combinado HAM/TSP (Mielopatia Associada ao HTLV-1/Paraparesia Espástica Tropical), conforme recomendação da OMS, que é amplamente utilizado atualmente (ARAUJO; SILVA, 2006; CATALAN-SOARES; PROIETTI, 2001).

Em 2005, foram descobertos outros dois vírus relacionados ao HTLV, HTLV-3 e HTLV-4, em indivíduos assintomáticos residentes do sul dos Camarões, cujas sorologias foram indeterminadas para HTLV-1/2. Contudo, ainda não há evidências de que sejam patogênicos para humanos (CARNEIRO-PROIETTI, 2015; MAHIEUX; GESSAIN, 2009).

Diferentemente do HIV-1 (Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1), o HTLV-1 apresenta baixa variabilidade genética intra e inter-indivíduos. A pouca variação na sequência pode ser usada como uma ferramenta molecular na obtenção de informações sobre a origem e a migração de populações infectadas pelo HTLV-1 (GESSAIN; CASSAR, 2012). O HTLV-1 é atualmente classificado em sete subtipos (subtipos A a G) com base nas diferenças das sequências de DNA proviral das regiões *env* e LTRs (*Long Terminal Repeats*), não havendo descrição que relacione um subtipo viral ao potencial patogênico de HTLV-1. A grande maioria das infecções é causada pelo subtipo cosmopolita A, endêmico em diferentes regiões do mundo. Também foram descritos os subtipos B, D, F e G da África Central, o subtipo E da África do Sul e Central, e o subtipo C da Melanésia, e há poucos relatos na literatura sobre os subtipos E, F e G (BANGHAM et al., 2015; GESSAIN; CASSAR, 2012; GONÇALVES et al., 2010; PROIETTI et al., 2005).

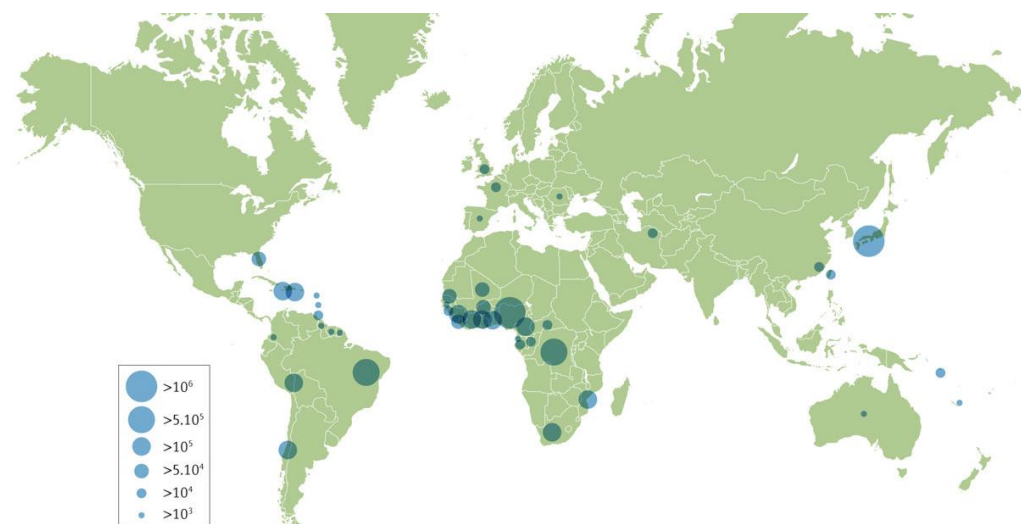
1.1 EPIDEMIOLOGIA DO HTLV-1

Estima-se que 5 a 10 milhões de indivíduos sejam portadores da infecção por HTLV-1 em todo o mundo. Essa estimativa se baseia em estudos realizados em áreas sabidamente endêmicas e em estudos epidemiológicos com amostras de gestantes, doadores de sangue, ou diferentes grupos populacionais selecionados. No entanto, acredita-se que o número de portadores de HTLV-1 é subestimado (GESSAIN; CASSAR, 2012).

A infecção pelo HTLV-1 apresenta distribuição global, porém, possui uma característica distinta, estando presente em agrupamentos de áreas geográficas com alta endemicidade ao lado de áreas com baixa prevalência (GESSAIN; CASSAR, 2012). Áreas de alta prevalência de HTLV-1 são definidas por frequências acima de um indivíduo infectado por 10.000 doadores de sangue, ou por 1.000 pessoas na população geral (BANGHAM et al., 2015). Os focos de alta endemicidade se encontram no Japão, Caribe, África, Oriente Médio e América do Sul (Figura 1). Os países com o maior número estimado de pessoas infectadas pelo HTLV-1 são o Japão e o Brasil, cada um com mais de um milhão de indivíduos infectados. O sudoeste do Japão representa a região mais endêmica do mundo, com prevalência alcançando

taxas de 30% a 40% (GESSAIN; CASSAR, 2012). Certas áreas endêmicas são limitadas a pequenas regiões isoladas, tais como: grupos aborígenes na Austrália; em Mashad, Irã; na província de Fujian, China; em Tumaco, Colômbia, uma ilha habitada principalmente por afro-descendentes, e reconhecida pela elevada prevalência de HAM/TSP. Na Europa, cerca de 80% dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 é de origem direta ou descendente de imigrantes de áreas de alta endemicidade, tais como Índia e África, a exceção da Romênia, a única área verdadeiramente endêmica para HTLV-1 na Europa. Essa variabilidade na prevalência tem sido atribuída à predominância da transmissão vertical do HTLV-1 (BANGHAM et al., 2015; GESSAIN; CASSAR, 2012).

Figura 1 – Distribuição geográfica da infecção pelo HTLV-1 em áreas endêmicas.



Nota: Os círculos mostram o número estimado de indivíduos infectados pelo HTLV-1. Em alguns países, as áreas endêmicas para HTLV-1 são limitadas a determinadas regiões, como em Mashad, Irã; na Província de Fujian, China; em Tumaco, Colômbia; e na Austrália Central.

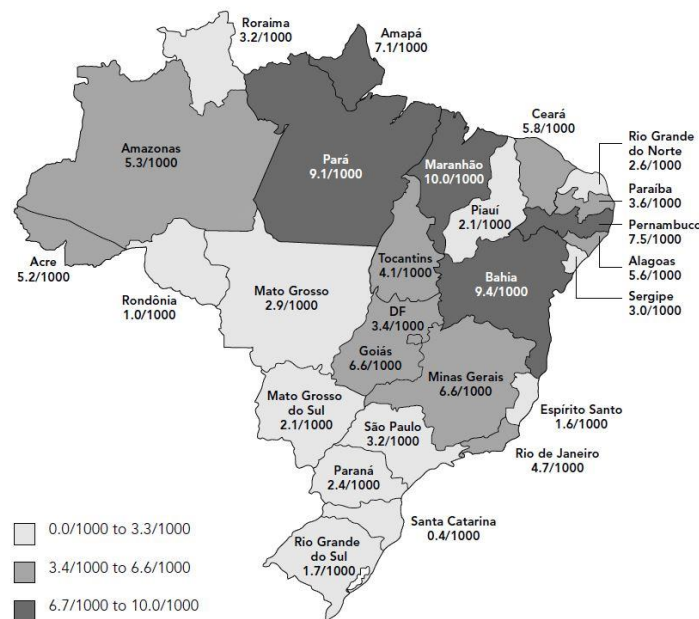
Fonte: Adaptada de BANGHAM et al. (2015) e GESSAIN; CASSAR (2012).

Em áreas endêmicas, as taxas de soroprevalência para HTLV-1 são muito dependentes da idade e do sexo. A soroprevalência aumenta com a idade, sendo muito baixa na infância, e aumentando a partir da adolescência e início da idade adulta. A frequência de infecção por HTLV-1 é mais alta em mulheres, e a proporção de mulheres para homens aumenta acima dos 50 anos. A maior prevalência em mulheres resulta de uma maior eficiência da transmissão via contato sexual ocorrer do homem para a mulher, do que o inverso. A maior prevalência com a idade também

pode ser explicada pela soroconversão tardia ou por efeito de coorte (BANGHAM et al., 2015; CARNEIRO-PROIETTI et al., 2002; PROIETTI et al., 2005).

No Brasil, existem poucos estudos que reflitam a realidade de todo o país. Estudos multicêntricos baseados na triagem sorológica de hemocentros revelaram uma prevalência média de 0,46% de portadores da infecção por HTLV-1/2, sendo as maiores frequências encontradas em capitais das regiões Norte e Nordeste, e as menores na região Sul (Figura 2). Acredita-se que o Brasil possa abrigar o maior número absoluto de pessoas soropositivas para HTLV-1/2, devido ao tamanho absoluto de sua população. Considerando estes dados, estima-se que cerca de 2,5 milhões de indivíduos possam estar infectados pelo HTLV-1/2 no Brasil (CARNEIRO-PROIETTI et al., 2002; CATALAN-SOARES; CARNEIRO-PROIETTI; PROIETTI, 2005).

Figura 2 – Taxa de prevalência de HTLV 1/2 em doadores de sangue de 26 Estados e do Distrito Federal do Brasil, no período 1995 a 2000.



Fonte: Adaptada de CATALAN-SOARES; CARNEIRO-PROIETTI; PROIETTI (2005).

A variabilidade geográfica da prevalência de HTLV-1/2 entre doadores de sangue no Brasil é influenciada por três possíveis fatores: a migração pré-histórica da população da Ásia pela América do Norte, atingindo primeiramente as regiões Norte e Nordeste; o comércio de africanos escravizados durante a colonização portuguesa, principalmente para o Sudeste e Nordeste; e a intensa imigração japonesa durante a

primeira metade do século XX, principalmente para o estado de São Paulo (CATALAN-SOARES; CARNEIRO-PROIETTI; PROIETTI, 2005).

Atualmente, o Estado da Bahia possui a maior taxa de infecção por HTLV-1 no Brasil, sendo a infecção pelo vírus disseminada por todo o estado, com média de 14,4 soropositivos por 100.000 habitantes, o que representa uma prevalência de HTLV-1 em 0,84% da população. Essa estimativa teve como base um estudo epidemiológico com doadores de sangue, gestantes e indivíduos sintomáticos atendidos no sistema público de saúde do estado da Bahia. Os resultados também indicaram um progressivo aumento no número de portadores de HTLV-1 em todas as microrregiões, principalmente após 2008. Ainda observaram que as microrregiões com predominância de comunidades quilombolas apresentaram as maiores taxas de prevalência de HTLV-1, apontando para a possibilidade do vírus ter sido introduzido no país com o tráfico de escravizados trazidos da África (FIOCRUZ, 2019).

Em 1993, o Ministério da Saúde implantou a triagem obrigatória de HTLV em bancos de sangue (Portaria 1376, 19/11/93), e em 2009, estendeu a obrigatoriedade à doadores de órgãos (Portaria 2600, 21/10/09), dada a importância da transmissão do vírus por via sanguínea (PUCCIONI-SOHLER et al., 2019).

Em regiões endêmicas, a transmissão de HTLV-1 ocorre principalmente pelo aleitamento materno, sendo a taxa de transmissão estimada em 10 a 25%, com aumento gradativo do risco quanto mais longo for o período de amamentação, ou seja, maior que seis meses, e quanto mais elevada também for a carga proviral materna. A triagem prenatal e a recomendação às portadoras de HTLV-1 de não amamentarem têm sido utilizadas como medidas preventivas para reduzir a transmissão da mãe para o filho, cuja eficácia tem sido comprovada no Japão, em que foi estabelecido um programa nacional para prevenção da transmissão vertical de HTLV, que foi reduzida em cerca de 80% (CARPENTIER et al., 2015; GROSS; THOMA-KRESS, 2016; PIQUE; JONES, 2012; ROSADAS et al., 2018).

No Brasil, a estimativa de prevalência do HTLV em gestantes varia entre 0,1 a 1,05% por região, sendo a região Nordeste com a maior prevalência. O Ministério da Saúde recomenda a restrição parcial ou total do aleitamento materno para mães infectadas com HTLV-1/2, e a transmissão da mãe para o filho via intrauterina ou periparto parecem ser menos importantes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015; PROIETTI et al., 2005; PUCCIONI-SOHLER et al., 2019; ROSADAS et al., 2018).

A soropositividade para o HTLV-1 também está associada a sexo sem uso de preservativo, múltiplos parceiros sexuais e presença de feridas ou úlceras genitais, como ocorre com outras doenças sexualmente transmissíveis. A transmissão sexual do HTLV-1 acontece de maneira mais eficiente de homens para mulheres, enquanto o inverso, ou seja, a transmissão de mulheres para homens, é maior entre homens que tenham outras doenças sexualmente transmissíveis, tais como sífilis ou herpes, que promovem úlceras genitais, interrompendo o epitélio e facilitando a transmissão (GROSS; THOMA-KRESS, 2016; PIQUE; JONES, 2012; PROIETTI et al., 2005).

Em um estudo realizado na cidade de Salvador, Bahia, os resultados sugeriram que o contato sexual representa a principal via de transmissão do HTLV-1 na população geral (NUNES et al., 2017; PUCCIONI-SOHLER et al., 2019).

Para conscientizar sobre a infecção e doenças associadas ao HTLV, um vírus tão negligenciado pela sociedade e profissionais da saúde, a Associação Internacional de Retrovirologia (IRVA – *International Retrovirology Association*) instituiu, em 10 de novembro de 2018, o Dia Mundial do HTLV (Figura 3). A infecção causada por esse vírus é na maioria dos casos assintomática, não apresenta cura, e o tratamento é direcionado para cada uma das diferentes doenças associadas à infecção, objetivando atenuar os sintomas. Por isso, serviços de aconselhamento são primordiais, e envolvem não somente indivíduos infectados, mas também seus familiares, de modo a interromper a cadeia de transmissão viral (BIBLIOTECA VIRTUAL EM SAÚDE, 2019; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019; PUCCIONI-SOHLER et al., 2019).

Figura 3 – Logotipo do Dia Mundial do HTLV – 10 novembro.

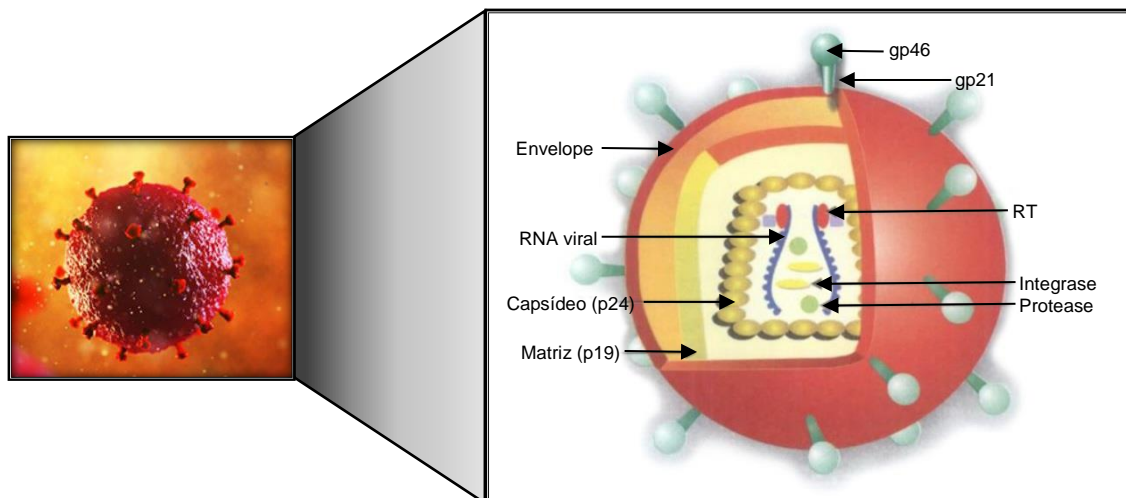


Fonte: Imagem extraída da página da BIBLIOTECA VIRTUAL EM SAÚDE, 2019.

1.2 O HTLV-1

O HTLV é um oncovírus pertencente à família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae*, gênero *Deltaretrovirus*. Suas partículas são envelopadas, com morfologia semelhante à dos demais retrovírus, sendo de esférica a pleomórfica, apresentando projeções ou espículas que recobrem a sua superfície, constituídas pelas proteínas de superfície (gp46) e transmembrana (gp21). Associada ao envelope está a proteína de matriz (p19), e mais internamente encontra-se o capsídeo (p24), de forma poliédrica e que abriga um genoma com duas moléculas de RNA de cadeia simples e de polaridade positiva, com cerca de 9 kilobases de comprimento, que estão associadas às enzimas virais transcriptase reversa, integrase e protease (Figura 4) (CAO et al., 2015; CARNEIRO-PROIETTI, 2015).

Figura 4 – Imagem e representação esquemática da partícula de HTLV-1.

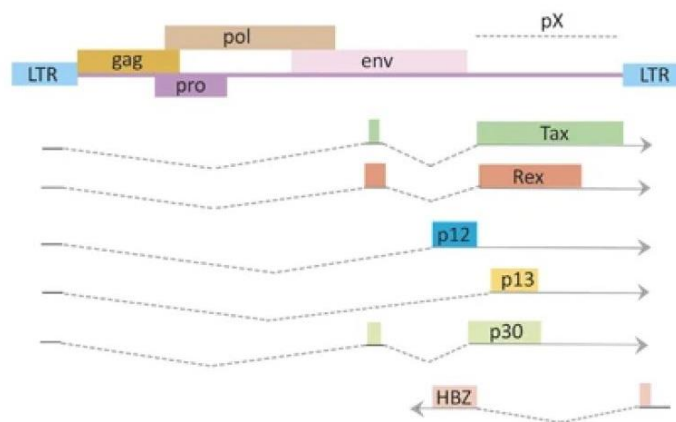


Fonte: Adaptada de <https://agencia.fiocruz.br/estudo-aponta-disseminacao-de-infeccao-por-htlv-na-bahia> e http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cd08_08.pdf.

O genoma do HTLV-1 é complexo e codifica para proteínas estruturais e enzimas comuns a outros retrovírus através dos genes *gag*, *pol* e *env*. O gene *gag* codifica para as proteínas do nucleocapsídeo e do capsídeo viral, *pol* codifica para enzimas com funções de transcrição reversa, protease e integrase, enquanto *env* codifica proteínas do envelope, relacionadas à infecção viral. Além desses, outros genes estão presentes entre as regiões *env* e a 3'-LTR, denominada de *pX*. Os principais produtos codificados por essa região são as proteínas Tax e Rex, que

regulam a transcrição e replicação viral, além de proteínas acessórias, tais como p12, p13, p30 e HBZ (*HTLV-1 Basic Leucine Zipper*), que são importantes para o potencial infeccioso e a persistência viral *in vivo* (Figura 5). O genoma de HTLV-1 quando integrado ao DNA da célula é denominado provírus, e admite-se que cada célula infectada carrega uma única cópia proviral. O Quadro 1 resume as principais funções das proteínas codificadas pelo genoma de HTLV-1. O provírus ainda apresenta em suas extremidades 5' e 3' as sequências repetidas denominadas de LTRs. Na 5'-LTR são encontradas sequências de repetições imperfeitas de 21pb de nucleotídeos denominadas Elementos Responsivos a Tax (TRE – *Tax responsive elements*), que são necessárias para a ativação transcricional pela proteína Tax, e na 3'-LTR, em particular, estão presentes elementos que controlam a transcrição de HBZ, a terminação de mRNA e sinais de poliadenilação (BANGHAM et al., 2015; GROSS; THOMA-KRESS, 2016; JOHNSON; HARROD; FRANCHINI, 2001; MATSUOKA; JEANG, 2011).

Figura 5 – Estrutura genômica proviral do HTLV-1.



Nota: Estrutura genômica do provírus HTLV-1. Os genes estruturais *gag*, *pol* e *env* são flanqueados por LTRs 5' e 3'. A região *pX* e seus produtos são mostrados como Tax, Rex e a ORF (*Open Reading Frame*) anti-senso *hbz*.

Fonte: Adaptada de MATSUOKA; JEANG (2011).

Quadro 1 – Proteínas do HTLV-1 e suas funções.

HTLV-1 proteínas e glicoproteínas	Funções
Proteínas de envelope (codificadas por env)	
Proteína de superfície (gp46)	Liga-se ao receptor da célula hospedeira.
Glicoproteína transmembrana (gp21)	Ancora a gp46 ao envelope e promove fusão de membranas.
Proteínas estruturais (codificadas por gag)	
Proteína Matriz (p19)	Organizam componentes virais na membrana celular interna.
Proteína de Capsídeo (p24)	Protege RNA viral e proteínas (capsídeo central).
Proteína de Nucleocapsídeo (p15)	Proteína associada aos ácidos nucleicos.
Proteínas Funcionais (codificadas por pol)	
Protease (p14)	Cliva poliproteínas, gerando componentes funcionais.
Transcriptase reversa (p95)	Converte RNA de fita simples em DNA de fita dupla.
Integrase	Facilita a inserção do provírus no DNA celular.
Proteínas reguladoras (codificadas por pX)	
Tax (p40)	Ativa a transcrição proviral e de uma ampla variedade de genes celulares. Desregula fatores que controlam o ciclo celular e imortaliza células T.
Rex	Regulador pós-transcricional da expressão gênica viral; Modula o transporte de RNA viral.
p12^I	Replicação viral e ativação de células T; Liga-se às cadeias β e γ do receptor de IL-2 e a cadeia pesada do MHC I.
p13^{II}	Interfere na proliferação e transformação celular; Promove apoptose; Necessária para a manutenção de altas cargas virais <i>in vivo</i> ; Pode interferir na função mitocondrial.
p30^{III}	Modula a transcrição de genes celulares; Necessária para a manutenção de altas cargas virais <i>in vivo</i> .
HBZ (codificada pela fita negativa)	Regula a transcrição viral e dá suporte à proliferação de células infectadas.

Fonte: Adaptada de CARNEIRO-PROIETTI (2015) e JOHNSON; HARROD; FRANCHINI (2001).

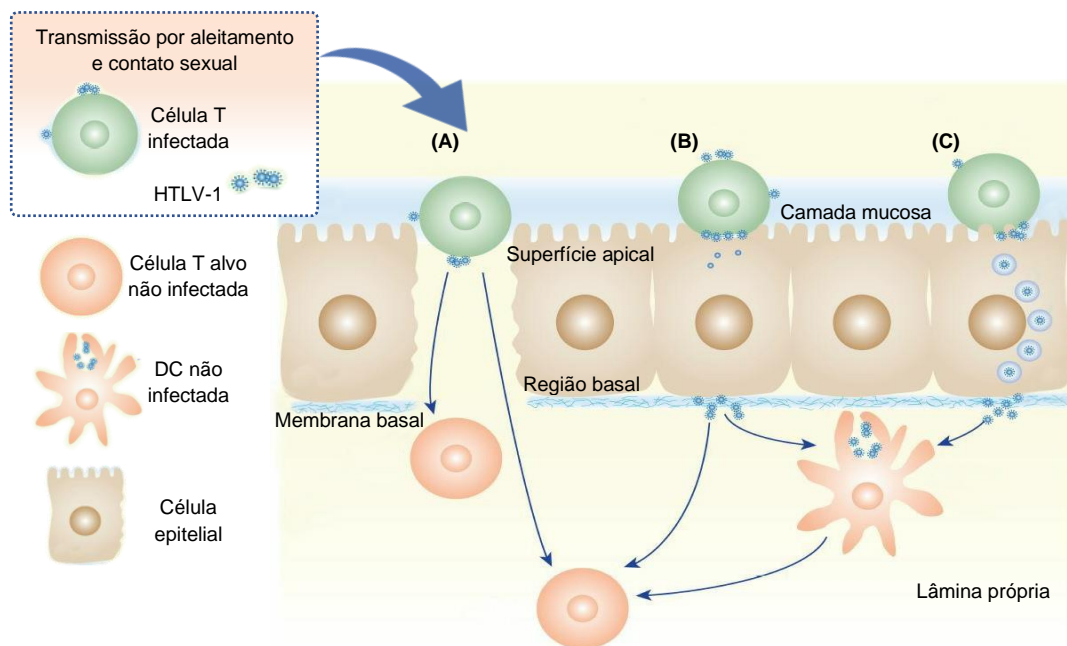
1.3 INFECÇÃO E VIAS DE TRANSMISSÃO VIRAL

O HTLV-1 infecta uma ampla variedade de células *in vitro*, embora *in vivo* infecte principalmente linfócitos T, sobretudo linfócitos T CD4⁺, que constituem aproximadamente 95% da carga proviral (CPV). Contudo, outros tipos celulares também são infectados, tais como linfócitos T CD8⁺ e, raramente, células dendríticas, monócitos e macrófagos. A CPV representa o número de células carregando o provírus de HTLV-1 em função do número de leucócitos do sangue periférico ou de células mononucleares do sangue periférico (PBMC), sendo geralmente expressa em

percentual (BANGHAM et al., 2015; CARPENTIER et al., 2015; GROSS; THOMA-KRESS, 2016).

In vivo, HTLV-1 está associado a células, e partículas virais ou virions livres de células são dificilmente detectados no sangue, e apresentam baixo potencial infeccioso. Por outro lado, linfócitos infectados produzem uma quantidade limitada de virions, dentre os quais 1 em cada 10^5 a 10^6 é infeccioso (BANGHAM et al., 2015; GROSS; THOMA-KRESS, 2016; IGAKURA et al., 2003). Por isso, a transmissão eficiente do vírus ocorre através de fluidos corporais que contenham células, tais como sangue, sêmen e leite materno. Portanto, a infecção primária inicial pelo HTLV-1 requer interação com a mucosa oral, gastrointestinal ou cervical, exceto na contaminação por via sanguínea (CARPENTIER et al., 2015; PIQUE; JONES, 2012). Para isso é necessária a transposição da barreira constituída pela mucosa, o que pode ocorrer por diferentes vias, como mostram os modelos na Figura 6.

Figura 6 – Esquema das possíveis vias de transmissão de HTLV-1 através de barreira mucosa.



Nota: Esquema de possíveis vias de transmissão do HTLV-1: Exceto pela transferência de sangue, a infecção inicial requer a passagem pela barreira da mucosa por vários mecanismos: (A) As células infectadas por HTLV-1 podem atravessar a barreira por sítios em que a mucosa se encontra lesionada, ou por transmigração (não apresentada); (B) liberação de partículas virais recém-produzidas na superfície basal de células epiteliais e (C) por transcitose.

Fonte: Adaptado de CARPENTIER et al. (2015) e PIQUE; JONES (2012).

Como também se observa na transmissão de HIV, macrófagos infectados por HTLV-1 podem transmigrar através do epitélio intacto. As células infectadas podem atravessar o epitélio por sítios em que a integridade da mucosa foi comprometida (Figura 6A), ou ainda, podem se ligar à face apical das células epiteliais, que produzem novos virions que são liberados na região basal (Figura 6B). Finalmente, virions produzidos por células T infectadas são transmitidos através da barreira epitelial intacta, onde são capturados e transportados por vesículas da superfície apical para a região basal, onde são liberados, atravessando assim o epitélio por um processo denominado transcitose (Figura 6C) (CARPENTIER et al., 2015; PIQUE; JONES, 2012).

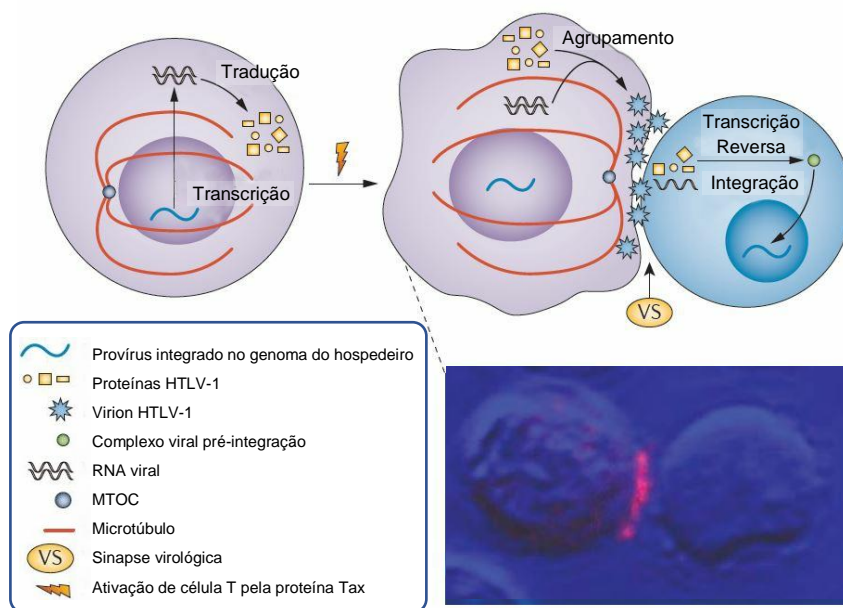
A transmissão pelo sangue pode ocorrer por transfusão de sangue total ou por produtos contendo células sanguíneas, assim como pelo compartilhamento de agulhas por usuários de drogas injetáveis. Por não haver uma barreira física, o modo de transferência do vírus, nesse caso, se dá por interações diretas das células do indivíduo infectado com células-alvo do receptor (PIQUE; JONES, 2012). Ainda é desconhecida quais são os primeiros tipos celulares do hospedeiro a serem infectados pelo HTLV-1 *in vivo*, porém suspeita-se que células dendríticas estejam também envolvidas nesse processo devido à facilidade de infecção dessas células pelo HTLV-1 *in vitro* (GROSS; THOMA-KRESS, 2016).

1.4 CICLO DE REPLICAÇÃO VIRAL

Após a infecção primária, observa-se a expansão do número de células infectadas por HTLV-1 através de novos ciclos de infecção. Neste caso, a transmissão ocorre por contato célula-célula, sendo o RNA genômico viral transcrito pela enzima transcriptase reversa em uma fita dupla de DNA viral, e transportada para o núcleo, onde é inserida no DNA celular pela ação da integrase viral, formando o provírus. A partir da integração do provírus, tem início a fase de replicação, com a expressão de proteínas virais por meio de atividades metabólicas da célula, ocorrendo por fim o brotamento de novos virions. Outro modo de replicação envolve a expansão clonal, em que células contendo o provírus sofrem divisão mitótica. A infecção das células ocorre principalmente na mucosa, no sangue periférico ou em órgãos linfóides

secundários. A disseminação célula-célula de HTLV-1 envolve diferentes mecanismos, que requerem a coordenação de etapas do ciclo de infecção viral, incluindo processos como adesão entre células e interações específicas entre proteínas celulares e virais. Dois tipos de interações celulares foram descritas como críticas para a transmissão de HTLV-1: a formação de condúites celulares, e as formas de contato célula-célula mediadas pela sinapse virológica (Figura 7) e pelo biofilme viral (CARPENTIER et al., 2015; GROSS; THOMA-KRESS, 2016).

Figura 7 – Ciclo de vida do HTLV-1.



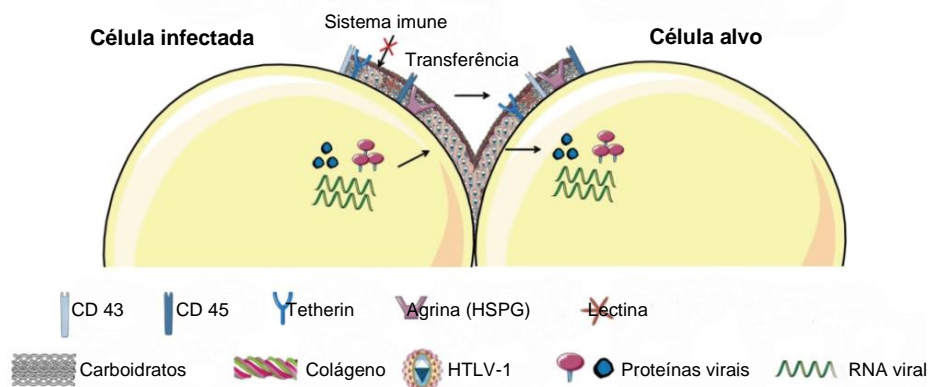
Fonte: Adaptado de BANGHAM et al. (2015) e microscopia confocal de IGAKURA et al. (2003).

Na célula infectada, o provírus é transcrito em RNAs mensageiros (mRNAs) e estes são traduzidos para a geração de proteínas estruturais e reguladoras da replicação viral. Tal expressão é estimulada pela proteína Tax, que ativa a célula e induz o aumento da expressão de Moléculas de Adesão Intercelular 1 (ICAM-1) em sua superfície (BANGHAM et al., 2015; CARPENTIER et al., 2015). Dessa forma, a interação de células infectadas expressando ICAM-1 com células-alvo expressando o Antígeno 1 associado à Função Linfocítica (LFA-1), somada aos sinais induzidos pela proteína Tax, desencadeia a reorganização do citoesqueleto na célula infectada e a polarização do Centro Organizador de Microtúbulos (MTOC) para a região da junção célula-célula, formando a sinapse virológica (Figura 7), que é responsável por promover a transmissão direcionada do vírus. O complexo Gag, Env e os RNAs

genômicos virais são transportados pelos microtúbulos e se acumulam na sinapse virológica, onde os virions são formados e brotam a partir da membrana plasmática. Os virions ao atravessarem a fenda extracelular, dentro ou na periferia da sinapse virológica, se ligam aos receptores para HTLV-1 na célula-alvo não infectada, e com a fusão das membranas da célula e do envelope viral, liberam seu conteúdo no citoplasma (BANGHAM et al., 2015; GROSS; THOMA-KRESS, 2016). Três receptores de membrana interagem com as espículas do envelope viral e permitem a ligação e internalização do HTLV-1: proteoglicanos de heparan sulfato (HSPGs) e a neuropilina-1, que permitem a ligação inicial da partícula à célula, e o transportador de glicose 1 (GLUT-1), que possibilita a internalização (CARPENTIER et al., 2015; PIQUE; JONES, 2012). Após a liberação do RNA genômico no citoplasma, ocorre a sua transcrição em DNA, e a integração proviral. Por sua vez, este é replicado junto com o DNA celular e transmitido às células descendentes (ZHANG et al., 2015).

O biofilme viral é constituído por uma matriz extracelular especializada na superfície das células infectadas, composto por carboidratos e outros componentes, tais como HSPGs, colágeno, lectinas celulares, e receptores de superfície glicosilados (CD43, CD45) (Figura 8). Nesse mecanismo de transmissão, os virions são concentrados nessa matriz extracelular e são rapidamente transferidos para células-alvo, sendo assim protegidos do reconhecimento imunológico pelo biofilme (GROSS; THOMA-KRESS, 2016; PIQUE; JONES, 2012).

Figura 8 – Modelo de transmissão de HTLV-1 por biofilme.

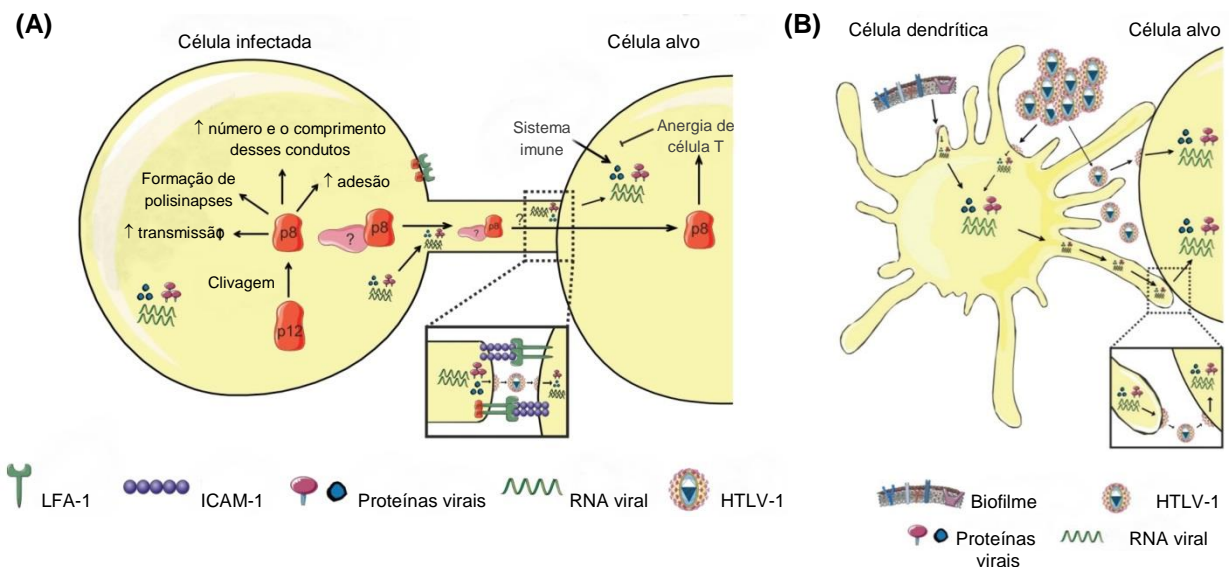


Fonte: Adaptada de GROSS; THOMA-KRESS (2016).

Outro modo de transmissão do HTLV-1 é pela transferência de partículas de uma célula infectada para outra não infectada, porém, sem um contato muito próximo,

o que ocorre pela emissão de extensões transitórias da membrana, denominadas de condúites celulares (Figura 9A). Como na sinapse virológica, virions de HTLV-1 se concentram no ponto de contato entre os condúites da célula infectada e a célula-alvo, ou entre o condúite e a célula-alvo, sugerindo ser uma espécie de sinapse virológica, e tais estruturas seriam induzidas pela proteína acessória viral p8 (GROSS; THOMA-KRESS, 2016). Essa proteína é um produto de clivagem da proteína precursora p12 codificada pela região *pX* do genoma de HTLV-1 e teria um papel no aprimoramento das interações LFA-1/ICAM-1. Dessa forma, foi observado que a superexpressão de p8 em células infectadas com HTLV-1 aumenta o número e o comprimento desses condúites, bem como o número de contatos entre células infectadas e não infectadas. Existem indícios de que a proteína p8 poderia ser transferida para células-alvo e induziria a anergia em células T, diminuindo a sinalização do receptor de células T (TCR) e favorecendo a persistência viral em um indivíduo imuno competente. Portanto, esta seria uma das estratégias do HTLV-1 para evitar a vigilância imunológica durante a infecção (GROSS; THOMA-KRESS, 2016; PIQUE; JONES, 2012).

Figura 9 – Modelo de transferência de HTLV-1 por condúites celulares e através de células dendríticas.



Legenda: (A) Condúite celular e (B) Transmissão de HTLV-1 via células dendríticas.

Fonte: Adaptada de GROSS; THOMA-KRESS (2016).

Além de ser transmitido entre células T, HTLV-1 também pode ser transmitido de células dendríticas para as células T CD4⁺ (Figura 9B). Esse tipo de transmissão

foi identificado em estudos que demonstraram que células dendríticas infectadas com HTLV-1 isoladas de sangue periférico de portadores de HTLV-1 transmitiram a infecção de forma eficiente para células T *in vitro*. Foi demonstrado que a infecção de células T mediada por células dendríticas pode ocorrer de dois modos: células dendríticas são infectadas e os virions produzidos são transferidos para células T, ou através de infecção em *trans*, em que as células dendríticas não infectadas capturam partículas de HTLV-1 produzidas por células T infectadas, e transmitem estes vírus às células-alvo antes mesmo que se infectem (GROSS; THOMA-KRESS, 2016; PIQUE; JONES, 2012).

Em resumo, nos estágios iniciais da infecção por HTLV-1, a replicação viral ocorre por contato entre células T, principalmente por linfócitos T CD4⁺, e, posteriormente, persiste por proliferação clonal das células infectadas, sendo que essas duas vias de replicação requerem a expressão viral, o que estimula uma resposta imune do hospedeiro. Para a sobrevivência das células infectadas ou geração de infecção persistente e crônica pelo vírus é necessário o estabelecimento de um equilíbrio entre expressão viral e respostas imunes do indivíduo. Repetidos ciclos de expressão viral seguidos por períodos de diminuição da transcrição viral desafiam continuamente a resposta imune, iniciando processos inflamatórios que se tornam crônicos, como na HAM/TSP. Ou ainda, o surgimento de mutações esporádicas no genoma celular e a proliferação celular acelerada, que podem levar a transformação maligna e o desenvolvimento da ATLL (CARPENTIER et al., 2015; MATSUOKA; JEANG, 2011).

1.4.1 Os principais fatores de regulação da replicação viral: Tax e HBZ

Os genes reguladores mais importantes da transcrição e replicação de HTLV-1 são *tax* e *hbz*. Os modos de ação das proteínas codificadas por esses genes envolvem diversas vias de sinalização celular e promovem proliferação e persistência das células infectadas. Tax ativa diferentes genes celulares, tais como os que codificam para a cadeia α do receptor de interleucina (IL)-2 (CD25), interferon- γ (IFN- γ) e ICAM-1. Tax também inibe a verificação e reparo do DNA, ativa e induz a proliferação do ciclo celular. Diferentemente de Tax, a proteína HBZ é menos

imunogênica e expressa constitutivamente em células ATLL durante a infecção. Além disso, através de seu efeito em nível de transcrição e tradução, HBZ promove a proliferação de células infectadas. Assim, a expansão de células infectadas pode tornar-se independente de Tax e ser promovida por HBZ. Esse fator também se opõe a muitos dos efeitos de Tax, cuja expressão permite estimar o risco de desenvolvimento de HAM/TSP, enquanto HBZ se correlaciona positivamente com a gravidade dos sintomas (BANGHAM et al., 2015; CARPENTIER et al., 2015).

1.5 PATOGÊNESE DO HTLV-1: PERSISTÊNCIA E RESPOSTA IMUNE

A infecção por HTLV-1 persiste indefinidamente no indivíduo infectado e isso não necessariamente gera processos patogênicos em seus portadores. Estima-se que mais de 90% dos indivíduos infectados permanecem assintomáticos ao longo da vida (ROMANELLI; CARAMELLI; PROIETTI, 2010). Por outro lado, de 0,5 a 5% dos indivíduos evoluem para a HAM/TSP ou ATLL após um prolongado período de infecção (de 20 a 40 anos) (ARAUJO; SILVA, 2006), e os fatores que favorecem o desenvolvimento destas doenças ainda não são completamente compreendidos. Entretanto, diferentes fatores estão envolvidos na interação vírus-hospedeiro, e o modo como esta interação se desenvolve determina o desfecho da infecção, ou seja, se os portadores permanecerão assintomáticos ou se desenvolverão ATLL ou doenças inflamatórias crônicas, das quais a mais conhecida e estudada é a HAM/TSP (ASQUITH; BANGHAM, 2008; CARNEIRO-PROIETTI, 2015).

A CPV de HTLV-1 pode comprometer mais de 30% das PBMCs, sendo essas, em sua maioria, células T CD4⁺, que são mantidas principalmente pela proliferação mitótica, em vez de ciclos de replicação viral. Isso pode ser reforçado pelo fato do genoma de HTLV-1 ser muito estável, mesmo com a transcriptase reversa sendo altamente propensa a erros durante a transcrição, além da presença de grandes populações clonais de células infectadas, indicando que ocorrem poucos ciclos de replicação com a participação da transcriptase reversa. A mitose contínua de células infectadas requer por sua vez a expressão de genes de HTLV-1. No entanto, essa expressão persistente de mRNAs é baixa, na proporção de aproximadamente 1/5.000 células. Com isso, a CPV de um indivíduo atinge um ponto de equilíbrio que

normalmente pode variar em torno de cinco vezes a mediana observada ao longo do tempo (ASQUITH et al., 2007; ASQUITH; BANGHAM, 2008; BANGHAM; OSAME, 2005).

Níveis elevados de CPV de HTLV-1 em sangue periférico, que representa o número de leucócitos carreando o provírus de HTLV-1, tem se mostrado um fator de risco para o desenvolvimento de doenças associadas a esta infecção (OLINDO et al., 2005; SILVA et al., 2007). Além disso, tem sido demonstrado que indivíduos com HAM/TSP apresentam níveis mais elevados de CPV no líquido cefalorraquidiano (LCR) do que no sangue periférico, sendo observado o contrário em portadores assintomáticos (ACs) (LEZIN et al., 2005). No entanto, TAKENOUCI et al. (2003) descreveram que os níveis de CPV de HTLV-1 em sangue periférico ou no LCR, ou ainda, a razão dos níveis de CPV no LCR e sangue, não apresentam correlação com o grau de incapacidade motora. Com isso, tem sido sugerido que o valor preditivo da CPV de HTLV-1 é demasiadamente baixo para qualificar esta variável como um marcador de progressão da doença na prática clínica (SATO et al., 2013).

Na infecção por HTLV-1, o nível da CPV de um indivíduo resulta da dinâmica entre a taxa de proliferação das células infectadas e a eficiência da resposta imune do indivíduo (ASQUITH; BANGHAM, 2008). No entanto, diferentes determinantes influenciam tal desfecho. Um destes fatores é o controle da expressão viral nas células infectadas. Uma das características de células T CD4⁺ e CD8⁺ de pacientes infectados por HTLV-1 é a capacidade de proliferação espontânea *in vitro* (PRINCE et al., 1994). Tem sido demonstrado que a proteína Tax de HTLV-1 apresenta diferentes funções, sendo observada sua interação com membros de diferentes famílias de fatores de transcrição, incluindo CREB/ATF, o fator de resposta ao soro (SRF), o fator nuclear de células T ativadas (NFAT), e o fator nuclear kB (NF-kB) (AZRAN; SCHAVINSKY-KHRAPUNSKY; ABOUD, 2004; BOXUS et al., 2008). Dessa forma, Tax regula a expressão de genes virais e a função de diferentes genes celulares relacionados ao controle dos processos de proliferação, diferenciação e morte celular, de reorganização do citoesqueleto, e de reparo do DNA (NEJMEDDINE et al., 2005; NEUVEUT; JEANG, 2000; SAGGIORO, 2011). Com isso, a ativação proporcionada pela proteína Tax (HIGUCHI; FUJII, 2009; SUN; YAMAOKA, 2005) leva à expressão aumentada de diversas citocinas e seus receptores nas células infectadas, tais como IL-2, CD25, IL-15, IFN- γ , dentre outras, que estimulam a proliferação de linfócitos T (BANGHAM, 2003; BARMAK et al., 2003; BOXUS et al., 2008; ESPÍNDOLA et al.,

2015; HIGUCHI et al., 1997; NISHIURA et al., 1996). Corroborando tais observações, estudos *in vivo* mostraram a proliferação seletiva de células T infectadas expressando Tax, especialmente em populações de células T de memória CD4⁺CD45RO⁺ e CD8⁺CD45RO⁺ (ASQUITH et al., 2007).

Com relação à patogênese da HAM/TSP, acredita-se que respostas citotóxicas promovidas por células T CD8⁺ ou linfócitos T citotóxicos (CTLs) contra células T infectadas no sistema nervoso central (SNC) resultariam na produção de citocinas inflamatórias, induzindo de forma indireta a lesão neuronal (BANGHAM et al., 2015). Esses CTLs específicos para HTLV-1 são abundantes no sangue periférico e sua frequência é proporcional a CPV do indivíduo. Essas células, que têm como principal alvo a proteína Tax, estão continuamente ativadas e expressando genes relacionados à lise linfocitária, tanto em ACs quanto em pacientes com HAM/TSP, indicando que há constante expressão viral. A ação de CTLs é capaz de destruir tanto a bainha de mielina quanto axônios, resultando em desmielinização e degeneração axonal. Os CTLs também são especialmente ativos em indivíduos com baixa CPV, e são associados ao controle efetivo da infecção. Por isso, ACs tendem a apresentar níveis de carga proviral mais baixos que indivíduos que desenvolvem HAM/TSP (BANGHAM et al., 2015; BANGHAM; OSAME, 2005; RIBAS; MELO, 2002).

Apesar da intensa resposta de CTLs específicos para HTLV-1 observada na maioria dos indivíduos infectados, o vírus persiste quando linfócitos T CD4⁺ infectados expressam espontaneamente a proteína Tax, o que leva ao estímulo da mitose nestas células, mantendo assim a CPV. No entanto, CTLs são capazes de eliminar essas células T CD4⁺ antes de completarem o ciclo de replicação viral. Assim, a vigilância eficiente de CTLs diminui a frequência de células expressando Tax na circulação para um nível abaixo do limite de detecção, gerando assim um equilíbrio dinâmico entre a replicação/expressão viral e a resposta imune contra HTLV-1. Além disso, o controle eficiente da replicação viral também está associado ao reconhecimento de antígenos da proteína HBZ por CTLs, que é pouco imunogênica (BANGHAM et al., 2015; BANGHAM; OSAME, 2005).

O polimorfismo genético no hospedeiro, principalmente no que se refere a determinadas variantes de alelos de moléculas de MHC de classe I, parecem estar associados a uma menor CPV e, por isso, a um menor risco de desenvolver HAM/TSP. Moléculas de MHC-I são responsáveis por apresentar antígenos para CTLs, enquanto moléculas de MHC-II apresentam antígenos para células T CD4⁺. Portanto, a

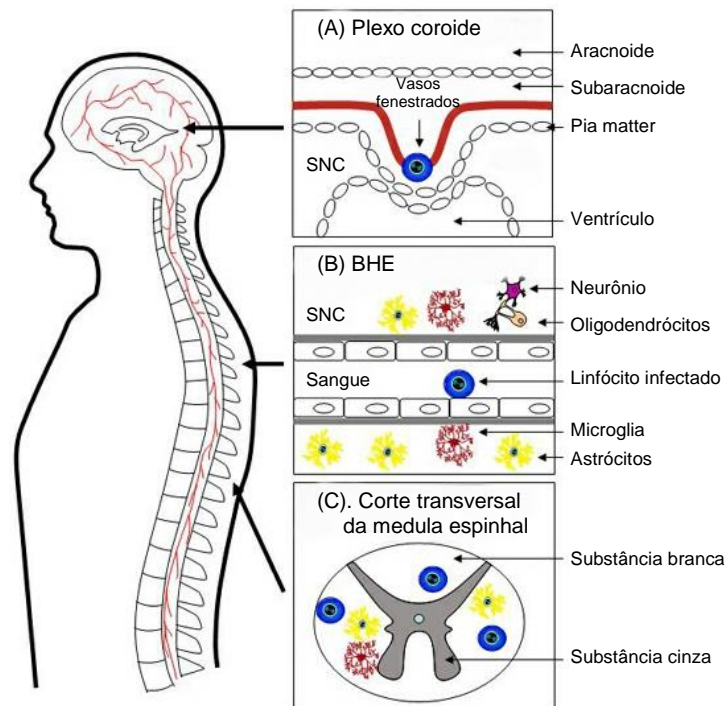
qualidade da resposta dos CTLs do hospedeiro pode determinar o ponto de equilíbrio da CPV e, conseqüentemente, o risco de desenvolvimento de doenças inflamatórias como a HAM/TSP. Além disso, diferenças no controle da CPV entre pacientes com HAM/TSP e ACs sugerem que a resposta lítica de CTLs se mostra ineficaz na HAM/TSP, ou que outros fatores anulariam a influência da ação de CTLs no controle da CPV em pacientes com a doença. A presença de variantes de alelos de MHC-I e elevada frequência de CTLs anti-HTLV-1, porém ineficientes, poderiam contribuir para a lesão inflamatória do SNC (ASQUITH; BANGHAM, 2008; BANGHAM et al., 2015; BANGHAM; OSAME, 2005).

As células T CD4⁺ específicas para HTLV-1 são produtoras de IFN- γ e sua frequência é 10 a 25 vezes maior em pacientes com HAM/TSP do que em ACs com CPV semelhante. Essa diferença na frequência de células T CD4⁺ entre esses dois grupos é maior que a diferença de duas a quatro vezes observadas na frequência de CTLs entre grupos, mesmo na presença de níveis semelhantes de CPV. O antígeno dominante de HTLV-1 reconhecido por células T CD4⁺ deriva da proteína Env. Provavelmente, essas células contribuem para o dano inflamatório do tecido nervoso observado na HAM/TSP, especialmente por predominarem precocemente em lesões inflamatórias no SNC (BANGHAM, 2003; BANGHAM; OSAME, 2005).

Os mecanismos precisos pelos quais essas lesões são formadas e mantidas ainda não foram totalmente esclarecidos, mas apresentam o envolvimento de astrócitos ativados, que induzem a secreção de quimiocinas proinflamatórias e o recrutamento de células T CD4⁺ e CD8⁺ do sangue periférico específicas para antígenos de HTLV-1. Os astrócitos são as células mais abundantes do SNC e estão envolvidos na manutenção da integridade física da barreira hematoencefálica (BHE), fornecendo nutrientes aos neurônios, mantendo a integridade estrutural do SNC e também atuam como células do sistema imunológico (LEPOUTRE et al., 2009).

A barreira hematoencefálica é uma barreira com permeabilidade altamente seletiva composta por uma membrana basal, células endoteliais especializadas e astrócitos. Para atravessar a barreira hematoencefálica, os leucócitos precisam migrar pelas artérias carótidas internas e chegar ao plexo coroide, onde o LCR é sintetizado. Isso tudo por interações através de moléculas de adesão e migração. Os leucócitos infiltrados seguem o caminho do LCR através dos ventrículos do plexo coroide para o espaço subaracnoideo, sendo liberados ao redor do SNC (Figura 10).

Figura 10 – Áreas de migração de linfócitos.



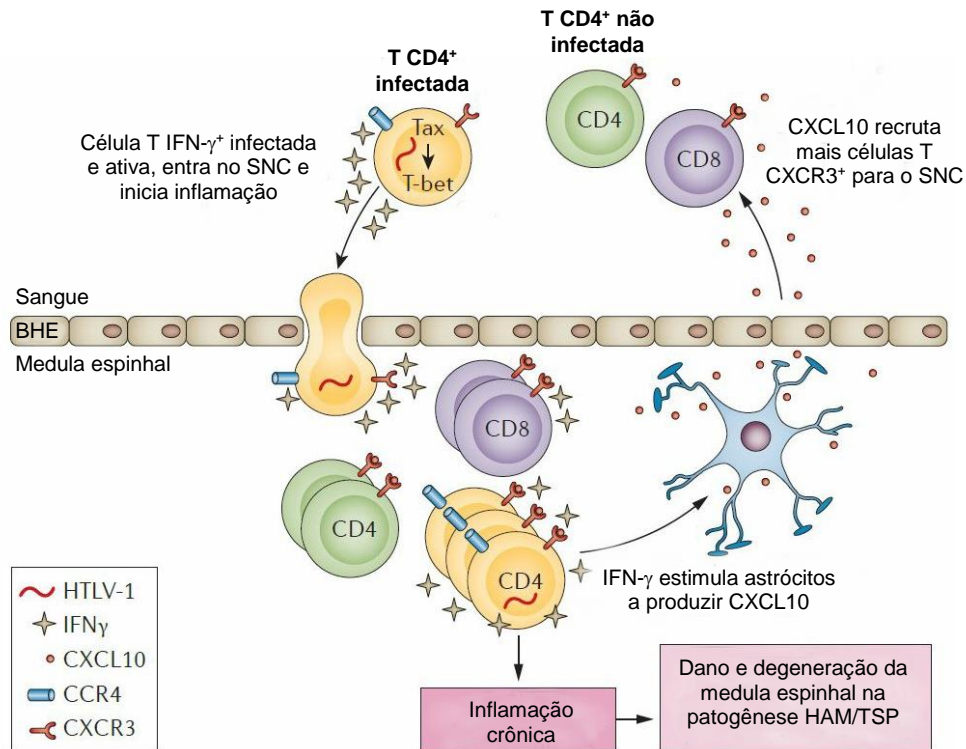
Nota: Linfócitos reguladores e linfócitos infectados por HTLV-1 podem acessar o sistema nervoso central (SNC) pela interface da barreira hematoencefálica (BHE) no plexo coroide. (A) Os ventrículos no espaço subaracnoide são fenestrados e os linfócitos se agregam neste espaço. (B) Linfócitos infectados por HTLV-1 ativados podem entrar no SNC através da BHE e se agregarem no espaço perivascular. (C) Representação de um corte transversal da medula espinhal torácica. Os linfócitos infiltram a medula espinhal torácica em áreas de inflamação e desmielinização, localizadas nas áreas laterais do trato corticoespinhal.

Fonte: Adaptada de LEPOUTRE et al. (2009).

ANDO et al. (2013) propôs um mecanismo para o dano tecidual na HAM/TSP (Figura 11). A infecção pelo HTLV-1 provoca alterações nas células T infectadas que produzem $\text{IFN-}\gamma$ espontaneamente. No SNC, essa citocina, inicialmente liberada por linfócitos T infectados, induz os astrócitos a secretarem a quimiocina CXCL10, ligante de CXCR3. CXCL10 induz a migração de células pró-inflamatórias com o receptor CXCR3 do sangue periférico para o SNC, recrutando mais células T CD4^+ infectadas para o local da lesão, assim como linfócitos T CD8^+ , incluindo CTLs específicos para HTLV-1, que possuem um alto potencial de secreção de $\text{IFN-}\gamma$. Assim, uma alça de feedback positivo é estabelecida, resultando em uma alta concentração local de $\text{IFN-}\gamma$ que provoca uma inflamação crônica e o subsequente dano ao tecido neural. Portanto, a patogênese da HAM/TSP exhibe envolvimento de células do tipo Th1, que parece ser intensificado pelas características das células T infectadas. Além disso, tem sido sugerida a possibilidade de predisposição genética para maior produção de $\text{IFN-}\gamma$ e/ou CXCL10 em resposta a infecção por HTLV-1, fortalecendo a razão da

dominância de respostas Th1, o que explicaria porque alguns indivíduos infectados desenvolvem doença enquanto outros permanecem assintomáticos ao longo da vida (ANDO et al., 2013; BANGHAM et al., 2015).

Figura 11 – Mecanismo proposto para dano tecidual na HAM/TSP.



Nota: A expressão da proteína Tax de HTLV-1 ativa células T infectadas, que atravessam a barreira hematoencefálica (BHE) para o sistema nervoso central (SNC). O interferon (IFN)- γ secretado por células T infectadas estimula astrócitos a secretarem a quimiocina CXCL10, que recruta mais células T expressando o receptor CXCR3, estabelecendo um foco de inflamação. T-bet é um fator de transcrição que regula o programa de diferenciação de células Th1. O receptor CCR4 liga a quimiocina CCL22, secretada pelas células T que expressam Tax e aumenta a sobrevivência de células CCR4.

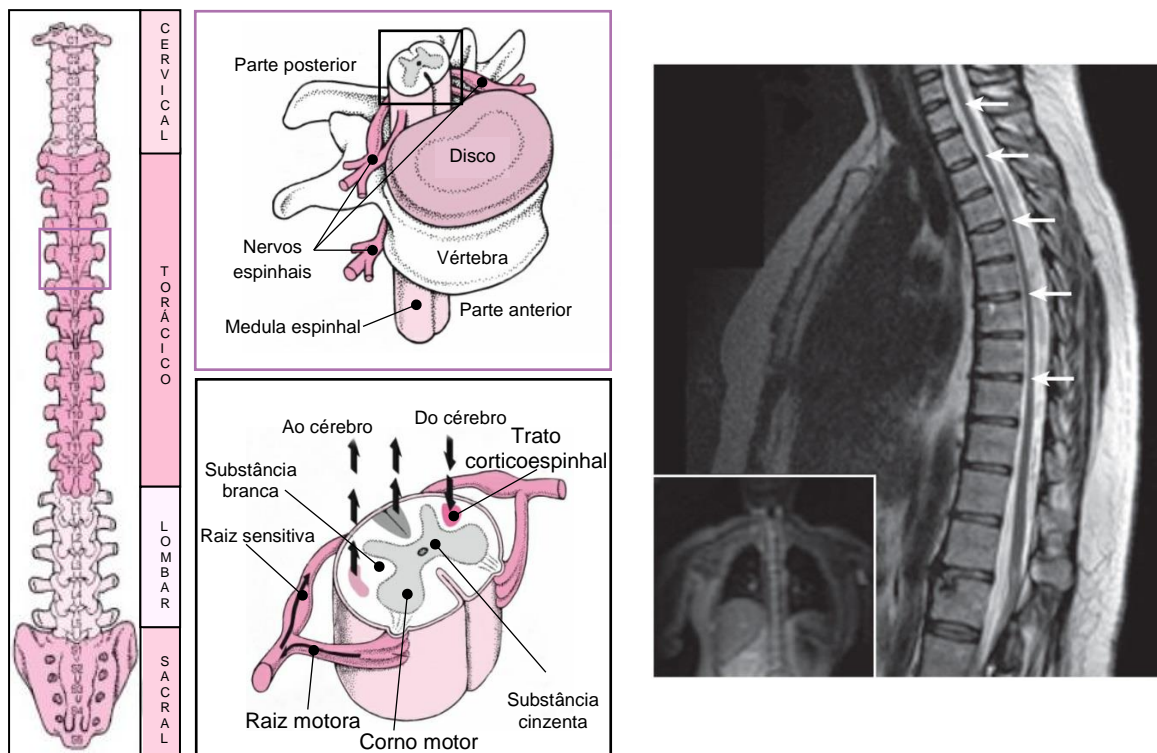
Fonte: Adaptado de BANGHAM et al., 2015.

1.6 DOENÇA NEUROLÓGICA ASSOCIADA AO HTLV-1

A HAM/TSP é uma doença incapacitante, geralmente de início insidioso, que atinge principalmente a substância branca dos funículos laterais da medula espinhal,

principalmente nos segmentos torácico e lombar, mas com pouco envolvimento da substância cinzenta. No encéfalo podem ser observadas áreas de inflamação perivascular na substância branca cerebral. Os tratos corticoespinhais ou piramidais (Figura 12), que se originam no córtex cerebral e conduzem impulsos nervosos aos neurônios motores da medula espinhal, sendo um dos principais feixes de fibras responsáveis pela motricidade voluntária, são os mais comprometidos (CARNEIRO-PROIETTI, 2015; LEPOUTRE et al., 2009; NAGAI; OSAME, 2003).

Figura 12 – Estrutura da medula espinhal e ressonância magnética de uma medula espinhal atrófica em um paciente com HAM/TSP.



Nota: Estrutura da medula espinhal, os tratos corticoespinhais – conduzem os sinais para mover um músculo do cérebro até o corno motor; os cornos motores – possuem células nervosas que transmitem os sinais a partir do cérebro ou da medula espinhal pela raiz motora; a raiz motora –transporta os impulsos a partir da medula espinhal até os músculos para estimular o movimento. Na foto da ressonância magnética de um paciente com HAM/TSP, as setas indicam a medula espinhal anormalmente fina (parte escura).

Fonte: Adaptada de <https://www.msmanuals.com/pt/casa/disturbios-cerebrais,-da-medula-espinhal-e-dos-nervos/doencas-da-medula-espinhal/consideracoes-gerais-sobre-doencas-da-medula-espinhal> e foto da ressonância magnética de BANGHAM et al. (2015).

As alterações inflamatórias levam a infiltração linfocitária perivascular, desmielinização, degeneração axonal e gliose. O infiltrado de células mononucleares é denso ao redor dos vasos, consistindo principalmente de linfócitos T CD4⁺, que predominam nas lesões ativas primárias, e a proporção de linfócitos T CD8⁺ aumenta à medida que a lesão progride (ARAUJO; SILVA, 2006; BANGHAM et al., 2015).

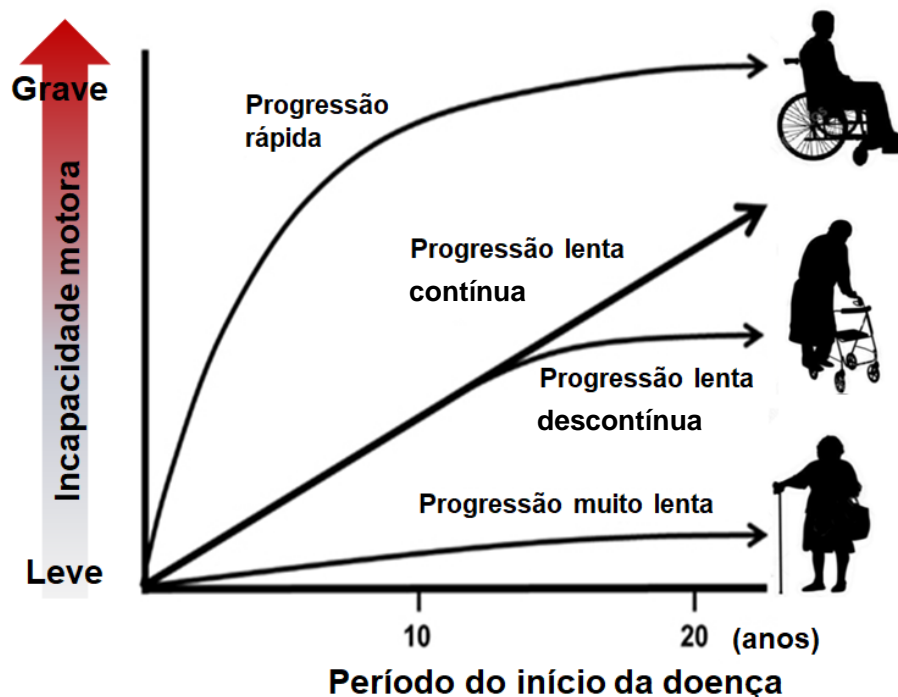
A evolução clínica é caracterizada por espasticidade e fraqueza, com maior acometimento dos músculos proximais dos membros inferiores, comumente unilateral, podendo se tornar bilateral, e está associado à síndrome piramidal: hiper-reflexia, clônus e sinal de Babinski (reflexo cutâneo plantar). Esses sintomas causam distúrbios na marcha, que se torna espástica, resultando em diminuição da velocidade e comprometimento do equilíbrio dinâmico. Dessa forma, o paciente passa a necessitar de auxílio progressivo para deambular, sendo o estágio final representado pelo uso permanente de cadeiras de rodas. Dor lombar baixa com irradiação para os membros inferiores e sintomas sensitivos, como parestesia nos membros inferiores (formigamento, agulhadas e queimação), são comuns. Geralmente é acompanhada de alterações esfinterianas, incluindo disfunção intestinal e da bexiga. As infecções urinárias de repetição e outros quadros relacionados ao trato urinário constituem complicações comuns. Impotência e diminuição da libido também são frequentes. A ressonância magnética do SNC pode revelar alterações macroscópicas após meses ou anos de progressão da inflamação, como a atrofia medular, principalmente no segmento torácico (Figura 12) (ARAUJO; SILVA, 2006; CARNEIRO-PROIETTI, 2015; RIBAS; MELO, 2002). As primeiras manifestações da doença ocorrem na terceira e quarta décadas de vida, e a incidência e velocidade de progressão da HAM/TSP têm se mostrado mais elevada em mulheres do que em homens, principalmente após a primeira gravidez e antes da menopausa, sugerindo alguma influência hormonal na sua patogênese (ARAUJO; SILVA, 2006; LEPOUTRE et al., 2009; RIBAS; MELO, 2002; UCHIYAMA et al., 1977).

Além disso, a infecção por HTLV-1 também tem sido relacionada a outras manifestações, tais como dermatite infecciosa (BITTENCOURT; DE OLIVEIRA, 2010), xerose (LENZI et al., 2003), polimiosite (DOUEN; PRINGLE; GUBERMAN, 1997; HIGUCHI et al., 1995), uveíte (KAMOI; MOCHIZUKI, 2012; MERLE et al., 2002), bexiga neurogênica isolada (SAITO et al., 1991; SILVA et al., 2007), neuropatia periférica (LEITE et al., 2004), alterações cognitivas (SILVA et al., 2003) e disautonômicas (ALAMY et al., 2001).

Conforme descrição clássica, a HAM/TSP apresenta progressão lenta, sem indícios de remissão. A progressão rápida é considerada como a progressão que leva a incapacidade de deambulação em um período menor que dois anos do início dos sintomas (CARNEIRO-PROIETTI, 2015). Tem sido observado que 8% até 21,5% dos pacientes apresentam rápido declínio do quadro neurológico (Figura 13), com perda

da capacidade motora e necessidade do uso de cadeiras de rodas em até dois anos do início dos sintomas, sendo observada idade média mais elevada do início dos sintomas nesses indivíduos (GOTUZZO et al., 2004; LIMA et al., 2007; YAMANO; SATO, 2012). Contudo, a diferenciação destes dois grupos somente é possível pela observação da evolução clínica. Por outro lado, a aplicação de medidas terapêuticas baseadas no uso de imunossupressores, se iniciadas quando do aparecimento de sintomas, beneficiam o paciente, pois reduzem a velocidade de progressão da doença (SATO et al., 2013). Dessa forma, a pesquisa de biomarcadores que possibilitem a definição de prognósticos mais precisos se faz necessária, permitindo assim a prescrição de terapias mais adequadas.

Figura 13 – Representação esquemática do curso clínico da HAM/TSP.



Fonte: Adaptada de YAMANO; SATO, (2012).

1.7 BIOMARCADORES DE LESÃO AXONAL

Os danos e perdas axonais e neuronais provocam alterações neurológicas que levam a incapacidades permanentes. À medida que os danos ocorrem, vários componentes do processo patológico são expressos ou liberados, como fatores de neuroinflamação e de morte celular. De modo geral, um processo neuroinflamatório

significativo inicia a ativação da micróglia residente, que coopera para remover os resíduos de morte celular e produtos liberados por axônios danificados. As citocinas e quimiocinas secretadas desencadeiam a apoptose em alguns dos neurônios e células da glia, enquanto recrutam e estimulam astrócitos para iniciar o processo de formação cicatricial. Com o tempo, durante a fase crônica, os astrócitos secretam diferentes tipos de proteoglicanos, formando uma barreira física e química conhecida como cicatriz glial ou gliose, que inibe a regeneração dos axônios. Assim, a capacidade de detectar e acompanhar tais danos através de métodos para fornecer um diagnóstico clínico rápido e simples seria uma grande vantagem na avaliação da atividade da doença e prognóstico, e também no monitoramento das respostas ao tratamento (ALBAYAR et al., 2019; KHALIL et al., 2018).

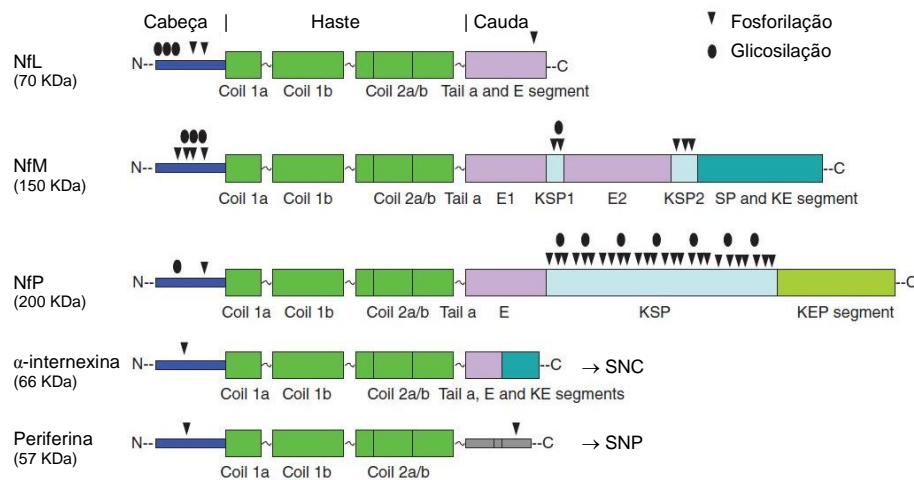
1.7.1 Proteínas do Neurofilamento

Diferentes biomarcadores de lesão neuronal têm sido avaliados em portadores de alterações neurológicas, tais como esclerose múltipla, doença de Alzheimer, esclerose lateral amiotrófica, meningites virais e bacterianas, demência associada à infecção pelo HIV, assim como a HAM/TSP (ALBERTI et al., 2009; GAIOTTINO et al., 2013; GISSLEN et al., 2009; KRUT et al., 2013; TEUNISSEN; KHALIL, 2012; VILLAR et al., 2015). Neste panorama, a dosagem de proteínas do neurofilamento (Nf) tem se firmado como um método de determinação da lesão neuroaxonal porque são abundantes e os principais componentes do citoesqueleto, e são altamente específicas para neurônios, atingindo níveis anormais no LCR e no soro como resultado de danos axonais em diferentes doenças neurodegenerativas, inflamatórias, bem como vasculares e traumáticas. Portanto, altos níveis de Nf são indicadores de danos axonais independentemente de sua causa (KHALIL et al., 2018; VILLAR et al., 2015).

As proteínas do Nf são classificadas como filamentos intermediários de aproximadamente 10 nm de diâmetro, consistindo predominantemente de três subunidades: Nf de cadeia leve (NfL), de cadeia média (NfM), de cadeia pesada (NfP). A α -internexina é a quarta subunidade no SNC, enquanto a periferina esta associada aos Nf no sistema nervoso periférico (SNP) (Figura 14). Em condições normais, os

neurofilamentos são altamente estáveis dentro dos axônios e sua reciclagem em neurônios é lenta. As funções dos Nfs incluem crescimento radial e estabilidade dos axônios, permitindo uma condução nervosa eficaz, além de manter a estabilidade mitocondrial e do conteúdo dos microtúbulos. Eles são mais expressos em grandes axônios mielinizados, no entanto, a quantidade de proteínas de Nfs pode diferir muito ao longo de um único axônio, sendo três vezes maiores nas regiões mielinizadas dos axônios do que nos nós de Ranvier (GAFSON et al., 2020; KHALIL et al., 2018; PETZOLD, 2005; YUAN et al., 2017).

Figura 14 – Representação esquemática da estrutura das proteínas dos Neurofilamentos.



Nota: Todas as proteínas de filamentos intermediários têm um domínio central conservado responsável pela formação de estruturas de bobinas em espiral. Flanqueando a haste central estão as regiões variáveis amino e carboxi terminais. As subunidades NfM e NfP possuem longos domínios carboxi-terminais com várias repetições Lys-Ser-Pro que são fortemente fosforiladas.

Fonte: Adaptada de YUAN et al. (2017).

A subunidade NfL é o principal componente estrutural dos axônios mielinizados, e a sua dosagem no LCR têm se mostrado um sensível indicador de lesão axonal no SNC nas formas progressivas da esclerose múltipla, sendo seu nível elevado no LCR associado a um prognóstico desfavorável na forma remitente-recorrente (SALZER; SVENNINGSSON; SUNDSTRÖM, 2010; TRENTINI et al., 2014), assim como em indivíduos infectados pelo HIV-1, mesmo naqueles identificados como neuroassintomáticos (ANDERSON et al., 2015). Nos portadores de infecção pelo HIV-1, foi observado que os níveis de NfL se correlacionam positivamente com os níveis de neopterina e de albumina, o que sugere uma associação entre a lesão axonal, a neuroinflamação e a permeabilidade da barreira

hematoencefálica, indicando que este seja um biomarcador sensível para determinação de danos cerebrais subclínicos e clínicos (ABDULLE et al., 2007; GISSLÉN et al., 2007; HAGBERG et al., 2010; KRUT et al., 2014). MCGUIRE et al. (2015) também observaram que os níveis de NfL correlacionam positivamente com a concentração das formas solúveis de CD163 e CD14, demonstrando que a ativação de monócitos no SNC de portadores do HIV-1 está diretamente associada com a lesão neuronal em todos os estágios da demência associada a esta infecção. Por outro lado, ALBERTI et al. (2009) mostraram que as dosagens de NfL e NfP fosforilado, na HAM/TSP, não se apresentam como marcadores moleculares fidedignos para a avaliação da lesão axonal. No entanto, os autores sugerem que, provavelmente, este fato está ligado à progressão lenta desta doença. Por outro lado, a avaliação deste marcador no acompanhamento de pacientes com quadros subagudos da HAM/TSP se mostra interessante, pois sua caracterização atualmente se limita à observação da evolução clínica (LIMA et al., 2007).

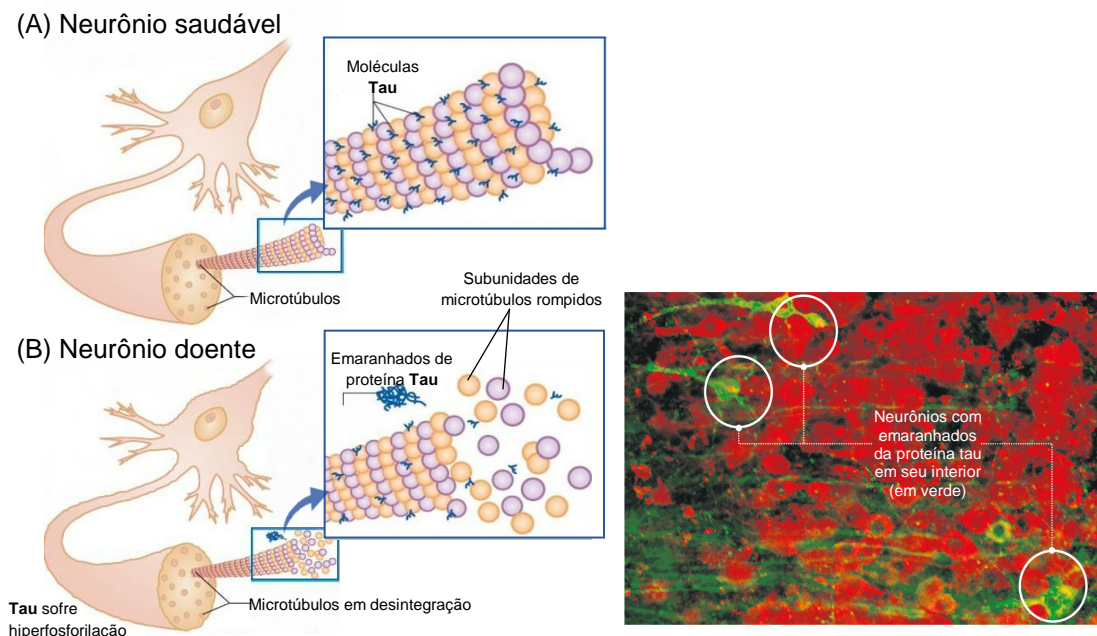
As subunidades NfM e NfP são muito fosforiladas e quando desfosforiladas são altamente sensíveis a proteases, sugerindo que os grupos fosfatos conferem resistência à degradação por proteases. Um bom biomarcador para lesão neuronal precisa ser resistente às proteases de forma que não se decomponha antes ou após a sua liberação. Assim, o NfP fosforilado (pNfP) pode ser detectado de forma estável após algum tempo em doenças do SNC, sugerindo uma degeneração axonal contínua. Uma vez que o pNfP é encontrado apenas em axônios, sua detecção no LCR ou no sangue indica a liberação dessa proteína a partir dos axônios (GAFSON et al., 2020; SINGH et al., 2017; YUAN et al., 2017).

1.7.2 Proteína Tau

A proteína Tau tem sido avaliada como biomarcador de lesão neuronal. No SNC adulto, são expressas seis isoformas dessa proteína. No cérebro, é encontrada principalmente nos neurônios, e em menor quantidade nas células da glia, estando associada aos microtúbulos, promovendo a sua estabilidade (Figura 15A), e localizada especialmente no compartimento axonal. Ela é expressa primariamente em axônios

corticais não mielinizados. Sua expressão varia localmente no cérebro humano, sendo os níveis de proteína Tau na substância branca e no cerebelo duas vezes menores do que os níveis encontrados no neocórtex (FUSTER-MATANZO; HERNÁNDEZ; ÁVILA, 2018; PETERSON et al., 2014). A hiperfosforilação de Tau resulta no seu desligamento dos microtúbulos, provocando seu auto-enovelamento e, conseqüentemente, a desestabilização de axônios e indução da formação de emaranhados intracelulares neurofibrilares (Figura 15B). Este processo patológico é característico de um grupo de desordens neurodegenerativas, denominadas Tauopatias, que inclui a doença de Alzheimer (PETERSON et al., 2014).

Figura 15 – Representação esquemática do processo de ação da proteína Tau.



Nota: (A) Neurônio saudável onde a proteína Tau tem função de estabilizar o microtúbulo e em (B) um neurônio doente onde Tau sofre hiperfosforilação e provoca desintegração do microtúbulo que provoca lesão neuronal.

Fonte: Adaptada de <https://www.gazetadopovo.com.br/saude/alzheimer-se-espalha-como-virus-82vp2yo5xd0gucfmleub1p55a/> e imagem de Science Translational Medicine.

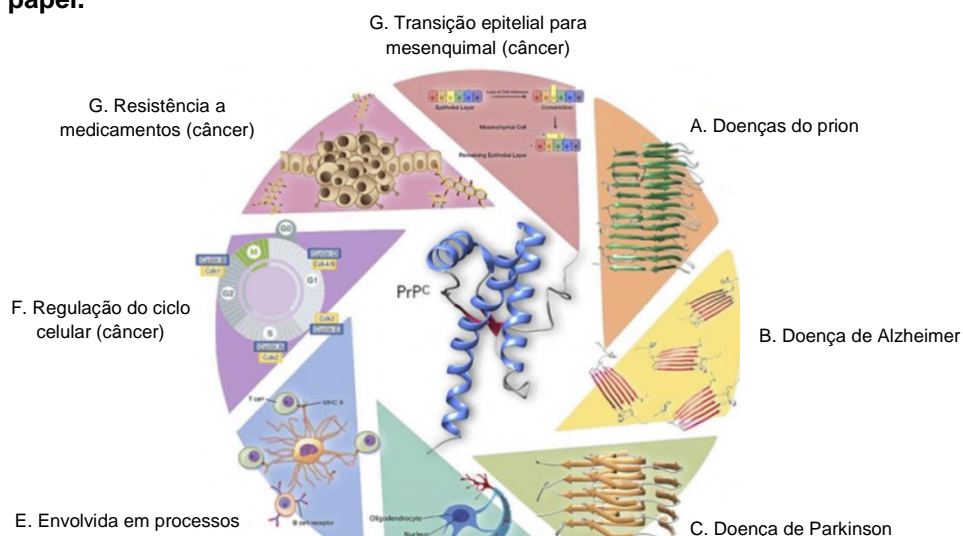
O aumento dos níveis totais de Tau (tTau) e/ou de Tau fosforilada (pTau) tem sido descrito nas encefalites associadas às infecções por HIV e pelo vírus do herpes simples tipo 1 (KRUT et al., 2013). Na HAM/TSP, que é caracterizada pela degeneração axonal dos tratos corticoespinhais, os níveis de tTau se mostram significativamente reduzidos, enquanto a proporção entre tTau e Tau fosforilada no resíduo de treonina 181 (pTau-Thr181) se encontra aumentada em comparação com o grupo controle (MALDONADO et al., 2008). Esta característica difere, por exemplo, da dinâmica observada na demência associada à infecção pelo HIV, em que ocorre a

elevação dos níveis de tTau no LCR, não acompanhada do aumento de pTau, que por sua vez distingue-se do padrão presente na doença de Alzheimer, em que se observa o acúmulo de pTau-Thr181 (GISSLEN et al., 2009).

1.7.3 Proteína príon celular (PrPc)

A PrPc é uma glicoproteína ligada ao folheto externo da membrana plasmática, e ancorada por um glicosilfosfatidilinositol, embora possa ser clivada e por isso encontrada no sangue, linfa e LCR. A PrPc é constitutivamente expressa em células do sistema nervoso, do sistema imune e em outros tipos celulares (FORD et al., 2002), e está envolvida na apoptose, na transdução de sinais, no estresse oxidativo e no estabelecimento de sinapses (ISAACS; JACKSON; ALTMANN, 2006; SPIELHAUPTER; SCHATZL, 2001; WESTERGARD; CHRISTENSEN; HARRIS, 2007). Além disso, vale ressaltar que a PrPc está envolvida no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, como por exemplo a doença de Creutzfeldt-Jakob, e em neuropatologias, tais como esquizofrenia, desordem bipolar e depressão maior, nas quais a sua expressão se encontra reduzida em células da glia (Figura 16) (PARKIN et al., 2007; WEIS et al., 2008).

Figura 16 – Processos fisiológicos e patológicos em que PrPc pode desempenhar um papel.



Nota: Além de servir como molde para a replicação de PrPsc (A), foi relatado que a proteína atua como receptor de oligômeros A β (B) e α -sinucleína (C). A PrPc também esteve envolvida na homeostase da mielina (D), nos processos imunorreguladores (E) e no câncer, principalmente nos níveis de regulação do ciclo celular (F), resistência a medicamentos (G) e transição epitelial para mesenquimal (H), entre outros.

Fonte: Adaptada de MANNI et al. (2020).

A análise de interações entre HIV-1 e PrPc, em linhagens celulares humanas, demonstrou que a PrPc inibe de forma específica a expressão das proteínas virais Env e Vpr, sendo também capaz de ligar-se ao RNA viral. No entanto, o papel da PrPc no processo infeccioso ainda permanece desconhecido. LEBLANC; BAAS; DARLIX (2004) investigaram a coexpressão de PrPc e HIV-1 na linhagem de células 293T e observaram que a PrPc induziu uma diminuição na produção de virions e no seu potencial infeccioso. Além disso, tem sido descrita uma desregulação dos níveis de PrPc em indivíduos infectados pelo HIV-1 com deficiência cognitiva, e que a PrPc participa na patogênese de alterações do SNC associadas ao HIV-1. Outros autores também observaram um aumento dos níveis de PrPc solúvel no LCR de portadores de disfunção cognitiva associada ao HIV-1, assim como a elevação dos níveis de CCL2 e IL-6 em astrócitos estimulados *in vitro* pela adição de PrPc. Com isso, tem sido sugerido que a PrPc representa um biomarcador para deficiência cognitiva associada ao HIV-1 (ROBERTS et al., 2010). Considerando a infecção por HTLV-1, foi observada a redução na expressão de PrPc no LCR de um paciente com HAM/TSP (TORRES et al., 2012). No entanto, nenhum outro estudo analisou a expressão deste fator em indivíduos infectados pelo HTLV-1.

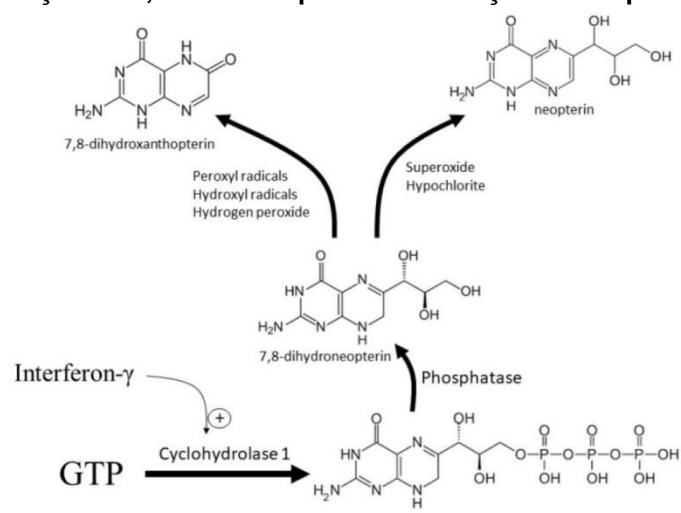
1.8 Marcadores de inflamação e migração celular: Neopterina e quimiocinas

No desenvolvimento da HAM/TSP, as lesões iniciais são caracterizadas por infiltrados compostos predominantemente por células T CD4⁺ e macrófagos, e pela expressão de mRNAs do gene *tax*. Por outro lado, em lesões tardias (acima de 4 anos) são observadas principalmente células T CD8⁺ e baixa expressão de genes virais.

Além disso, no LCR destes indivíduos estão presentes níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IFN- γ , fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), IL-1 β , IL-6, e fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), assim como elevada frequência de linfócitos ativados (FURUYA et al., 1999; KURODA et al., 1993; NAKAMURA et al., 1993; NISHIMOTO et al., 1990; UMEHARA et al., 1994). Recentemente, tem sido demonstrado que níveis elevados de contagem celular, neopterina, e das quimiocinas inflamatórias CXCL9 e CXCL10 no LCR apresentam forte correlação com a progressão da HAM/TSP (SATO et al., 2013). Estes marcadores também apresentaram uma correlação significativa com os níveis de CPV em PBMCs, indicando que estão de acordo com a teoria de que a HAM/TSP resulta da produção excessiva de mediadores inflamatórios, induzidos pela presença de células T infectadas por HTLV-1 no SNC (SATO et al., 2013).

A neopterina tem sido muito utilizada como um marcador clínico de ativação imune durante a inflamação em várias condições, como em traumas físicos, doença cardiovascular, câncer, infecções bacterianas, parasitárias e infecções virais. A neopterina é produzida por monócitos ativados, macrófagos, células dendríticas e células endoteliais após estimulação por IFN- γ e TNF produzido por linfócitos T. A liberação em resposta a essas citocinas torna a neopterina um indicador de ativação da imunidade mediada por células. A neopterina não é sintetizada enzimaticamente por macrófagos, mas sim um produto da oxidação da 7,8-diidroneopterina, que é sintetizada a partir de guanosina trifosfato (GTP) (Figura 17) (EISENHUT, 2013; GIESEG; BAXTER-PARKER; LINDSAY, 2018).

Figura 17 – Formação da 7,8-diidroneopterina e oxidação da neopterina.



Nota: Nos macrófagos, o IFN- γ regula positivamente a enzima citosólica GTP ciclohidrolase-1, que converte o GTP em 7,8-di-hidroneopterina-trifosfato. A ação de fosfatases não específicas gera 7,8-diidroneopterina livre cuja oxidação gera neopterina ou 7,8-diidrooxanthopterina dependendo do oxidante.

Fonte: Adaptado de GIESEG; BAXTER-PARKER; LINDSAY (2018).

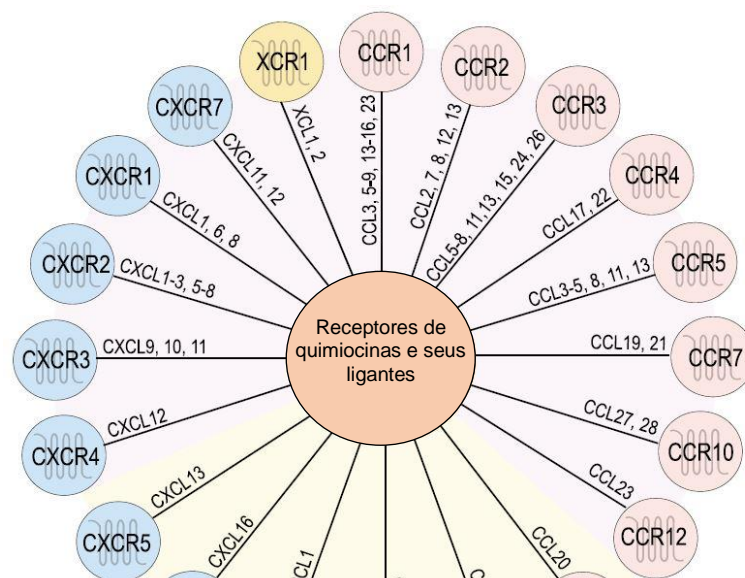
A 7,8-diidroneopterina possui um efeito protetor, por eliminar rapidamente os radicais livres gerados no ambiente intracelular, e o produto dessa reação é um oxidante ou radical neutralizado, incluindo a neopterina. Essa atividade antioxidante levou à proposta de que a 7,8-diidroneopterina seria gerada durante a ativação de macrófagos com o propósito de autoproteção dentro de um ambiente inflamatório altamente oxidante. No SNC, os níveis de neopterina no LCR parecem refletir a produção intratecal pela micróglia, pois a barreira hematoencefálica apresenta uma baixa permeabilidade às pterinas, com uma distribuição de soro para LCR em um quociente de 1/40 (EISENHUT, 2013; GIESEG; BAXTER-PARKER; LINDSAY, 2018).

Portanto, a neopterina é um fator inflamatório inespecífico produzido por macrófagos após estimulação por IFN- γ , sendo a expressão deste último aumentada em pacientes com HAM/TSP e em ACs com CPV elevada (ESPÍNDOLA et al., 2015). Além de elevados níveis de neopterina no LCR de pacientes com HAM/TSP, também tem sido descrita a presença de altos níveis de osteopontina, cuja ação está envolvida no recrutamento de macrófagos e células T em lesões inflamatórias, na indução da produção de IFN- γ e IL-12, e na redução da secreção de IL-10 (citocina anti-inflamatória) (ASHKAR et al., 2000). Estes dados também corroboram com o desequilíbrio na expressão de IFN- γ e IL-10 observado em indivíduos infectados pelo HTLV-1 (ESPÍNDOLA et al., 2015).

As quimiocinas CXCL9 e CXCL10, também denominadas monocina induzida por IFN- γ (MIG) e proteína 10 induzida por IFN- γ (IP-10), respectivamente, são ligantes do receptor de quimiocinas CXCR3. Em condições fisiológicas, estas quimiocinas não estão presentes em níveis detectáveis na maioria dos tecidos não-linfóides. Contudo, sua expressão pode ser fortemente induzida em resposta a diferentes citocinas liberadas durante infecções, lesões ou respostas inflamatórias, especialmente o IFN- γ (MULLER et al., 2010). Dessa forma, CXCL9 e CXCL10 surgem como possíveis mediadores da patogênese da HAM/TSP, através do recrutamento de células

inflamatórias para as lesões da medula espinhal. De modo geral, células T auxiliares do tipo 1 (Th1) expressam receptores de quimiocinas CCR5/CXCR3, células Th2 e T reguladoras (Tregs) expressam CCR4, enquanto células Th17 expressam CCR6 (ARAYA et al., 2011). No entanto, tem sido descrito que os ligantes de CCR4 (CCL17 e CCL22) e o ligante de CCR6 (CCL20) (Figura 18), assim como a citocina IL-17A, característica de respostas do tipo Th17, não estão presentes em concentrações detectáveis no LCR de pacientes com HAM/TSP. Além disso, dos ligantes de CCR5, apenas a quimiocina CCL5, também denominada RANTES, tem se mostrado elevada no LCR de pacientes com HAM/TSP, contudo, sem associação com a progressão da doença (SATO et al., 2013). Por outro lado, os ligantes de CXCR3 (CXCL9 e CXCL10) apresentam forte correlação com o índice de progressão da HAM/TSP, sugerindo que, ao contrário de outras desordens inflamatórias, tais como a esclerose múltipla ou a artrite reumatoide, que exibem o envolvimento de células Th17 bem como Th1, o envolvimento de quimiocinas na HAM/TSP é predominantemente do tipo Th1 (SATO et al., 2013). NARIKAWA et al. (2005) mostraram que pacientes com HAM/TSP apresentam níveis séricos e no LCR de CXCL10 significativamente mais elevados que pacientes com esclerose múltipla. Com isso, o estudo do papel das interações CXCR3-ligante na patogênese da HAM/TSP se mostra um tema atraente.

Figura 18 – Receptores de quimiocinas e seus ligantes.



Nota: Os receptores de quimiocinas conhecidos pertencentes a cada uma das famílias de quimiocinas (C, CC, CXC e CX3C) são representados no anel externo da roda, com seus ligantes (quimiocinas) mostrados nos raios da roda. Receptores com um único ligante conhecido são mostrados na área do círculo sombreado em amarelo.

Fonte: Adaptada de WHITE; IQBAL; GREAVES (2013).

2 JUSTIFICATIVA

Considerando-se estudos de triagem sorológica em hemocentros, estima-se que 2,5 milhões de indivíduos estejam infectados pelo HTLV-1/2 no Brasil (CARNEIRO-PROIETTI et al., 2002; CATALAN-SOARES; CARNEIRO-PROIETTI; PROIETTI, 2005). Contudo, apenas 0,5% a 5% dos indivíduos infectados evoluem para a HAM/TSP após um prolongado período de infecção. No entanto, cerca de 8% a 21,5% destes pacientes apresentam rápido declínio do quadro neurológico, com

perda da capacidade motora e necessidade do uso de cadeiras de rodas em até dois anos do início dos sintomas (ARAUJO; SILVA, 2006; GOTUZZO et al., 2004; LIMA et al., 2007). A diferenciação destes dois grupos somente é possível pela observação da evolução clínica. Além disso, até o momento, não há parâmetros definidos para a tomada de decisão em intervenções terapêuticas, definição de prognóstico ou de frequência de acompanhamento dos pacientes.

A patogênese da HAM/TSP ainda não é completamente compreendida, e marcadores de progressão ou prognóstico necessitam de definição. Com isso, o estabelecimento de parâmetros para determinar o grau de lesão axonal associada à HAM/TSP pela quantificação de produtos deste processo, tais como proteínas Tau e do neurofilamento, assim como da PrPc, possibilitaria uma melhor determinação dos estágios de evolução clínica desta doença. Além disso, os eventos que levam à migração de células infectadas para o SNC ainda não estão esclarecidos. Tem sido descrito que indivíduos com HAM/TSP apresentam concentração aumentada de citocinas e quimiocinas envolvidas na inflamação do tipo Th1, tanto no sangue periférico quanto no SNC. Contudo, o perfil quimiotático presente no SNC de portadores assintomáticos da infecção por HTLV-1 ainda permanece desconhecido. Dessa forma, a identificação do perfil de quimiocinas expressas no SNC, além da descrição de marcadores de inflamação, como a neopterin, possibilitaria uma melhor compreensão da patogênese da HAM/TSP. Com isso, novos parâmetros que venham a ser identificados para uma melhor classificação dos indivíduos assintomáticos com maiores chances de desenvolvimento da HAM/TSP, ou de pacientes com HAM/TSP apresentando pior prognóstico de doença, possibilitariam o uso prematuro de intervenções profiláticas, pois a lesão neurológica na HAM/TSP é irreversível e, atualmente, não há disponível tratamento específico eficaz.

3 OBJETIVO GERAL

Contribuir para uma melhor compreensão da patogênese da HAM/TSP, através da avaliação de marcadores de lesão axonal, inflamação e de fatores de migração celular, e estabelecer parâmetros para determinar o grau de lesão do SNC em indivíduos infectados pelo HTLV-1 com HAM/TSP, comparando pacientes com doença neurológica e portadores assintomáticos.

4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a CPV de HTLV-1 no LCR e em sangue periférico de ACs e pacientes com HAM/TSP;
- Quantificar os níveis totais de proteína Tau, de pTau-Thr181, e das cadeias leve (NfL) e pesada (NfP) do neurofilamento, no LCR de ACs e de pacientes com HAM/TSP;
- Quantificar os níveis de neopterina e de quimiocinas próinflamatórias no soro e no LCR de ACs e de pacientes com HAM/TSP;
- Quantificar os níveis totais de proteína PrPc livre no LCR e soro de ACs e de pacientes com HAM/TSP.
- Avaliar os diferentes marcadores de neuroinflamação e de neurodegeneração quantificados no LCR e no soro no contexto da velocidade de progressão clínica da HAM/TSP.

5 METODOLOGIA

5.1 DESENHO DO ESTUDO E CASUÍSTICA

O Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) possui um Programa de Extensão-Pesquisa-Ensino-Serviço (PEPES) em HTLV, que atende pacientes do Estado do Rio de Janeiro e de outras regiões do país. Este programa acompanha uma coorte de cerca de 700

indivíduos infectados, realizando o diagnóstico sorológico e molecular, e o aconselhamento e atendimento médico especializado de indivíduos infectados assintomáticos e de portadores de doenças.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do INI/FIOCRUZ em 17 de maio 2017 (CAAE: 64426517.8.0000.5262) (Anexo D) e representa um subprojeto de estudo aprovado pelo CEP/INI em 21 de março de 2016 (CAAE: 53518416.9.0000.5262). Este é um estudo de corte transversal, aninhado a uma coorte, para avaliação de marcadores de inflamação do SNC em pacientes infectados por HTLV-1. Foram estudados dois grupos de indivíduos infectados por HTLV-1:

- a) Portadores assintomáticos neurológicos.
- b) Pacientes com HAM/TSP.

5.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO NA PESQUISA

Foram incluídos portadores da infecção por HTLV-1, maiores de 18 anos, com diagnóstico de HAM/TSP, conforme critérios da Organização Mundial de Saúde (BANGHAM et al., 2015; CASTRO-COSTA et al., 2006), e que aceitaram participar do estudo por assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo B), e que apresentavam CPV de HTLV-1 detectável.

5.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

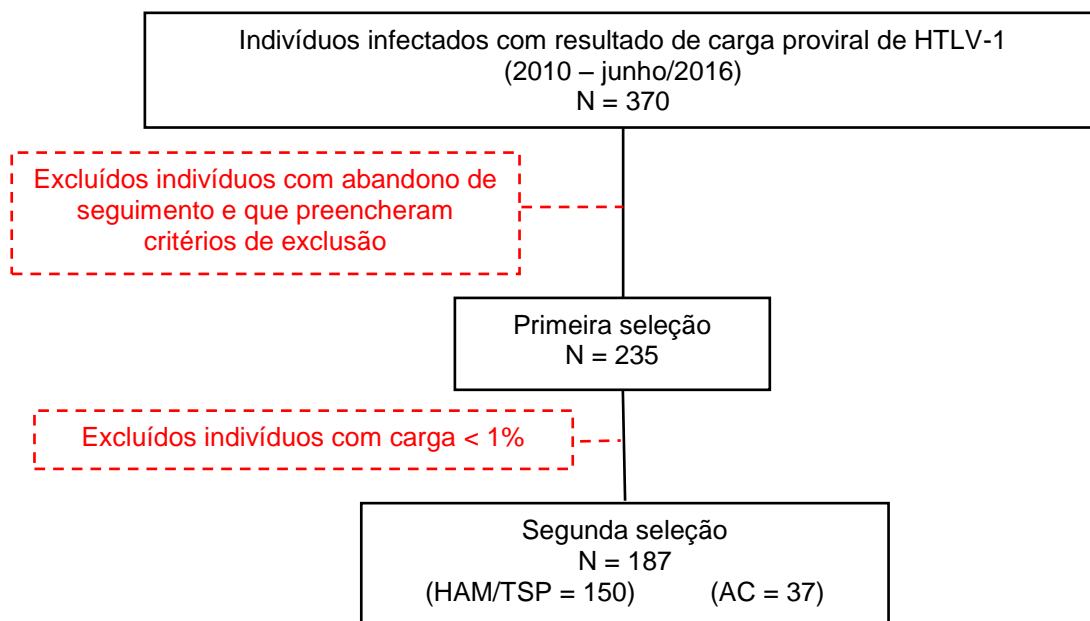
Foram excluídos indivíduos que apresentavam: (1) coinfeção com outras viroses crônicas, tais como HIV, HBV, HCV e HTLV-2; (2) histórico de tratamento com corticosteroides ou outras drogas imunomoduladoras (tais como interferon, ciclosporina, dentre outras) em período inferior a um (01) ano do momento de inclusão no estudo; (3) diagnóstico de doenças autoimunes ou outras desordens inflamatórias crônicas além da HAM/TSP; (4) diagnóstico de outras doenças que poderiam afetar a capacidade motora, tais como síndrome de Parkinson, artrite reumatoide, espondilite

anquilosante, dentre outras; (5) escaras de decúbito nos seis meses anteriores à data prevista para coleta de amostras; (6) diagnóstico de ATLL. Também foram excluídos indivíduos que retiraram o consentimento para participação no estudo.

5.4 CÁLCULO AMOSTRAL

Inicialmente, foi realizado o levantamento do número de pacientes com resultados de CPV de HTLV-1 entre 2010 até junho de 2016, e excluídos indivíduos com abandono de seguimento ambulatorial e que preencheram algum dos critérios de exclusão. Deste modo, foi obtida uma população de 70 portadores assintomáticos e 165 pacientes com HAM/TSP com potencial para inclusão no estudo. Níveis elevados de CPV de HTLV-1 têm sido associados ao desenvolvimento da HAM/TSP. Dessa forma, considerando-se apenas indivíduos com CPV de HTLV-1 comprometendo mais que 1% de leucócitos de sangue periférico, o número de portadores assintomáticos foi reduzido a apenas 37, e o de pacientes com HAM/TSP para 150. Uma vez que o número de portadores assintomáticos se mostrou um fator limitante para delinear a amostragem, foi definida a inclusão de 20 indivíduos (Figura 19), a serem comparados com o dobro de pacientes com HAM/TSP. Contudo, devido à dificuldade de obtenção de anuência dos pacientes para participação no estudo, especialmente com relação ao consentimento para realização de punção lombar, a amostra final obtida foi de 13 portadores assintomáticos neurológicos de HTLV-1 e de 21 pacientes com HAM/TSP.

Figura 19 – Fluxograma do processo de seleção de pacientes.



Fonte: Elaborada pela autora.

5.5 PLANO DE RECRUTAMENTO

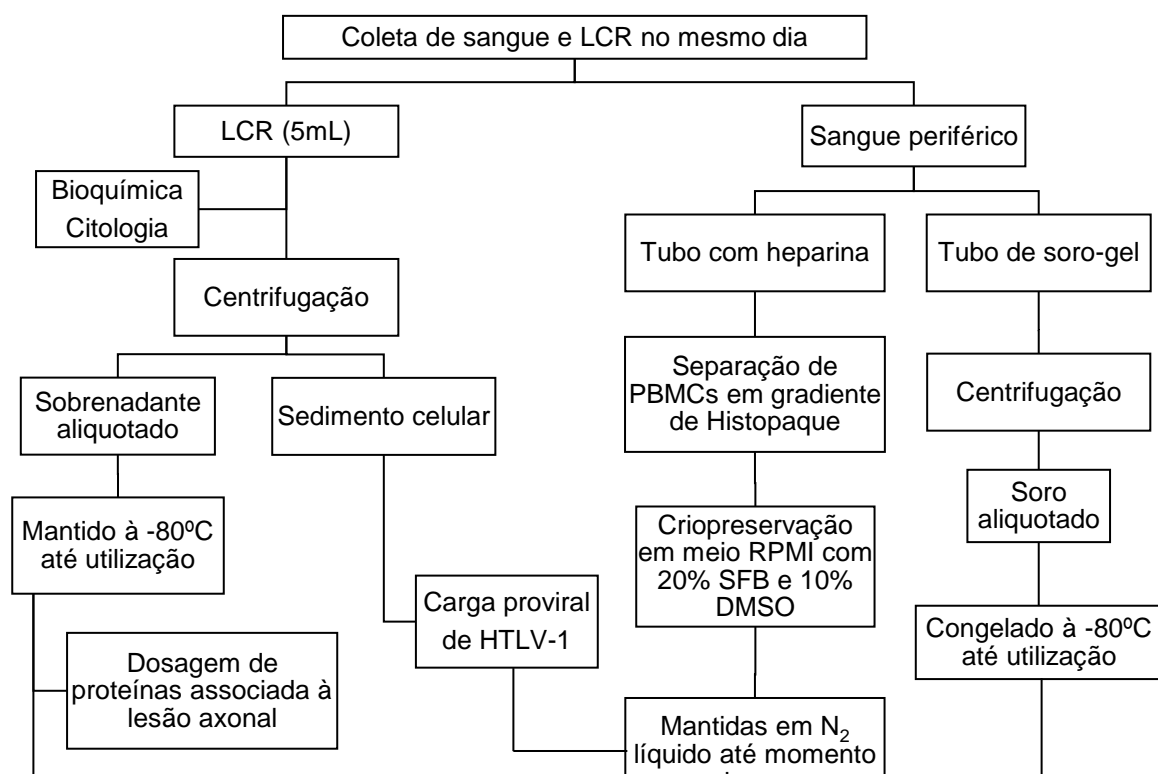
Indivíduos selecionados foram recrutados durante visita regular para acompanhamento clínico no ambulatório de Neurologia do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). A coleta de amostras biológicas foi realizada no mesmo dia, após assinatura do TCLE, ou agendada a critério médico ou por vontade do paciente.

5.6 COLETA DE DADOS E DE MATERIAL BIOLÓGICO

O projeto compreendeu apenas uma coleta de amostras de sangue periférico e LCR de cada indivíduo, que foi realizada no mesmo dia, com intervalo máximo de 30 minutos, sendo processadas conforme descrito no fluxograma abaixo (Figura 20). Amostras de sangue periférico foram coletadas em tubo contendo heparina e em tubo para separação de soro. PBMCs foram separadas, no mesmo dia, a partir do sangue heparinizado utilizando o reagente Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich), conforme instruções do fabricante, e submetidas à criopreservação em meio RPMI 1640 com 20% de soro fetal bovino (SFB) e 10% de dimetilsulfoxido (DMSO), sendo mantidas em nitrogênio líquido até o momento de uso. As amostras de soro foram separadas

por centrifugação, após formação do coágulo, e aliqüotadas e preservadas a -80°C até o momento de uso. As amostras de LCR (5 mL) foram coletadas por punção lombar entre as vértebras L3/L4 ou L4/L5, após aplicação de anestesia local (lidocaína 1%), e acondicionadas em tubos de polipropileno com fundo cônico, mantido a 4°C (banho de gelo). Uma alíquota foi destinada à dosagem de proteínas totais e glicose, e outra para citologia diferencial. O restante da amostra foi centrifugado a $400 \times g$ por 10 minutos, sendo o sobrenadante filtrado em membrana de polietersulfona (PES) com poro de $0,45 \mu\text{m}$, e aliqüotado em criotubos, e mantido a -80°C até o momento de uso. Além disso, o sedimento celular do LCR foi criopreservado para definição da CPV. Por fim, dados sobre avaliações neurológicas anteriores ao momento da coleta de amostras biológicas foram obtidos do sistema de prontuário eletrônico mantido pelo INI/FIOCRUZ – SIPEC (Sistema de Prontuário Eletrônico do Paciente do Instituto de Pesquisa Evandro Chagas/IPEC).

Figura 20 – Fluxograma de processamento de amostras biológicas e realização de ensaios.



Fonte: Elaborada pela autora.

5.7 RISCOS ASSOCIADOS

Os riscos previstos foram aqueles associados à coleta de sangue e de LCR. No caso da punção venosa periférica, poderia haver pequeno desconforto durante o procedimento, ou a formação de eritema no local da punção, que regride naturalmente após uma semana. Com relação à punção lombar para retirada de LCR, poderia haver o risco de desconforto durante a coleta ou dor no local da punção, reação alérgica ao anestésico, cefaleia ortostática, parestesias transitórias, leve hemorragia no local da punção, herniação de amígdalas cerebelares, e/ou infecção. A incidência destas complicações é muito pequena, e nenhum participante do estudo apresentou intercorrências durante as punções venosa e lombar.

5.8 DETERMINAÇÃO DA CARGA PROVIRAL DE HTLV-1 EM PBMCs

Amostras de DNA foram obtidas a partir de sedimento celular do LCR e de PBMCs usando o High Pure Viral Nucleic Acid kit (Roche Life Sciences), conforme instruções do fabricante, e foram utilizadas para determinação da CPV de HTLV-1, conforme técnica de PCR quantitativa descrita por SILVA et al. (2007), realizada de rotina pelo Laboratório de Pesquisa Clínica em Neuroinfecções do INI/FIOCRUZ.

5.9 DOSAGEM DE NEOPTERINA E DE QUIMIOCINAS PROINFLAMATÓRIAS NO SORO E NO LCR

As concentrações de neopterinina em amostras de soro e LCR foram determinadas por ELISA (marca IBL International), em duplicata, seguindo as instruções do fabricante. Os níveis de 13 quimiocinas pró-inflamatórias (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11, CCL17, CCL20, CXCL1, CXCL5, CXCL8, CXCL9, CXCL10 e CXCL11), em amostras de soro e LCR, foram mensurados simultaneamente com a metodologia CBA (*Cytometric Bead Array*) utilizando o kit LEGENDPlex™ (Biolegend, Cat No. 740003), conforme recomendações do fabricante, no citômetro de fluxo FACSCanto (BD Biosciences) da Plataforma de Imuno-Análise do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

O valor normal da concentração da neopterinina no soro é inferior a 10 nmol/L, conforme informação do fabricante. Para o LCR ainda não há valores de referência estabelecidos para indivíduos saudáveis. Alguns autores relatam que a concentração normal de neopterinina é de 4,2 nmol/L, com intervalo de 3,2 a 5,5 nmol/L (HAGBERG et al., 1993; TAKATANI et al., 2017). Por isso, nesse estudo foi considerado o valor de 4,2 nmol/L.

5.10 DOSAGEM DE PROTEÍNAS ASSOCIADAS À LESÃO AXONAL E PRPC

A quantificação da proteína NfL em amostras de LCR foi determinada por ELISA sanduíche (NEFL ELISA kit, Fine Test, China), e a proteína NfP fosforilada (pNfP) foi quantificada também por ELISA, com o kit Phosphorylated Neurofilament H Human ELISA (Biovendor, República Tcheca), seguindo as instruções dos fabricantes. A concentração de tTau no LCR foi determinada pelo método de ELISA, usando o kit fornecido pela ThermoFisher Scientific (Tau total ELISA kit, Cat. No. KHB-0041), conforme as recomendações do fabricante, e a concentração de pTau-Thr181 também foi realizada por ELISA, utilizando kit do mesmo fornecedor (Tau pT181 phospho-ELISA kit, Cat No. KHO-0631). A PrPc solúvel no LCR e no soro foi avaliada por ELISA (ELISA kit for Prion Protein PRNP, Cloud-Clone, Estados Unidos), de acordo com o protocolo do fabricante. As reações de ELISA foram realizadas no Laboratório de Pesquisa Clínica em Neuroinfecções do INI/FIOCRUZ.

As concentrações dos analitos foram determinadas pela análise dos valores de absorvância usando a ferramenta de análise de dados “*Four Parameter Logistic Curve*” (MyAssays Analysis Ltd., <http://www.myassays.com/four-parameter-logistic-curve.assay>).

Para uma melhor análise dos dados, os indivíduos foram divididos em categorias conforme seus resultados, de acordo com concentrações previamente publicadas para NfL e tTau no LCR. Para NfL, esses limites foram estabelecidos usando amostras de LCR de indivíduos controle neurologicamente saudáveis, com idade entre 18 e 76 anos, em que a proteína NfL no LCR foi dosada por um teste de ELISA sanduíche sensível, conforme descrito pelo fabricante (KRUT et al., 2014). Para a proteína tTau, as amostras de LCR foram obtidas de indivíduos neurológica e psiquiatricamente saudáveis, de 21 a 93 anos de idade, usando um método de ELISA padronizado (SJÖGREN et al., 2001). Os limites de referência normais para NfL no LCR de acordo com faixas de idade foram: 18-30 anos, < 380 pg/mL; 30-39 anos, < 560 pg/mL; 40-59 anos, < 890 pg/mL; > 59 anos, < 1850 pg/mL (KRUT et al., 2014). Como há uma correlação positiva entre a idade e os níveis de tTau no LCR, os valores de referência de tTau no LCR também foram categorizados para diferentes grupos de idade: 21-50 anos, < 300 pg/mL; 51-70 anos, < 450 pg/mL; 71-93 anos, <500 pg/mL (SJÖGREN et al., 2001).

Uma vez que não há valores de referência para a proteína pNfP, foi estabelecido um valor de corte referente a 90% das amostras do grupo de ACs para identificar indivíduos com HAM/TSP com valores aumentados, conforme abordagem descrita na literatura (TRENTINI et al., 2014). Dessa forma, o valor de corte obtido foi de 489,85 pg/mL. Para PrPc também foram estabelecidos valores de corte no soro (75,85 ng/mL) e LCR (1,1 ng/mL), do mesmo modo, considerando um valor de corte referente a 90% das amostras do grupo de ACs.

5.11 ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

O TCLE deste estudo contemplou a autorização para armazenamento de amostras sob a forma de biorrepositório, durante a duração do estudo, com a

identidade dos sujeitos da pesquisa mantida em sigilo. O armazenamento de amostras favoreceu a realização de diferentes ensaios complexos, tais como a quantificação de diferentes proteínas no soro e LCR pela técnica de ELISA e de *Cytometric Bead Array* (CBA), conforme descrito no fluxograma (Figura 20). As amostras foram armazenadas no Laboratório de Pesquisa Clínica em Neuroinfecções do INI/FIOCRUZ, sob a responsabilidade do Dr. Otávio de Melo Espíndola.

5.12 PLANO DE ANÁLISE

A análise estatística e a elaboração de gráficos foram realizadas com os programas BioEstat 5.0 e GraphPad Prism 5. Inicialmente, a organização dos dados foi realizada através de estatística descritiva. As variáveis quantitativas foram avaliadas quanto à distribuição normal de valores com o teste de Kolmogorov-Smirnov. As variáveis com dispersão normal foram avaliadas por testes paramétricos, como teste *t* de Student, com correção de Welch para variáveis com variâncias discrepantes. Por outro lado, variáveis assimétricas foram avaliadas por testes não-paramétricos, tais como Mann-Whitney e correlação de Spearman. A associação entre variáveis qualitativas foi definida pelo método Qui-quadrado, e foram considerados significativos resultados com *p*-valor < 0,05.

Variáveis como idade, tempo de doença, níveis de glicose e de proteínas no LCR tiveram seus valores resumidos como média \pm desvio-padrão e a comparação de médias foi realizada com o teste *t* de Student. Já a contagem celular no LCR e o tempo de infecção foram apresentados como mediana e intervalo interquartilico 25%-75% (IQ₂₅₋₇₅), sendo a comparação entre os grupos realizados com o teste de Mann-Whitney. As diferenças entre ACs e pacientes com HAM/TSP para a concentração de tTau, pTau-Thr181 e NfP no LCR e dos níveis de neopterin e PrPc no soro e LCR, além da razão entre os níveis de neopterin no LCR e soro, também foram avaliadas pelo teste de Mann-Whitney. As diferenças entre os grupos para as concentrações de quimiocinas no soro e LCR, e a razão das concentrações das mesmas no LCR e soro, foram analisadas pelo teste de Mann-Whitney, com exceção de CCL2 e CCL11 em soro, e de CXCL8, CXCL11 e CCL4 em LCR, além de NfL, que foram analisadas pelo teste *t* de Student.

O grau de incapacidade de pacientes com HAM/TSP foi avaliado pela escala IPEC-2 (Anexo A) e seus valores são apresentados em função do tempo de doença (em anos), contado da apresentação de sintomas neurológicos até o momento da punção lombar. A correlação entre estas variáveis foi calculada pelo teste de Spearman, e foram considerados significativos p -valor $< 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 ASPECTOS GERAIS E CLÍNICOS DA POPULAÇÃO DO ESTUDO

Foram coletadas amostras de 34 indivíduos, no período de agosto de 2017 a agosto de 2018. A caracterização desta população foi realizada através da coleta de dados em prontuários eletrônicos registrados no SIPEC, tais como idade, sexo, tempo de doença, o grau de incapacidade na escala IPEC-2, parâmetros bioquímicos (níveis de glicose e proteínas) e citologia no LCR, e estão resumidas na Tabela 1 e Apêndices A e B.

Tabela 1 – Caracterização da população de indivíduos infectados por HTLV-1.

	AC	HAM/TSP	p -valor ^g
Idade (anos)^a	62,15 ± 10,21	55,37 ± 13,42	0,129
Sexo^b			0,728
Homens	6 (17,65%)	8 (23,53%)	–
Mulheres	7 (20,59%)	13 (38,23%)	–

Tempo de infecção (anos)^{d,h}	16,98 [IQ ₂₅₋₇₅ 16,47 – 21,71]	N.A.	–
Tempo de doença (anos)^{a,c}	N.A.	12,94 ± 8,07	–
Escala de incapacidade			
Leve (1-10 pontos)	N.A.	13 (61,90%)	–
Moderada (11-21 pontos)	N.A.	5 (23,81%)	–
Grave (≥22 pontos)	N.A.	3 (14,29%)	–
Parâmetros – LCR			
Glicose (mg/dL) ^a	63,00 ± 11,52	61,67 ± 8,97	0,708
Proteína (mg/dL) ^a	48,25 ± 13,06	43,99 ± 12,46	0,371
Citologia (células/mm ³) ^{d,e}	1,0 [IQ ₂₅₋₇₅ 1,0 – 2,0]	4,0 [IQ ₂₅₋₇₅ 1,5 – 7,5]	0,005
Carga proviral PBMCs (%)^a	4,50 ± 3,64	8,46 ± 6,37	0,049

Legenda: ^a Valores estão apresentados como média ± desvio-padrão. Comparação de médias foi realizada com o teste *t* de Student.

^b A análise da distribuição de portadores assintomáticos e de pacientes com HAM/TSP de acordo com o sexo foi realizada pelo teste exato de Fisher.

^c Tempo de doença, em anos, foi calculado a partir do momento de apresentação da síndrome piramidal até o momento de coleta de amostras de sangue e LCR.

^d Valores apresentados como mediana e IQ₂₅₋₇₅. Comparação entre os grupos foi realizada com o teste de Mann-Whitney.

^e Todas as amostras apresentaram composição 100% mononuclear.

^f Carga proviral de HTLV-1 no LCR foi definida em ACs (n=3) e pacientes com HAM/TSP (n=10) e está apresentada como percentual de células infectadas em células do LCR.

^g Foi considerado significativo *p*-valor <0,05.

^h Tempo de infecção entre os ACs, em anos, foi calculado desde a data de diagnóstico até a data da coleta.

Notas: AC, assintomático; HAM/TSP, mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical N.A., não se aplica; IQ₂₅₋₇₅, intervalo interquartilico 25%-75%.

A caracterização também incluiu informações sobre o quadro clínico dos indivíduos quanto a alterações cutâneas, infecções de repetição do trato urinário (Tabela 2 e Apêndices A e B) e outros quadros clínicos não associados à infecção por HTLV-1 (Tabela 2), tais como: hipertensão arterial, dislipidemia, osteoporose, obesidade, esteatose hepática, hipotireoidismo, diabetes, hérnia inguinal, hiperamilasemia, coronariopatia, nefrolitíase, gastrite, hérnia de hiato, osteopenia, e glaucoma. A tabela 2 mostra que os portadores assintomáticos neurológicos também não apresentaram outros sinais ou sintomas comuns aos indivíduos infectados com HTLV-1, como xerodermia, dermatite seborreica ou infecção de repetição do trato urinário.

Tabela 2 – Quadro clínico da população de indivíduos infectados com HTLV-1.

Grupos	Alterações cutâneas N (%) ^a	ITU N (%) ^b	Outros quadros clínicos não associados ao HTLV-1 N (%)
--------	--	------------------------	--

ACs (13)	0	0	10 (76,9) ^c
HAM/TSP (21)	8 (38,1)	2 (9,5)	14 (66,7) ^d

Legenda: ^a Xerodermia e/ou dermatite seborreica.

^b Infecção de repetição do trato urinário (ITU).

^c Hipertensão arterial, dislipidemia, osteoporose, obesidade, esteatose hepática, hipotireoidismo, diabetes, hérnia inguinal, hiperamilasemia, coronariopatia e nefrolitíase. Podendo aparecer somente um ou mais de um sintoma no mesmo indivíduo.

^d Hipertensão arterial, obesidade, dislipidemia, esteatose hepática, hipotireoidismo, gastrite, osteoporose, diabetes, hérnia de hiato, osteopenia e glaucoma. Podendo um mesmo indivíduo apresentar um ou mais sintomas.

Conforme apresentado na Tabela 1, 14 dos indivíduos incluídos eram homens (41,18%) e 20 mulheres (58,82%). A análise dos grupos de estudo (ACs e pacientes com HAM/TSP) pelo teste exato de Fisher demonstrou que a proporção entre homens e mulheres foi homogênea entre os grupos ($p = 0,728$). Foram avaliados 13 ACs, sendo seis homens e sete mulheres, e 21 pacientes com HAM/TSP (oito homens e 13 mulheres). A média de idade de ACs foi de $62,15 \pm 10,21$ anos e de pacientes com HAM/TSP foi de $55,37 \pm 13,42$ anos, sendo semelhante entre os grupos ($p = 0,129$). O tempo de infecção entre ACs, ou seja, o período entre a data do diagnóstico laboratorial e o momento da coleta de amostras para o projeto, foi de 16,98 anos [IQ₂₅₋₇₅ 16,47 – 21,71], com valores mínimo e máximo de 6,38 a 23,88 anos, respectivamente (Tabela 1 e Apêndice 1). Com relação ao tempo de doença dos indivíduos com HAM/TSP, foi observado tempo médio de $12,94 \pm 8,07$ anos, com valor mínimo de 0,44 anos e máximo de 29,04 anos (Tabela 1 e Apêndice 2).

Quanto aos dados laboratoriais, as concentrações de glicose no LCR, em condições normais, costumam refletir os níveis sanguíneos, sendo os valores de referência no LCR lombar, em adultos em jejum, de 50 a 80 mg/dL, o que equivale a 60% dos valores de referência plasmáticos. As concentrações reduzidas de glicose no LCR podem resultar da utilização aumentada pelo tecido cerebral ou leucócitos, ou transporte comprometido para o SNC. Valores inferiores a 40 mg/dL são considerados alterados, enquanto concentrações elevadas de glicose no LCR não possuem significado clínico. Além disso, a punção traumática pode produzir um pequeno aumento (HENRY, 2008). Contudo, as amostras utilizadas neste estudo não apresentaram acidente de punção. Nenhum dos indivíduos apresentou alteração significativa dos níveis de glicose no LCR, e somente dois indivíduos apresentaram níveis de glicose abaixo de 50 mg/dL, sendo um portador assintomático, com 48

mg/dL, e um paciente com HAM/TSP e grau de incapacidade moderado, com 49 mg/dL, que apresentava osteopenia e glaucoma.

O valor de referência de proteína total no LCR lombar, em adultos, é de 15 a 45 mg/dL. A análise de proteínas no LCR, embora não seja específica, é um indicador útil de doenças do SNC. Seu aumento pode ser consequência de um aumento da permeabilidade da BHE ou de um aumento da síntese intratecal de imunoglobulinas (HENRY, 2008). Níveis de proteínas ligeiramente aumentados foram observados em quatro pacientes com HAM/TSP e grau de incapacidade leve e em um indivíduo com grau moderado, que apresentavam outros sintomas não associados à infecção por HTLV-1, tais como hipertensão arterial, hipotireoidismo, obesidade, hipercolesterolemia, hérnia de hiato. Os níveis de proteínas também estavam ligeiramente aumentados em três ACs, um com hérnia inguinal, e dois que apresentavam hipertensão arterial, obesidade e dislipidemia.

Essas ligeiras alterações nos níveis de glicose e de proteínas foram consideradas irrelevantes quanto ao valor clínico, e não foram observadas diferenças entre os grupos de ACs e de pacientes com HAM/TSP, tanto nos níveis de glicose quanto de proteínas no LCR ($p = 0,708$ e $p = 0,371$, respectivamente, Tabela 1).

A contagem de leucócitos no LCR em adultos é considerada normal até 5 células/mm³. As amostras de LCR de todos os indivíduos, desse estudo, apresentaram composição celular 100% mononuclear. Foi observada mediana de 1 célula/mm³ [IQ₂₅₋₇₅ 1,0 – 2,0] em ACs, que apresentaram valores dentro da faixa normal, todos com contagem menor ou igual a 5 células/mm³ (Apêndice 1). Por outro lado, pacientes com HAM/TSP apresentaram mediana de 4 células/mm³ [IQ₂₅₋₇₅ 1,5 – 7,5], que embora seja considerado um valor normal, foi significativamente superior à de ACs (Mann-Whitney, $p < 0,005$) (Tabela 1), apresentando valores mínimo e máximo de 1 célula/mm³ e de 10 células/mm³, respectivamente (Apêndice 2). Seis amostras apresentaram pleiocitose, sendo provenientes de pacientes com grau de incapacidade leve a moderada. No entanto, de modo semelhante aos níveis de glicose e proteínas, tais alterações na celularidade do LCR não apresentaram valor clínico relevante.

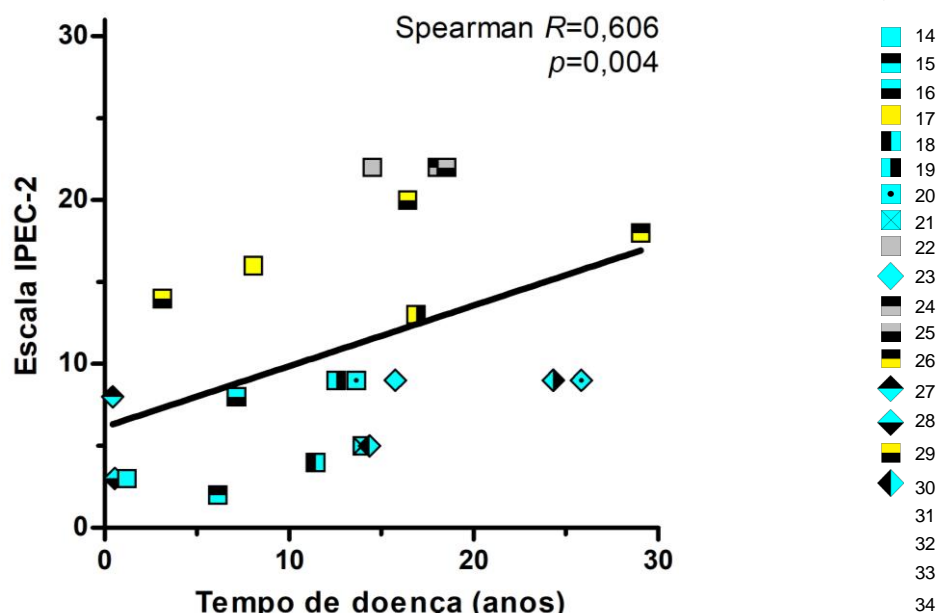
Os resultados da CPV em PBMCs, demonstraram que a média da CPV dos ACs foi igual a 4,50% ± 3,64%, com valor mínimo de 0,37% e máximo de 10,91% de PBMCs (Tabela 1 e Apêndice A). A CPV de ACs foi menor que a média da CPV de pacientes com HAM/TSP ($p = 0,049$), que foi igual a 8,46% ± 6,37% (Tabela 1 e Apêndice B). Os valores mínimo e máximo de CPV de pacientes com HAM/TSP foi de

0,6% e 26,42% de PBMCs. Quatro amostras apresentaram CPV menor que 1%, três ACs e um paciente com HAM/TSP com grau de incapacidade leve e tempo de doença de 14 meses (Apêndice A e B). Embora a CPV no LCR não tenha sido realizada em todas as amostras, e em número reduzido de ACs (três amostras) em relação aos pacientes com HAM/TSP (dez amostras), pacientes com HAM/TSP apresentaram média de CPV de HTLV-1 no LCR de $18,13\% \pm 9,99\%$, mais elevada que a média no sangue periférico. Os três ACs apresentaram valores elevados de CPV, com 8,36%, 9,13% e 9,99% de PBMCs infectados.

A avaliação do grau de incapacidade de pacientes com HAM/TSP pela escala IPEC-2 mostrou que 13 indivíduos (61,90%) apresentavam leve comprometimento neurológico, cinco (23,81%) tinham grau moderado e três (14,29%) apresentavam grave comprometimento (Tabela 1 e Apêndice 2). A escala IPEC-2 avalia a gravidade clínica da doença, verificando não somente o comprometimento motor, mas também outras manifestações neurológicas como o tônus muscular, sintomas sensitivos, distúrbios urinários e continência fecal (Anexo).

Quando o grau de incapacidade desses indivíduos foi avaliado em relação ao tempo de doença, observamos uma correlação positiva (Spearman $R = 0,606$; $p = 0,004$) (Figura 21), indicando que, quanto mais longo o período transcorrido após o surgimento de sintomas neurológicos, maior o nível de incapacidade gerada. Não houve qualquer outra correlação com o grau de incapacidade além do tempo de doença, a não ser uma fraca correlação com a razão de neopterinina (Spearman $R = 0,435$, $p = 0,049$), que é a razão entre os níveis de neopterinina no LCR e no soro, que define o grau de inflamação no SNC.

Figura 21 – Análise do grau de incapacidade de pacientes com HAM/TSP em função do tempo.





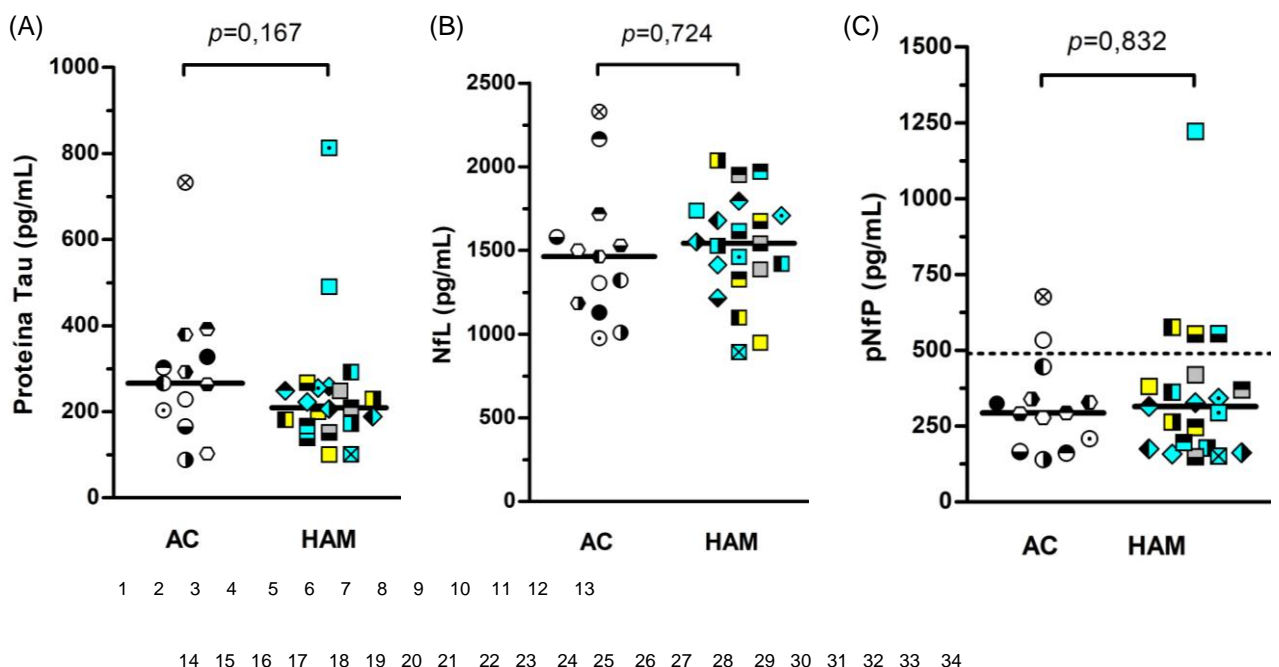
Legenda: Na legenda, as cores indicam o grau de incapacidade dos pacientes com HAM/TSP, cinza – grave (N=3); amarelo – moderado (N=5) e azul – leve (N=13). Cada forma ou símbolo identifica um indivíduo diferente. A caracterização da população do estudo está no Apêndice B.

Nota: O grau de incapacidade de pacientes com HAM/TSP foi avaliado pela escala IPEC-2. Os valores estão apresentados em função do tempo de doença (em anos), contado a partir da apresentação inicial da síndrome piramidal até o momento da punção lombar. A correlação entre estas variáveis foi calculada pelo teste de Spearman. Foi considerado significativo p -valor $<0,05$.

6.2 MARCADORES DE LESÃO NEURONAL

Com relação aos marcadores de lesão neuronal, não foi observada diferença na concentração total de Tau (tTau) em amostras de LCR de ACs e de pacientes com HAM/TSP (Mann-Whitney, $p=0,167$) (Figura 22A). A mediana de tTau dos pacientes com HAM/TSP foi de 209,2 pg/mL [IQ₂₅₋₇₅ 169,6 – 257,0] e apresentaram valores mínimo de 100,9 pg/mL e máximo de 813,4 pg/mL. Contudo, a mediana observada em pacientes com HAM/TSP não foi diferente da obtida em ACs, que apresentaram mediana de 266,2 pg/mL [IQ₂₅₋₇₅ 185,0 – 353,4], com valores mínimo e máximo de 88,50 e 733,1 pg/mL, respectivamente (Tabela 3 e Figura 22A). As concentrações de pTau-Thr181 de todas as amostras se mostraram abaixo do limite de detecção do teste utilizado.

Figura 22 – Dosagem de proteínas tTau, NfL e NfP em amostras de LCR de indivíduos infectados por HTLV-1.



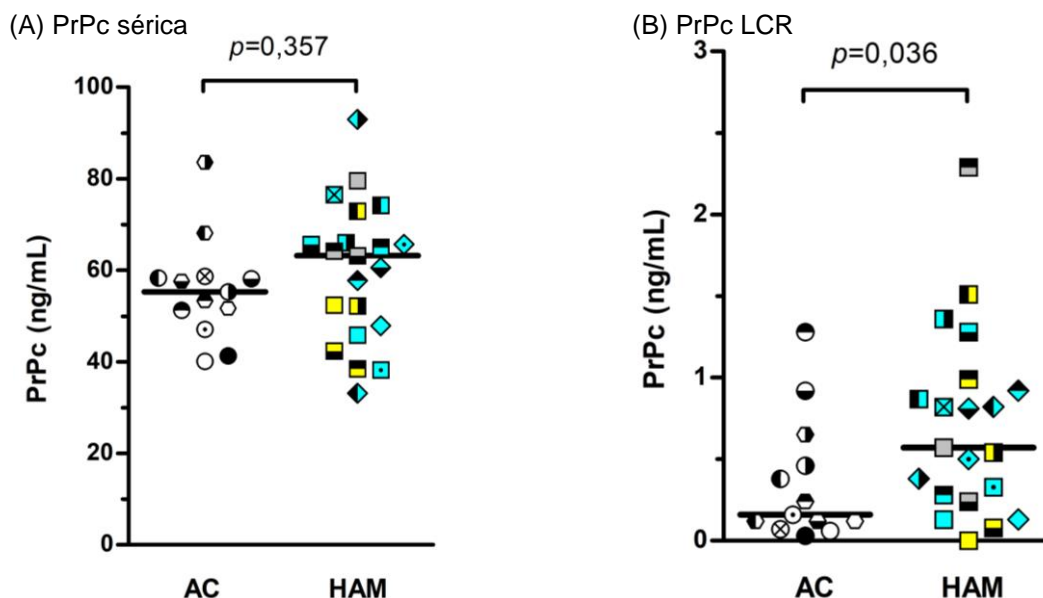
mínimo de 140,2 pg/mL e máximo de 377,3 pg/mL. Os pacientes com HAM/TSP apresentaram mediana de 315,1 pg/mL [IQ₂₅₋₇₅ 178,2 – 381,5] e valor mínimo de 150,3 pg/mL e máximo de 1222,0 pg/mL (Tabela 3).

6.3 QUANTIFICAÇÃO DE NÍVEIS TOTAIS DE PrPc

Os níveis totais de PrPc livre foram determinados no soro e no LCR. A mediana de ACs foi de 55,28 ng/mL [IQ₂₅₋₇₅ 51,25 – 58,33], e apresentaram valor mínimo de 40,11 ng/mL e máximo de 83,58 ng/mL (Tabela 3). Não houve diferença nos níveis de PrPc sérica entre ACs e pacientes com HAM/TSP (Mann-Whitney, $p=0,357$, Figura 23A). Os valores mínimo e máximo obtidos para pacientes com HAM/TSP foram de 33,16 e 92,98 ng/mL, respectivamente, com mediana de 63,23 ng/mL [IQ₂₅₋₇₅ 47,87 – 66,02] (Tabela 3).

Quanto a PrPc livre no LCR, foi observado que, apesar dos níveis serem menores que os do soro, houve uma diferença significativa entre os níveis de ACs (mediana de 0,16 ng/mL [IQ₂₅₋₇₅ 0,10 – 0,56]) e de pacientes com HAM/TSP (Mediana de 0,57 ng/mL [IQ₂₅₋₇₅ 0,26 – 0,96]) (Mann-Whitney, $p = 0,036$) (Figura 23B). Os pacientes com HAM/TSP apresentaram valores mínimo e máximo de 0,00 e 2,29 ng/mL, respectivamente, enquanto ACs o valor mínimo foi de 0,03 ng/mL e o valor máximo de 1,28 ng/mL (Tabela 3).

Figura 23 – Níveis totais de PrPc livre no soro e LCR.



ACs – 

HAM/TSP – 

Legenda: (A) Níveis de PrPc no soro (ng/mL) e (B) no LCR (ng/mL). As cores indicam o grau de incapacidade dos pacientes com HAM/TSP, cinza – grave (N=3); amarelo – moderado (N=5), e azul – leve (N=13). Cada símbolo identifica um indivíduo diferente. A caracterização da população do estudo está disponível nos Apêndice A e B. As linhas horizontais tracejadas indicam os valores de corte para PrPc no soro (A, 75,85 ng/mL) e no LCR (B, 1,1 ng/mL), representado por 90% do grupo de portadores assintomáticos de HTLV-1 (AC).

Nota: Os níveis totais de PrPc foram determinados por ELISA em amostras de soro e LCR de ACs (n=13) e de pacientes com HAM/TSP (n=21). Diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste de Mann-Whitney. Foram considerados significativos p -valor <0,05.

6.4 MARCADORES DE INFLAMAÇÃO E MIGRAÇÃO CELULAR: NEOPTERINA

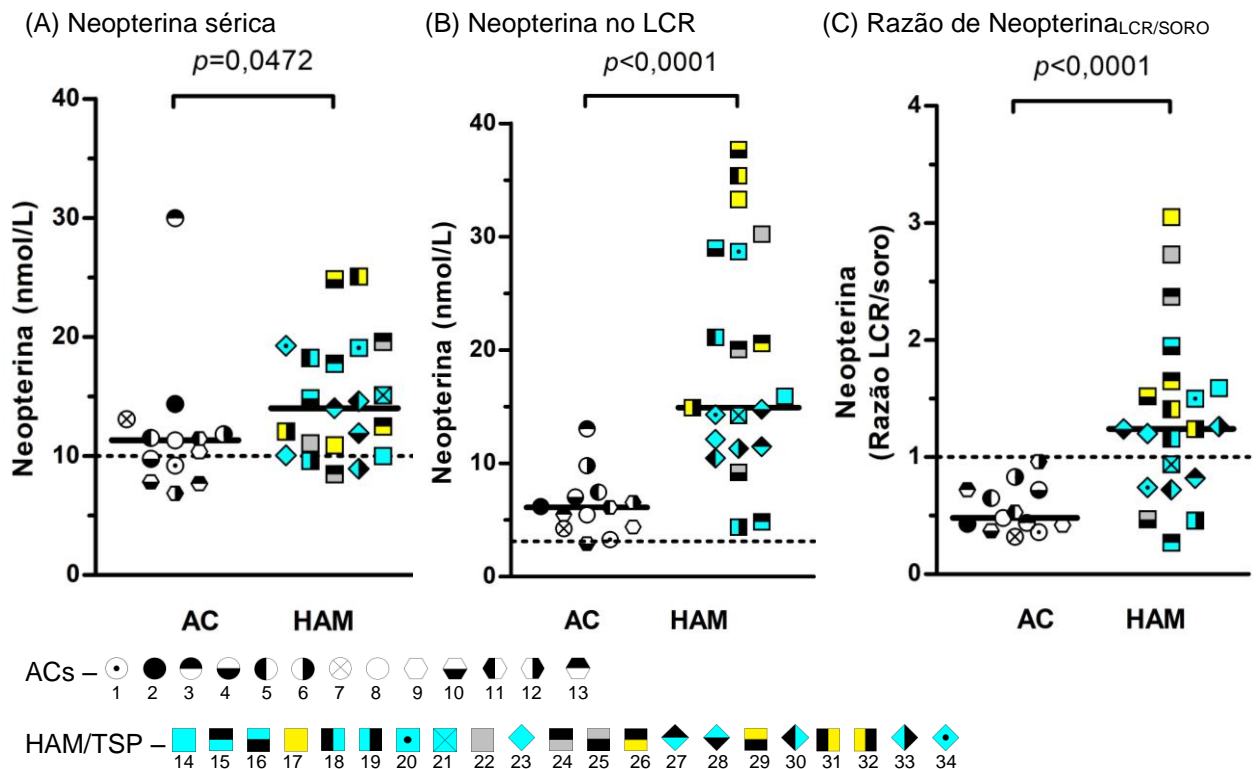
No que se refere aos marcadores de inflamação e migração celular, os níveis de neopterin também foram determinados no soro e LCR. No soro, ACs apresentaram mediana de 11,34 nmol/L [IQ₂₅₋₇₅ 9,21 – 11,84], e valores mínimo de 6,86 nmol/L e máximo de 29,99 nmol/L (Tabela 4). A comparação entre os grupos mostrou que pacientes com HAM/TSP tiveram níveis séricos significativamente mais elevados de neopterin que ACs ($p = 0,047$, Figura 24A). Pacientes com HAM/TSP apresentaram mediana de 14,01 nmol/L [IQ₂₅₋₇₅ 10,90 – 18,24] e valores mínimo e máximo de 8,47 e 25,07 nmol/L, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4 – Estatística descritiva de marcadores inflamatórios: Neopterin.

Variáveis	Grupos	Mín.	IQ 25%	Md	IQ 75%	Máx.	X	DP
Neopterin sérica (nmol/L)	HAM/TSP	8,47	10,90	14,01	18,24	25,07	14,67	4,93
	AC	6,86	9,21	11,34	11,84	29,99	11,95	5,84
Neopterin LCR (nmol/L)	HAM/TSP	4,39	11,48	14,93	28,69	37,69	18,76	9,96
	AC	2,93	4,38	6,11	7,05	13,06	6,31	2,73
Razão neopterin _{LCR/SORO}	HAM/TSP	0,27	0,82	1,24	1,59	3,05	1,35	0,72
	AC	0,32	0,42	0,48	0,72	0,96	0,56	0,20

Legenda: Mín – Valor Mínimo; IQ 25% e 75% - Primeiro percentil e terceiro percentil, respectivamente; Md – Mediana; Máx – Valor Máximo; X – Média e DP – Desvio Padrão.

Figura 24 – Quantificação de neopterinina em amostras de portadores assintomáticos de infecção por HTLV-1 (AC) (n=13) e de pacientes com HAM/TSP (n=21).



Legenda: Níveis de neopterinina (nmol/L) foram determinados por ELISA em amostras (A) de soro e (B) de LCR. (C) Valores foram utilizados para cálculo da razão entre os níveis observados no LCR e no soro. As cores indicam o grau de incapacidade dos pacientes com HAM/TSP, cinza – grave (N=3); amarelo – moderado (N=5), e azul – leve (N=13). Cada símbolo identifica um indivíduo diferente. A caracterização da população do estudo está disponível nos Apêndice A e B.

Nota: Linhas tracejadas em (A) e (B) indicam valores de referência de concentrações normais de neopterinina no LCR ($< 4,2$ nmol/L) e no soro (< 10 nmol/L), respectivamente, conforme bula do fornecedor do teste, e em (C) indica níveis de neopterinina iguais no LCR e soro, ou seja, razão igual a 1. Diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste de Mann-Whitney. Foram considerados significativos p -valor $< 0,05$.

Em relação aos níveis de neopterinina no LCR, observou-se que pacientes com HAM/TSP mostraram valores mínimo e máximo de 4,39 e 37,69 nmol/L, respectivamente, com mediana de 14,93 nmol/L [IQ₂₅₋₇₅ 11,48 – 28,69] (Tabela 4), que foi significativamente mais elevada que a de ACs ($p < 0,0001$, Figura 24B). Por sua vez, ACs apresentaram mediana de 6,11 nmol/L [IQ₂₅₋₇₅ 4,38 – 7,05], inferior a obtida no soro, com valores mínimo e máximo de 2,93 e 13,06 nmol/L, respectivamente (Tabela 4).

Para definir o grau de inflamação no SNC, foi calculada a razão entre os níveis de neopterinina no LCR e no soro (razão de neopterinina_{LCR/SORO}). Foi observado que a mediana dos ACs foi de 0,48 [IQ₂₅₋₇₅ 0,42 – 0,72], com valores mínimo de 0,32 e máximo de 0,96 (Tabela 4). A mediana da razão de neopterinina_{LCR/SORO} dos pacientes com HAM/TSP foi de 1,24 [IQ₂₅₋₇₅ 0,82 – 1,59], com valores mínimo e máximo de 0,27 e 3,05, respectivamente (Tabela 4), e que se mostrou significativamente mais elevada na comparação com ACs ($p < 0,0001$) (Figura 24C).

Considerando que o valor de referência de neopterinina no soro é < 10 nmol/L, foi verificado que oito indivíduos apresentaram valores normais, sendo cinco ACs e três pacientes com HAM/TSP. Portanto, 85,71% (18/21) dos indivíduos com HAM/TSP e 61,54% (8/13) de ACs apresentaram valores alterados, ou seja, acima de 10 nmol/L. A maior concentração de neopterinina foi observada em um AC, com valor de 29,99 nmol/L, que correspondeu ao valor máximo tanto deste grupo quanto da população do estudo (Quadro 3 e Figura 23A). Esse mesmo paciente também apresentou o valor máximo de neopterinina no LCR dentre ACs (Figura 23B). Ao considerar o valor de referência de neopterinina no LCR ($< 4,2$ nmol/L), somente dois ACs apresentaram valores normais, enquanto os demais, ou seja, 84,6% (11/13) dos ACs, e todos os pacientes com HAM/TSP, tiveram valores alterados ($> 4,2$ nmol/L) (Quadro 4 e Figuras 23A e B). Entretanto, todos os ACs apresentaram níveis séricos de neopterinina superiores ao do LCR, e por isso, a razão de neopterinina desses indivíduos foi < 1 (Quadro 3 e Figura 24C). Com isso, considerando que todos os ACs apresentaram razão de neopterinina_{LCR/SORO} < 1 , estes indivíduos foram classificados em três grupos, conforme o Quadro 3, sendo aqueles com: níveis de neopterinina no LCR e sérica

normais; neopterinina alterada no LCR e normal no soro; neopterinina no LCR e sérica alteradas.

Uma vez que todos os pacientes com HAM/TSP apresentaram níveis de neopterinina no LCR acima de 4,2 nmol/L, estes indivíduos foram divididos em quatro grupos, conforme mostrado no Quadro 4, sendo aqueles com: níveis séricos normais de neopterinina e razão de neopterinina_{LCR/SORO} < 1; neopterinina sérica normal e razão de neopterinina_{LCR/SORO} > 1; neopterinina sérica alterada e razão de neopterinina_{LCR/SORO} < 1 e níveis de neopterinina sérica alterada e razão de neopterinina_{LCR/SORO} > 1.

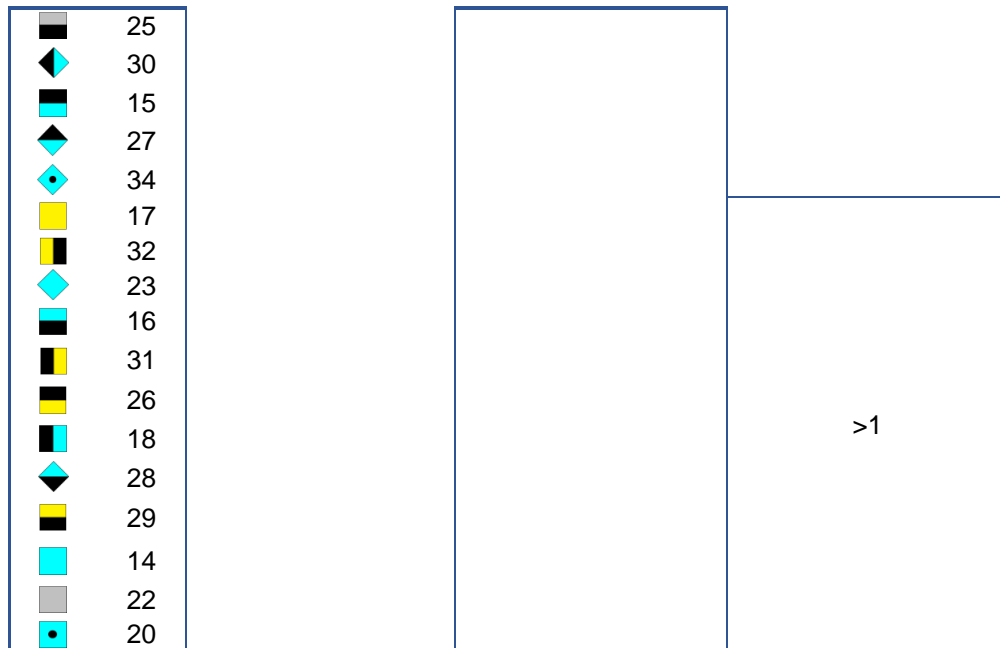
Quadro 2 – Perfil dos níveis de neopterinina em ACs.

Amostra	Neopterinina (soro) nmol/L	Neopterinina (LCR) nmol/L	Razão Neopterinina (LCR/SORO)
1	<10	<4,2	<1
10			
4		>4,2	
12			
13			
6			
9			
3	>10	>4,2	
5			
11			
8			
2			
7			

Nota: A caracterização da população do estudo está no Apêndice A. Foram considerados normais os níveis de neopterinina no LCR < 4,2 nmol/L, sérico < 10nmol/L e razão de neopterinina_{LCR/SORO} < 1 (HAGBERG et al., 1993; TAKATANI et al., 2017).

Quadro 3 – Perfil dos níveis de neopterinina em pacientes com HAM/TSP.

Amostra	Neopterinina (soro) nmol/L	Neopterinina (LCR) nmol/L	Razão Neopterinina (LCR/SORO)
19	<10	>4,2	<1
33			>1
24			<1
21	>10		

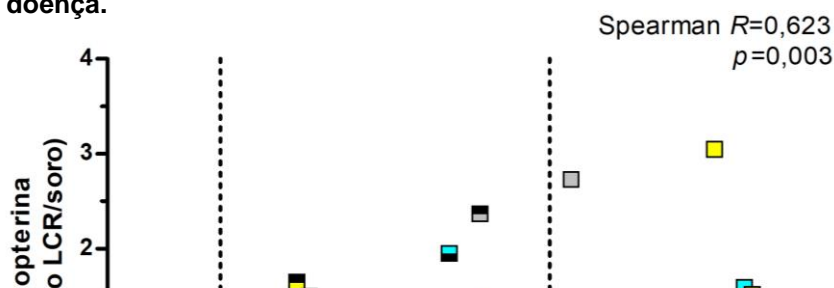


Nota: A caracterização da população do estudo está no Apêndice B. Foram considerados normais os níveis de neopterin no LCR $< 4,2 \text{ nmol/L}$, sérico $< 10 \text{ nmol/L}$ e razão de neopterin_{LCR/SORO} < 1 (HAGBERG et al., 1993; TAKATANI et al., 2017).

A forma rápida de progressão da HAM/TSP pode ser definida pela evolução até o uso de cadeiras de rodas em menos de dois anos do início de sintomas (CARNEIRO-PROIETTI, 2015). Considerando a metodologia de LIMA; BICA; ARAUJO (2005), é possível avaliar a progressão clínica usando um índice definido pela pontuação final da escala IPEC-2 de incapacidade dividida pela duração da doença (em anos) desde o início dos sintomas. Esse valor foi usado para dividir a amostra em quartis, em que pacientes abaixo do quartil 25% foram definidos como progressores lentos e acima do quartil 75% como progressores rápidos.

Foi observada uma correlação positiva entre os níveis de neopterin no LCR e o índice de progressão de doença (Spearman $R = 0,539$; $p = 0,014$) mas não com os níveis de neopterin no soro (Spearman $R = -0,162$, $p = 0,495$). A razão de neopterin_{LCR/SORO} também correlacionou positivamente com o índice de progressão de doença (Figura 25), em que indivíduos com progressão lenta tiveram índice $< 0,37$ pontos/ano e razão de neopterin_{LCR/SORO} < 1 , e pacientes com progressão rápida apresentaram índice de 1,45 pontos/ano e razão de neopterin_{LCR/SORO} > 1 .

Figura 25 – Correlação entre a razão dos níveis de neopterin no LCR e no soro e o índice de progressão de doença.





Legenda: Na legenda, as cores indicam o grau de incapacidade dos pacientes com HAM/TSP, cinza – grave (N=3); amarelo – moderado (N=5) e azul – leve (N=13). Cada símbolo identifica um indivíduo diferente. A caracterização da população do estudo está descrita no Apêndice B.

Nota: O índice de progressão da HAM/TSP foi obtido a partir da divisão da pontuação na escala IPEC-2 pelo tempo de doença em anos. Indivíduos com progressão lenta de doença estão enquadrados abaixo do quartil 25% (0,37 pontos/ano), enquanto pacientes com progressão rápida estão acima do quartil 75% (1,45 pontos/ano), representados pelas linhas verticais tracejadas (LIMA; BICA; ARAUJO, 2005). A correlação entre as variáveis foi calculada pelo teste de Spearman, sendo considerado significativo p -valor $<0,05$.

No entanto, nossa população de estudo apresentou somente três pacientes com tempo de doença inferior a 2 anos, um com aproximadamente 5 meses de doença (símbolo ◆), outro com aproximadamente 7 meses (símbolo ◆) e um com 1 ano e 2 meses (símbolo ■), todos com grau de incapacidade leve.

Os níveis de neopterinina no LCR e a razão de neopterinina_{LCR/SORO} apresentaram correlação positiva com os níveis de pNfP. O nível de neopterinina no LCR apresentou uma forte correlação (Spearman $R = 0,781$; $p < 0,0001$), enquanto a razão de neopterinina_{LCR/SORO} mostrou uma correlação moderada (Spearman $R = 0,648$; $p = 0,0015$).

6.5 MARCADORES DE INFLAMAÇÃO E MIGRAÇÃO CELULAR: QUIMIOCINAS

Com o intuito de identificar outros marcadores de inflamação ou migração celular com níveis elevados, 13 quimiocinas pró-inflamatórias foram quantificadas nas amostras de soro e LCR.

Com relação aos níveis séricos das quimiocinas da subfamília CC, a Tabela 5 mostra as descrições de cada quimiocina, enquanto a comparação entre os grupos

está representada na Figura 26. Foi observado que os níveis séricos de CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL11, CCL17 e CCL20 não apresentaram diferença significativa entre os pacientes com HAM/TSP e ACs (Figura 26). Quatro amostras de ACs apresentaram níveis de CCL11, CCL17 e CCL20 maiores que os níveis encontrados em pacientes com HAM/TSP (Figuras 26E, F e G).

Figura 26 – Comparação dos níveis séricos de quimiocinas da subfamília CC entre ACs e pacientes com HAM/TSP.

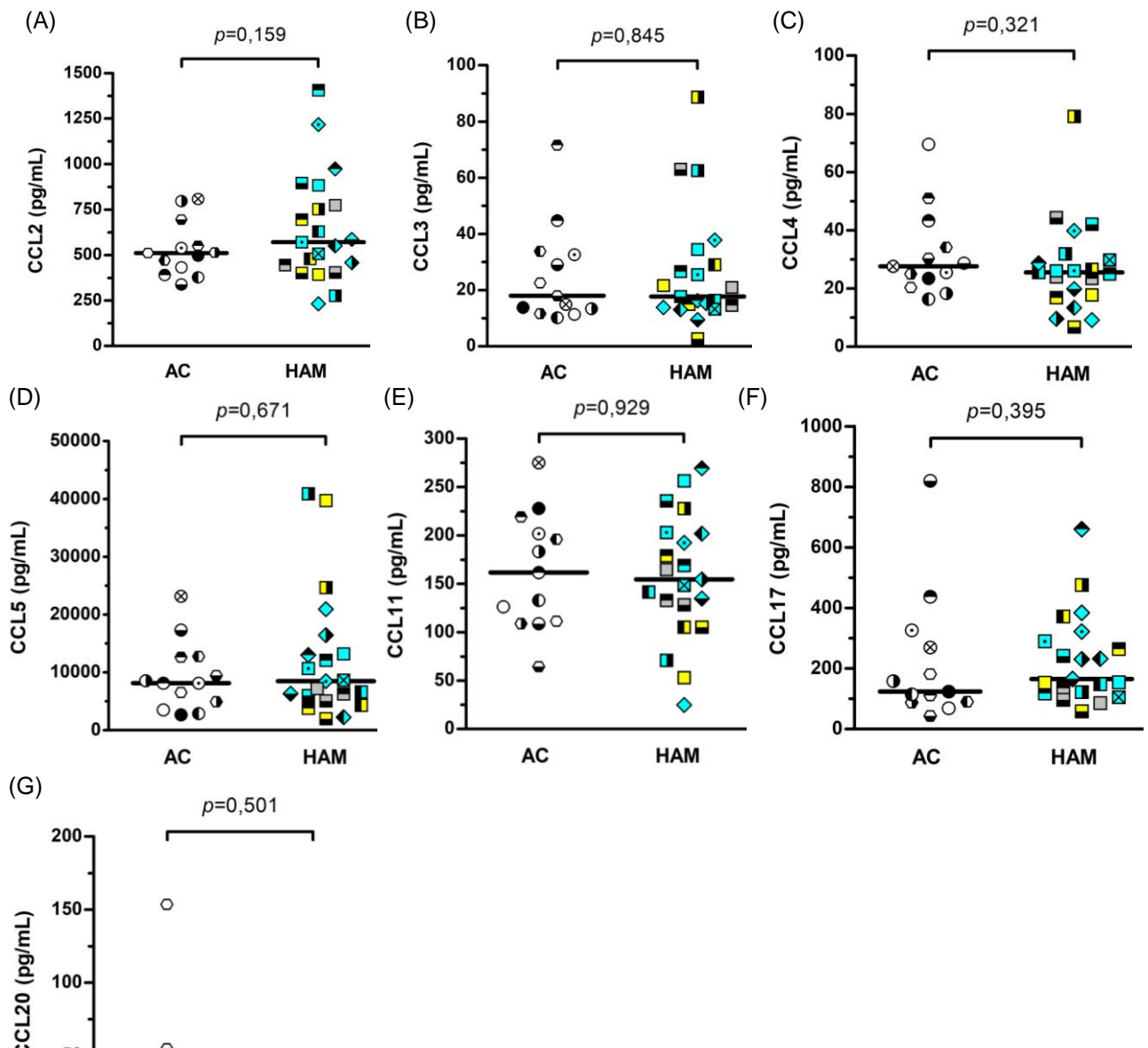
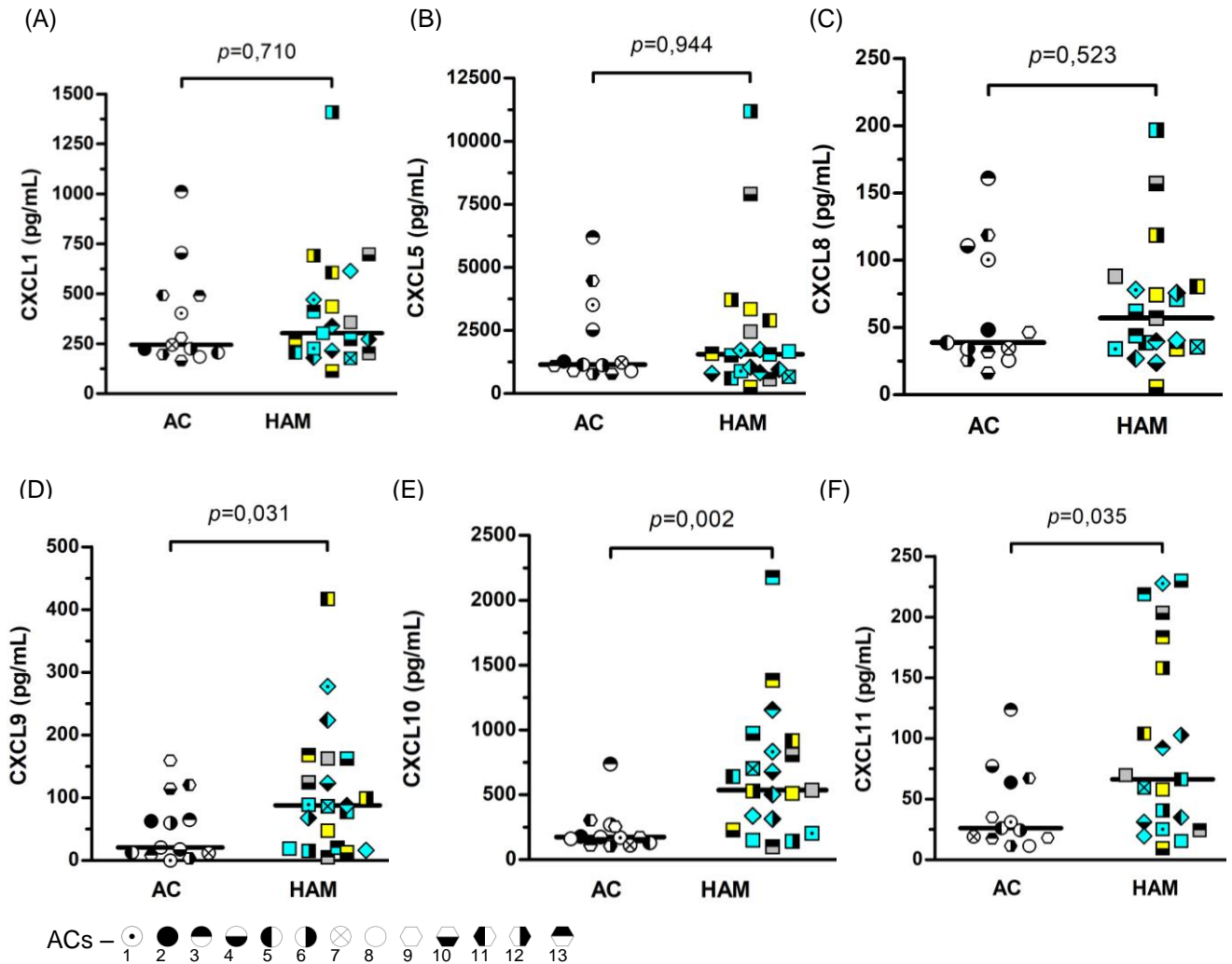


Tabela 6 – Estatística descritiva de marcadores inflamatórios: Quimiocinas séricas.

Quimiocinas	Grupos	Mín.	IQ 25%	Md	IQ 75%	Máx.	X	DP
CXCL1 (pg/mL)	HAM/TSP	113,39	215,88	302,54	470,22	1409,58	403,45	289,22
	AC	165,21	204,78	244,32	489,31	1011,34	371,22	250,80
CXCL5 (pg/mL)	HAM/TSP	266,05	829,96	1563,12	2461,97	11188,6	2285,13	2637,09
	AC	774,45	897,37	1146,13	2531,23	6195,0	1995,57	1710,56
CXCL8 (pg/mL)	HAM/TSP	5,94	35,62	56,97	78,09	196,7	65,84	45,69
	AC	16,34	31,86	38,79	100,54	161,0	61,0	45,63
CXCL 9 (pg/mL)	HAM/TSP	5,4	20,54	87,98	162,93	417,21	109,87	101,81
	AC	0,0	12,01	21,04	64,78	159,34	50,61	52,08
CXCL 10(pg/mL)	HAM/TSP	100,37	315,19	537,5	833,75	2176,97	659,06	491,18
	AC	105,61	129,25	174,49	256,11	738,55	222,02	167,37
CXCL 11 (pg/mL)	HAM/TSP	9,55	31,3	66,34	158,06	230,0	94,08	77,04
	AC	11,57	18,12	26,16	63,75	123,8	40,53	33,29

Legenda: Mín – Valor Mínimo; IQ 25% e 75% - Primeiro percentil e terceiro percentil, respectivamente; Md – Mediana; Máx – Valor Máximo; X – Média e DP – Desvio Padrão.

Figura 27 – Comparação dos níveis séricos de quimiocinas da subfamília CXC entre ACs e pacientes com HAM/TSP.



HAM/TSP – 

Legenda: Níveis séricos de 6 quimiocinas da subfamília CXC: (A) CXCL1; (B) CXCL5; (C) CXCL8; (D) CXCL9; (E) CXCL10; (F) CXCL11. Ainda na legenda, as cores indicam o grau de incapacidade dos pacientes com HAM/TSP, cinza – grave; amarelo – moderado e azul – leve. Cada forma ou símbolo identifica um indivíduo diferente. A caracterização da população do estudo está disponível nos Apêndices A e B.

Nota: Os níveis dessas quimiocinas, determinadas pela técnica de CBA, foram comparados entre pacientes com HAM/TSP (HAM; n = 21) e portadores assintomáticos (AC; n = 13). As barras horizontais indicam os valores medianos. Diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste de Mann-Whitney. Foram considerados significativos p -valor $<0,05$.

A comparação entre os grupos evidenciou que os níveis séricos de CXCL1, CXCL5 e CXCL8 não apresentaram diferença significativa entre os pacientes com HAM/TSP e ACs, como apresentado na Figura 27. Por outro lado, os resultados revelaram que os níveis séricos das quimiocinas CXCL9, CXCL10 e CXCL11 foram mais altos nos pacientes com HAM/TSP em comparação aos ACs. A mediana dos níveis séricos da quimiocina CXCL9 de pacientes com HAM/TSP foi de 87,98 pg/mL [IQ₂₅₋₇₅ 20,54 – 162,93], sendo maior que a de ACs, que foi de 21,04 pg/mL [IQ₂₅₋₇₅ 12,01 – 64,78] ($p = 0,031$) (Tabela 6 e Figura 27D). Para a quimiocina CXCL10, a mediana dos pacientes com HAM/TSP foi de 537,5 pg/mL [IQ₂₅₋₇₅ 315,19 – 833,75], sendo mais elevada que a de ACs, que foi de 174,49 pg/mL [IQ₂₅₋₇₅ 129,25 – 256,11] ($p = 0,002$). Os valores mínimo e máximo de CXCL10 em pacientes com HAM/TSP corresponderam aos menores e maiores valores observados na população do estudo, sendo de 100,37 pg/mL e 2176,97 pg/mL, respectivamente (Tabela 6 e Figura 27E). A mediana dos níveis de CXCL11 em pacientes com HAM/TSP foi de 66,34 pg/mL [IQ₂₅₋₇₅ 31,3 – 158,06], e significativamente maior que a mediana de 26,16 pg/mL [IQ₂₅₋₇₅ 18,12 – 63,75] obtida em ACs ($p = 0,035$). Os valores mínimo e máximo da população de estudo foram observados entre pacientes com HAM/TSP (Tabela 6 e Figura 27F).

Os níveis desses biomarcadores também foram pesquisados no LCR. De modo geral, algumas quimiocinas apresentaram concentrações muito baixas em ambos os grupos, tais como CCL3, CCL4, CCL17, CXCL1, CXCL5 e CXCL11, inclusive menores que as suas respectivas concentrações no soro. Para outras quimiocinas, a maioria dos indivíduos apresentou níveis abaixo do limite de detecção, como por exemplo CCL5, que foi indetectável em todos os indivíduos ($< 3,41$ pg/mL); CCL11, em que a maioria dos pacientes apresentou níveis $< 1,68$ pg/mL, com exceção de quatro pacientes com HAM/TSP com baixas concentrações; e CCL20, em que a maioria dos

indivíduos mostraram níveis abaixo de 1,88 pg/mL, com exceção de seis amostras com concentrações baixas, cinco de pacientes com HAM/TSP e um AC. Com relação à quimiocina CXCL9, todos ACs tiveram concentração abaixo do limite de detecção, ou seja, < 1,36 pg/mL, enquanto 14 pacientes com HAM/TSP apresentaram concentrações indetectáveis.

Os níveis no LCR das quimiocinas da subfamília CC estão descritos na Tabela 7, e a Figura 28 mostra a comparação entre os grupos. As quimiocinas CCL2 e CCL3 mostraram diferenças significativas entre os grupos. De modo geral, as concentrações da quimiocina CCL2 no LCR foram maiores que no soro. A mediana para pacientes com HAM/TSP foi de 714,95 pg/mL [IQ₂₅₋₇₅ 580,46 – 981,35], sendo mais elevada que a de ACs, que foi de 643,38 pg/mL [IQ₂₅₋₇₅ 541,28 – 703,32] ($p = 0,034$) (Tabela 7 e Figura 28A). Para a quimiocina CCL3, os valores mínimo e máximo do estudo foram observados entre ACs. A mediana dos níveis de CCL3 em pacientes com HAM/TSP foi de 9,19 pg/mL [IQ₂₅₋₇₅ 8,29 – 10,48], e se mostrou significativamente maior que a de ACs, que apresentaram mediana de 7,64 pg/mL [IQ₂₅₋₇₅ 7,11 – 8,10] ($p = 0,017$) (Tabela 7 e Figura 28B).

Tabela 7 – Estatística descritiva de marcadores inflamatórios: Quimiocinas no LCR.

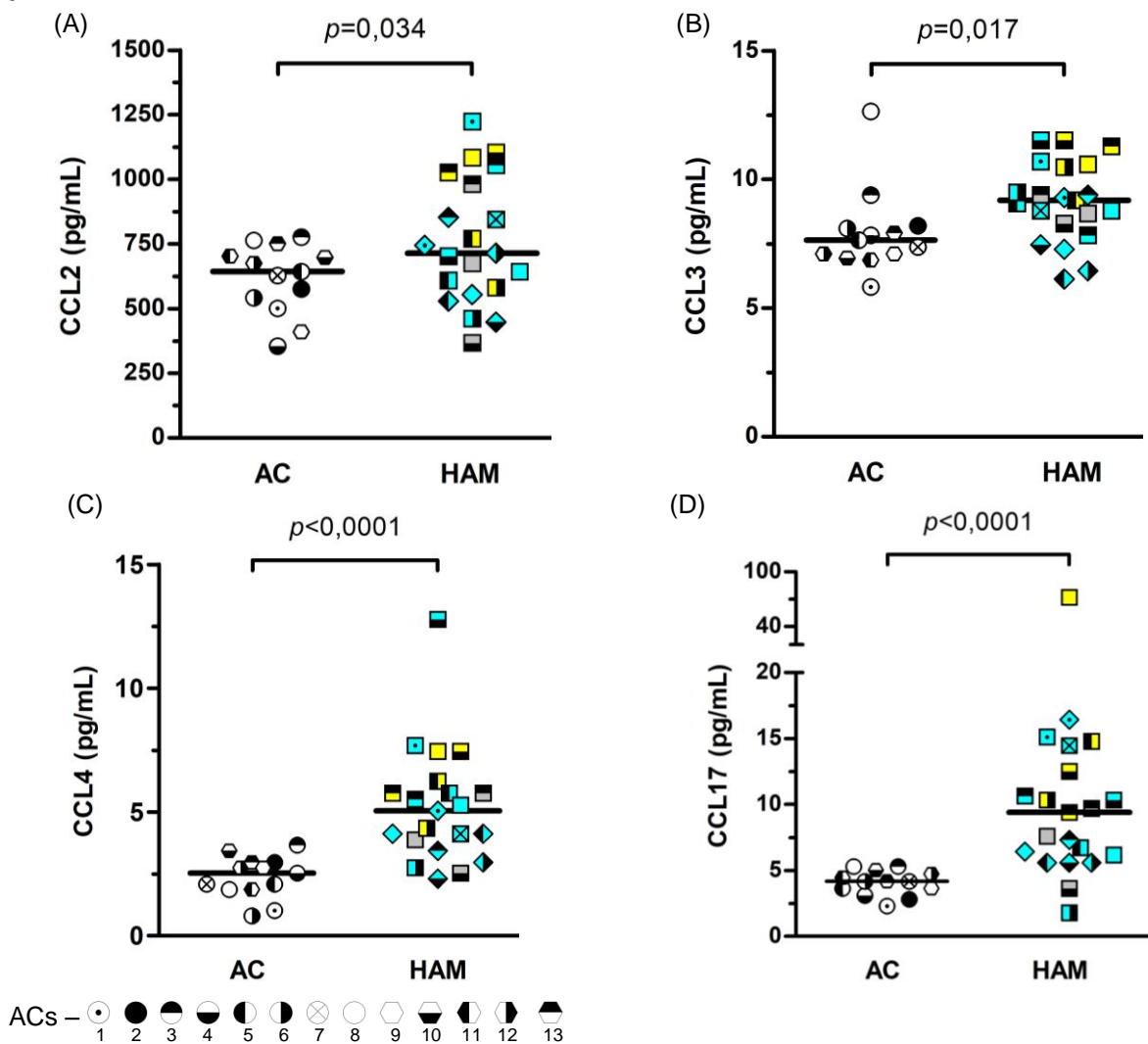
Quimiocinas	Grupos	Mín.	IQ 25%	<i>Md</i>	IQ 75%	Máx.	X	DP
CCL2 (pg/mL)	HAM/TSP	367,97	580,46	714,95	981,35	1224,03	760,74	242,81
	AC	355,02	541,28	643,38	703,32	776,87	617,21	134,02
CCL3 (pg/mL)	HAM/TSP	6,13	8,29	9,19	10,48	11,52	9,13	1,55
	AC	5,82	7,11	7,64	8,10	12,64	7,92	1,65
CCL4 (pg/mL)	HAM/TSP	2,31	3,88	5,05	5,76	12,78	5,21	2,36
	AC	0,81	1,87	2,53	2,97	3,66	2,37	0,85
CCL17 (pg/mL)	HAM/TSP	1,79	6,16	9,41	12,52	72,1	12,01	14,33
	AC	2,3	3,64	4,18	4,74	5,3	4,07	0,94

Legenda: Mín – Valor Mínimo; IQ 25% e 75% - Primeiro percentil e terceiro percentil, respectivamente; *Md* – Mediana; Máx – Valor Máximo; X – Média; e DP – Desvio Padrão.

As quimiocinas CCL4 e CCL17, apresentaram níveis consideravelmente mais altos no LCR de pacientes com HAM/TSP na comparação com ACs. A média da concentração de CCL4 em pacientes com HAM/TSP foi de $5,21 \pm 2,36$ pg/mL, sendo mais elevada que valores observados em ACs, cuja média foi de $2,37 \pm 0,85$ pg/mL ($p < 0,0001$) (Tabela 7 e Figura 28C). Os pacientes com HAM/TSP apresentaram concentração mediana de CCL17 de 9,41 pg/mL [IQ₂₅₋₇₅ 6,16 – 12,52], e que também

foi maior que a de ACs, que apresentaram mediana de 4,18 pg/mL [IQ₂₅₋₇₅ 3,64 – 4,74] ($p < 0,0001$) (Tabela 7 e Figura 28D). Observou-se que apesar de CCL3, CCL4 e CCL17 apresentarem concentrações significativamente distintas entre os grupos, suas concentrações se mostraram muito baixas, inclusive menores que suas respectivas concentrações no soro (Tabelas 5 e 7; Figuras 26 e 28).

Figura 28 – Comparação dos níveis no LCR de quimiocinas da subfamília CC entre ACs e pacientes com HAM/TSP.



HAM/TSP – 

Legenda: Níveis no LCR de quatro quimiocinas da subfamília CC: (A) CCL2; (B) CCL3; (C) CCL4 e (D) CCL17. As cores indicam o grau de incapacidade dos pacientes com HAM/TSP, cinza – grave (N=3); amarelo – moderado (N=5), e azul – leve (N=13). Cada símbolo identifica um indivíduo diferente. A caracterização da população do estudo está disponível nos Apêndices A e B.

Nota: Os níveis no LCR dessas quimiocinas foram determinados pela técnica de CBA, e foram comparados entre pacientes com HAM/TSP (HAM; n = 21) e portadores assintomáticos (AC; n = 13). As barras horizontais indicam os valores medianos, e diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste de Mann-Whitney, com exceção de CCL4, que foi analisada pelo teste *t* de Student, com correção de Welch. Foram considerados significativos *p*-valor <0,05.

Quanto aos níveis das quimiocinas da subfamília CXC, a descrição dos resultados é mostrada na Tabela 8 e a comparação dos grupos na Figura 29. Os níveis no LCR de CXCL1 e CXCL8 não mostraram diferença significativa entre os pacientes com HAM/TSP e ACs (Mann-Whitney, *p* = 0,315 e Teste *t* de Student, *p* = 0,366, respectivamente, Figuras 29A e C).

Tabela 8 – Estatística descritiva de marcadores inflamatórios: Quimiocinas no LCR.

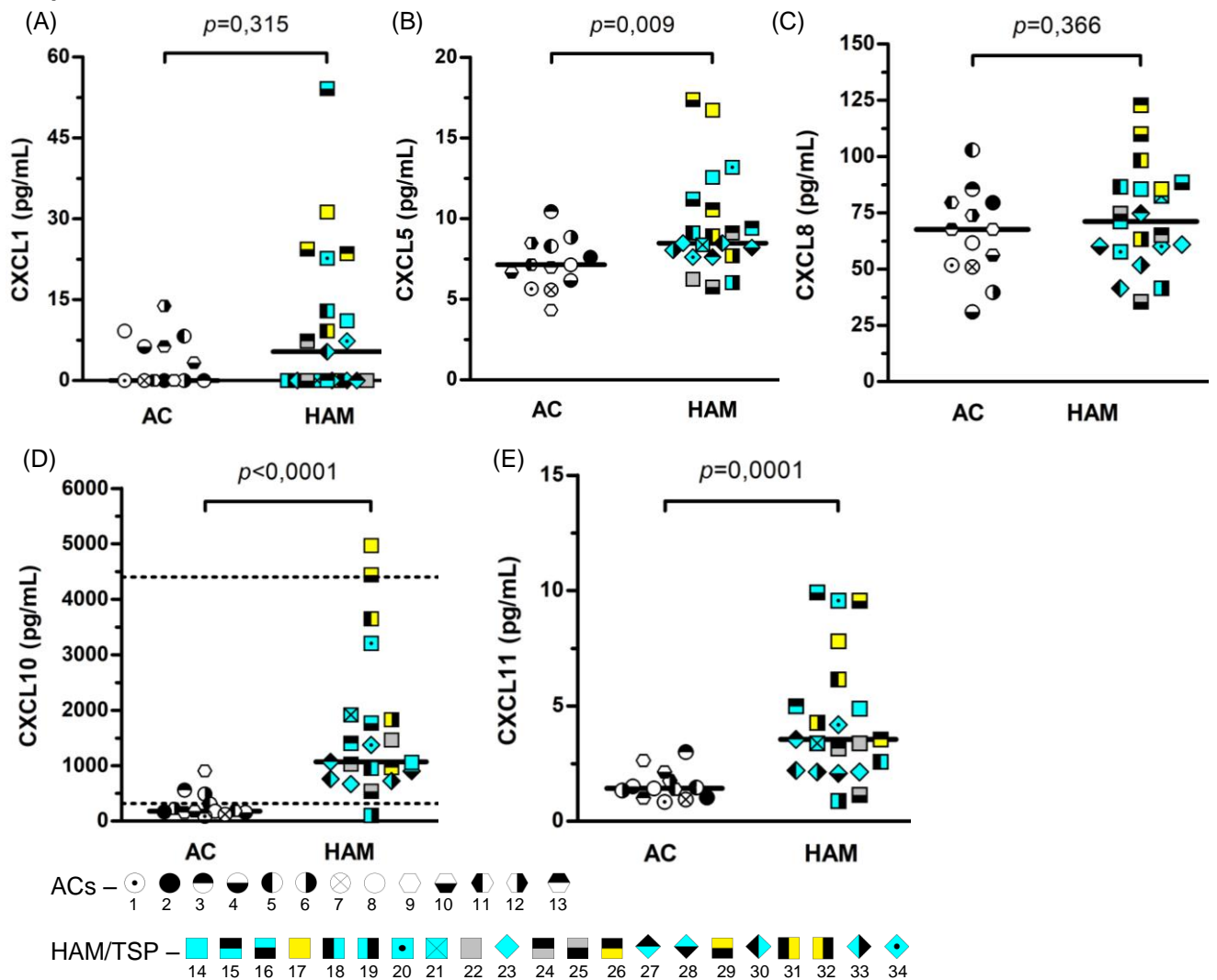
Quimiocinas	Grupos	Mín.	IQ 25%	<i>Md</i>	IQ 75%	Máx.	<i>X</i>	DP
CXCL1 (pg/mL)	HAM/TSP	0	0	5,37	12,93	54,15	9,97	14,14
	AC	0	0	0	6,35	13,83	3,64	4,7
CXCL5 (pg/mL)	HAM/TSP	5,77	7,69	8,47	10,55	17,38	9,56	3,13
	AC	4,32	6,17	7,13	8,29	10,44	7,17	1,60
CXCL8 (pg/mL)	HAM/TSP	35,49	60,11	71,14	85,49	122,83	72,29	22,40
	AC	31,07	51,71	67,61	79,53	102,93	65,22	19,64
CXCL 10(pg/mL)	HAM/TSP	102,66	900,77	1067,5	1832,47	4972,31	1657,82	1311,39
	AC	90,05	157,59	182,64	313,07	909,09	287,85	233,37
CXCL 11 (pg/mL)	HAM/TSP	0,88	2,2	3,55	4,99	9,92	4,36	2,75
	AC	0,85	1,04	1,43	1,76	3	1,58	0,66

Legenda: Mín – Valor Mínimo; IQ 25% e 75% - Primeiro percentil e terceiro percentil, respectivamente; *Md* – Mediana; Máx – Valor Máximo; *X* – Média e DP – Desvio Padrão.

Por outro lado, os níveis de CXCL5 e CXCL11 se mostraram aumentados entre os pacientes com HAM/TSP em comparação com ACs. Para a quimiocina CXCL5, a mediana dos pacientes com HAM/TSP foi de 8,47 pg/mL [IQ₂₅₋₇₅ 7,69 – 10,55], e mais elevada que em ACs, que apresentaram mediana de 7,13 pg/mL [IQ₂₅₋₇₅ 6,17 – 8,29] (Mann-Whitney, *p* = 0,009) (Tabela 8 e Figura 29B). Os pacientes com HAM/TSP apresentaram concentração média de CXCL11 de 4,36 ± 2,75 pg/mL, e que foi mais elevada que em ACs, cuja média foi de 1,58 ± 0,66 pg/mL (Teste *t* de Student, *p* = 0,0001) (Tabela 8 e Figura 29E). Entretanto, conforme observado para outras

quimiocinas, foram encontradas baixas concentrações de CXCL5 e CXCL11, que foram inferiores aos seus respectivos níveis no soro. CXCL5 tem como ligante CXCR2, que é expresso em neutrófilos e está envolvido na migração dessas células (PALOMINO et al., 2015). Contudo, em nossa coorte, células polimorfonucleares não foram detectadas no LCR, que apresentou composição 100% mononuclear em todos os pacientes. Por isso, é possível que tais níveis de CXCL5 não sejam fisiologicamente relevantes para a atração de neutrófilos ao sítio de inflamação no SNC em pacientes com HAM/TSP.

Figura 29 – Comparação dos níveis no LCR de quimiocinas da subfamília CXC entre ACs e pacientes com HAM/TSP.



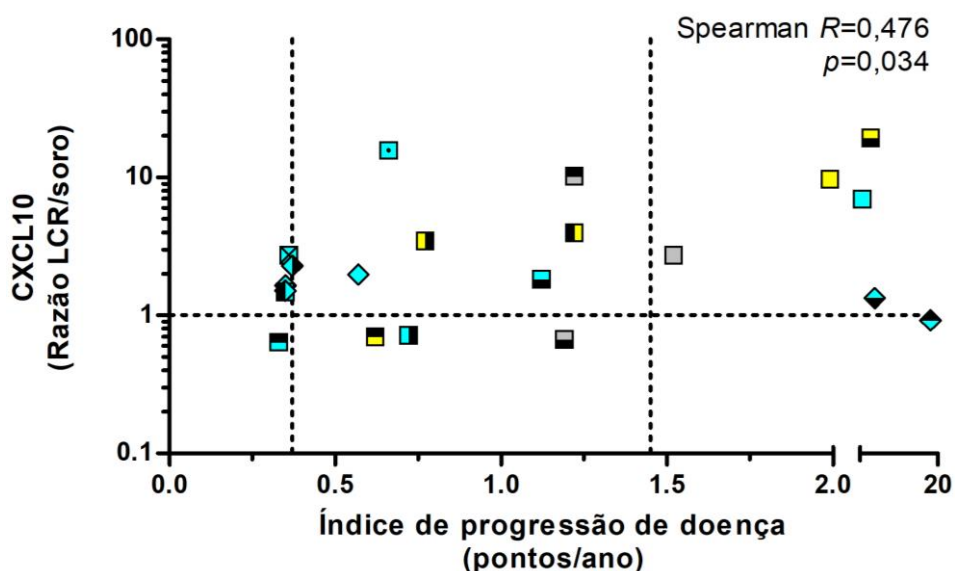
Legenda: Níveis no LCR de 5 quimiocinas da subfamília CXC: (A) CXCL1; (B) CXCL5; (C) CXCL8; (D) CXCL10 e (E) CXCL11. As cores indicam o grau de incapacidade dos pacientes com HAM/TSP, cinza – grave (N=3); amarelo – moderado (N=5), e azul – leve (N=13). Cada símbolo identifica um indivíduo diferente. A caracterização da população do estudo se encontra nos Apêndices A e B.

Nota: Os níveis dessas quimiocinas, determinadas pela técnica de CBA, foram comparados entre pacientes com HAM/TSP (HAM; n = 21) e portadores assintomáticos (AC; n = 13). As barras horizontais indicam os valores medianos. Diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste de Mann-Whitney, com exceção de CXCL8 e CXCL11, que foram analisadas pelo teste *t* de Student, com correção de Welch. Foram considerados significativos *p*-valor <0,05.

De modo geral, os indivíduos apresentaram concentrações mais elevadas da quimiocina CXCL10 no LCR em comparação com o soro. Por outro lado, os níveis de CXCL10 foram marcadamente mais elevados em pacientes com HAM/TSP na comparação com ACs. A mediana de pacientes com HAM/TSP foi de 1067,5 pg/mL [IQ₂₅₋₇₅ 900,77 – 1832,47], mais elevada que a de ACs que foi de 182,64 pg/mL [IQ₂₅₋₇₅ 157,59 – 313,07] (Mann-Whitney, *p* < 0,0001) (Tabela 8 e Figura 29D).

Com relação a quimiocina CXCL10, foi observada correlação positiva moderada com a celularidade no LCR (células/mm³) (Spearman *R* = 0,468; *p* = 0,033), com pNfP (Spearman *R* = 0,547; *p* = 0,010), e com a razão de neopterina_{LCR/SORO} (Spearman *R* = 0,473; *p* = 0,030), além de uma forte correlação com os níveis de neopterina no LCR (Spearman *R* = 0,710; *p* = 0,0003). Também foi observada correlação entre a razão dos níveis de CXCL10 no LCR e no soro e o índice de progressão de doença (Figura 30; Spearman *R* = 0,476, *p* = 0,034). Entretanto, essa correlação foi menos intensa que a correlação entre a razão de neopterina e o índice de progressão da doença (Figura 25), pois 17 das 21 amostras de pacientes com HAM/TSP (81%) apresentavam razão > 1. Por fim, os níveis séricos de CXCL10 e neopterina também apresentaram correlação positiva moderada (Spearman *R* = 0,507; *p* = 0,019).

Figura 30 – Correlação entre a razão dos níveis de CXCL10 no LCR e no soro e o índice de progressão de doença.



HAM/TSP – 

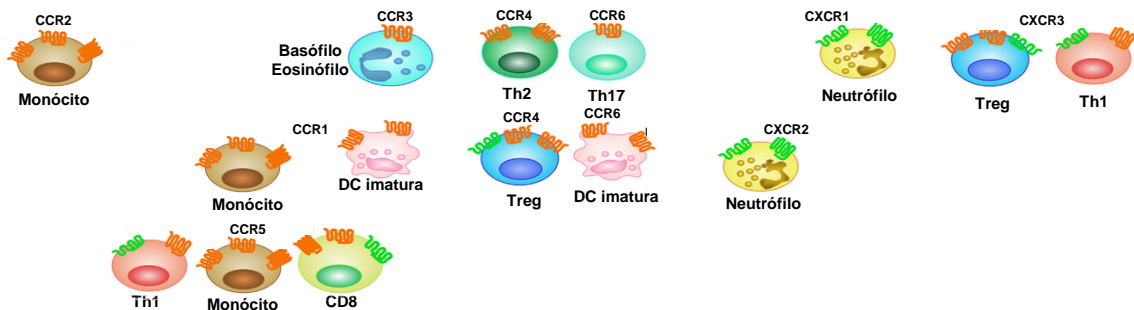
Nota: O índice de progressão de doença de pacientes com HAM/TSP foi obtido a partir da divisão da pontuação na escala IPEC-2 pelo tempo de doença, em anos. A correlação entre as variáveis foi calculada pelo teste de Spearman. Foi considerado significativo p-valor <0,05. As duas linhas verticais pontilhadas representam os intervalos interquartílicos do índice de progressão, $IQ_{25} = 0,37$ pontos/ano e $IQ_{75} = 1,45$ pontos/ano.

Ainda foram observadas correlações positivas moderadas entre os níveis no LCR da quimiocina CCL2 e a neopterina (Spearman $R = 0,466$; $p = 0,033$), entre a quimiocina CXCL8 e a razão de neopterina_{LCR/SORO} (Spearman $R = 0,5512$; $p = 0,010$), e uma forte correlação com os níveis de neopterina no LCR (Spearman $R = 0,719$; $p = 0,0002$). No soro, foi verificada correlação positiva moderada entre os níveis da quimiocina CXCL9 e a neopterina (Spearman $R = 0,466$; $p = 0,033$) e a CPV em PBMCs (Spearman $R = 0,475$; $p = 0,030$), além de correlação entre a quimiocina CXCL11 e a CPV em PBMCs (Spearman $R = 0,455$; $p = 0,038$).

Assim como os níveis de neopterina no LCR e a razão de neopterina_{LCR/SORO} refletem reações imunológicas inflamatórias relacionadas aos monócitos/macrófagos e células dendríticas, a razão de concentração das quimiocinas entre LCR e soro também podem refletir a ativação de uma resposta inflamatória no SNC. Uma razão LCR/soro maior que 1 indicaria quais quimiocinas poderiam estar atuando na atração de células da periferia para o SNC. A Figura 31 destaca três quimiocinas com a razão entre LCR/soro maior que 1: CCL2, CXCL8 e CXCL10, o que foi observado tanto nos ACs como em pacientes com HAM/TSP. Observou-se também que um paciente com HAM/TSP apresentou razão maior ou igual a 1 para as quimiocinas CCL3, CCL4 e CXCL11, e os maiores índices para CCL3, CXCL8 e CXCL10 (razão_{CXCL8} LCR/soro = 4,16, razão_{CXCL8} LCR/soro = 18,53 e razão_{CXCL10} LCR/soro = 19,38). Esse paciente apresentava grau de incapacidade moderada, com níveis aumentados de proteínas no LCR e pleocitose mononuclear (8 células/mm³), além de apresentar polineuropatia periférica.

Figura 31 – Razão entre as concentrações de quimiocinas no LCR e soro.





Legenda: Expressão dos receptores em células imunes:

- CCR1 – Monócito, macrófago, neutrófilo, Th1, basófilo, DC.
- CCR2 – Monócito, macrófago, neutrófilo, Th1, basófilo, DC.
- CCR3 – Eosinófilo > basófilo, mastócito.
- CCR4 – Th2, Treg > Th17, T CD8⁺, monócito, cél. B, iDC.
- CCR5 – Monócito, macrófago, Th1, NK, Treg, T CD8⁺, DC, neutrófilo.
- CCR6 – Th17 > iDC, $\gamma\delta$ T, NKT, NK, Treg, Tfh.
- CXCR1 – Neutrófilo > monócito, NK, mastócitos, basófilo, T CD8⁺.
- CXCR2 – Neutrófilo > monócito, NK, mastócitos, basófilo, T CD8⁺.
- CXCR3 – Th1, CD8⁺ T_{CM} e T_{EM}, NK, NKT, DC, B cell, Treg, Tfh.

Para identificar quais indivíduos apresentavam marcadores aumentados, foi realizada a classificação de acordo com os valores de referência descritos. Para a proteína tTau, observou-se que três amostras apresentaram valores aumentados, um AC e dois indivíduos com HAM/TSP. Para a proteína NfL, 53,8% (7/13) dos ACs apresentaram concentrações alteradas, enquanto essa frequência foi de 66,7% (14/21) em pacientes com HAM/TSP. Para a proteína pNfP, seis indivíduos apresentaram concentrações aumentadas (Figura 22C), dois ACs e quatro pacientes com HAM/TSP. Quanto à PrPc livre no soro, três pacientes com HAM/TSP apresentaram níveis elevados, enquanto quatro indivíduos apresentaram valores aumentados no LCR (Figura 22).

Dentre os ACs, um participante (símbolo ⊗) apresentou níveis aumentados de tTau, NfL e pNfP, uma mulher com 72 anos, sem alterações neurológicas, incluindo déficit cognitivo, e que apresentava o mais longo tempo de infecção (23,9 anos), e com CPV de 4,58% em PBMCs. Outros marcadores desta paciente também se mostraram alterados, como as concentrações de neopterina no soro e no LCR. Outros dois ACs, que apresentaram concentrações aumentadas de NfL (símbolo ●) e de pNfP (símbolo ○), uma mulher e um homem, respectivamente, ambos com tempo de infecção de aproximadamente 16 anos, também apresentaram níveis aumentados de

neopterinina no soro e no LCR, sendo que um deles (símbolo ●) apresentou o valor máximo de neopterinina no soro (29,99 nmol/L) e PrPc aumentada no LCR (Figuras 23 e 24).

Uma paciente com HAM/TSP (símbolo ■) com concentração aumentada de tTau também apresentou concentração elevada de pNfP. Essa paciente apresentava 61 anos e grau de incapacidade leve, com tempo de doença de 14 meses no momento da coleta, e valores de neopterinina também aumentados. Embora a CPV em PBMCs tenha sido de 0,60%, no LCR foi obtida uma carga proviral de 9,37%, representando uma CPV 15,62 vezes maior no LCR do que no soro. Uma segunda paciente com HAM/TSP (símbolo ■), que apresentou a maior concentração de tTau no estudo, era a paciente mais idosa do estudo, com 82 anos, e tempo de doença de aproximadamente 14 anos, e que também apresentou níveis de neopterinina aumentados e CPV de 3,0% em PBMCs. Os níveis de NfL e pNfP por outro lado se mostaram ligeiramente inferiores às medianas desses biomarcadores (Figura 22).

Os pacientes com HAM/TSP com os maiores valores de NfL foram duas mulheres (símbolos ■ / ■) e um homem (■), com idades de 59, 67 e 28 anos, respectivamente, todos com níveis elevados de neopterinina, com exceção de uma paciente que apresentou razão $\text{neopterinina}_{\text{LCR/SORO}} < 1$ (Figura 22). Os valores observados de CPV em PBMCs foram de 9,38%, 5,40% e 10,73%, respectivamente. Para dois desses pacientes (símbolos ■ / ■), a CPV também foi realizada no LCR, com níveis de CPV mais elevados no LCR na comparação com PBMCs em ambos os indivíduos. O paciente com grau de incapacidade grave (símbolo ■) também apresentou a maior concentração de PrPc no LCR (Figura 23). Por outro lado, outros três pacientes com HAM/TSP, que apresentaram níveis elevados de pNfP (símbolos ■ / ■ / ■), também apresentaram níveis elevados de neopterinina, sendo um deles (símbolo ■) um homem com 3 anos de doença, e que também apresentou concentração aumentada de quimiocinas, incluindo CXCL10 (Figuras 22 e 24).

7 DISCUSSÃO

O presente estudo confirmou que pacientes com HAM/TSP apresentando progressão típica da doença apresentam um processo inflamatório crônico no SNC, o que foi identificado pela razão das concentrações de neopterin_{LCR/SORO} maior que 1, permitindo a diferenciação de indivíduos que apresentam evolução muito lenta, e que níveis aumentados de CXCL10 são presentes no LCR de ACs, o que indica a presença de um processo inflamatório e que, provavelmente, o desencadeamento da HAM/TSP depende de um evento secundário.

Esse trabalho se propôs expandir o conhecimento sobre a patogênese da HAM/TSP, através da avaliação de marcadores de lesão neuronal, de inflamação e de migração celular, para estabelecer parâmetros que possam melhor determinar o grau de lesão do SNC em indivíduos infectados pelo HTLV-1. Foi possível confirmar a importância da neopterin como marcador inflamatório, principalmente sua quantificação no LCR e a relação dos níveis no LCR e no soro. Os resultados demonstraram que a neopterin se encontra elevada tanto em pacientes no início da doença, de cinco meses a três anos, assim como naqueles que apresentam mais de 20 anos de doença, reforçando a ideia do caráter crônico da inflamação na HAM/TSP, e que esse parâmetro permanece elevado, principalmente no LCR. A razão da concentração de neopterin_{LCR/SORO} se correlacionou com o índice de progressão da HAM/TSP, mostrando ser um bom parâmetro para discriminar indivíduos com progressão muito lenta daqueles com progressão moderada/rápida. Verificamos também que ACs também podem apresentar níveis aumentados de neopterin no

LCR e/ou no soro, embora a razão de neopterin_{LCR/SORO} em todos os indivíduos desse grupo tenha sido menor que 1, indicando a presença de um processo inflamatório mais acentuado na periferia. O aumento dos níveis de neopterina refletem processos de imunidade mediada por células durante a inflamação. Portanto, a sua quantificação em fluídos humanos pode ser aplicada no monitoramento deste processo (MURR et al., 2002) e, assim, predizer o modo de evolução da doença, pois, quanto maior a intensidade do processo inflamatório, maior a extensão de lesões e a chance de piora da doença.

Em nossos resultados, observamos que ACs e pacientes com HAM/TSP apresentaram mediana dos níveis de neopterina acima dos níveis de referência no LCR (4,2 nmol/L) e no soro (10 nmol/L). Pacientes com HAM/TSP apresentaram níveis significativamente mais elevados de neopterina em comparação com ACs, tanto no soro quanto no LCR (Figura 24). SATO et al. (2013), buscando definir os melhores candidatos a biomarcadores de prognóstico para HAM/TSP, demonstraram que os níveis das quimiocinas CXCL9, CXCL10 e de neopterina apresentavam melhor correlação com a velocidade de progressão da doença, que foi avaliada pela escala de Osame (OSAME, 1990), que considera somente a atividade motora. Esses autores observaram níveis séricos de neopterina consideravelmente mais elevados em pacientes com HAM/TSP em comparação aos ACs. Recentemente, em outro estudo, a dosagem de neopterina também se mostrou um excelente biomarcador associado à atividade e progressão da doença no SNC (TAKATANI et al., 2017).

Diferenças significativas também foram verificadas entre ACs e pacientes com HAM/TSP no que se diz respeito ao grau de inflamação no SNC. Todos os ACs tiveram níveis de neopterina maiores no soro do que no LCR e, conseqüentemente, razão da concentração de neopterin_{LCR/SORO} menor que 1. Com base nesta informação, os ACs formaram três grupos de acordo com os parâmetros de neopterina, aqueles que não tem um processo inflamatório aparente, pois os níveis de neopterina no soro e LCR estavam normais, aqueles com neopterina alterada no LCR e normal no soro, ou com os dois parâmetros alterados, indicando não haver um processo inflamatório relevante/exacerbado no SNC em comparação com a periferia. Por outro lado, pacientes com HAM/TSP apresentaram níveis de neopterina alterados em todas as amostras de LCR, indicando haver um processo inflamatório no SNC mais ou menos intenso, dependendo se a razão de neopterina se mostrou maior ou menor que 1.

Por outro lado, o índice de progressão de doença neurológica na HAM/TSP, definido como pontos na escala IPEC-2 por ano, correlacionou positivamente com os níveis de neopterina no LCR e com a razão de neopterina_{LCR/SORO}, mas não com os níveis de neopterina no soro. Uma avaliação mais aprofundada dos pacientes com razão de neopterina_{LCR/SORO} < 1 (Figura 25) indicou que estes apresentavam progressão lenta da doença (< 0,37 pontos/ano). Esses dados, portanto, sugerem que esse parâmetro se mostra um bom marcador para a diferenciação de indivíduos com progressão moderada/rápida daqueles com perfil lento. Utilizando uma abordagem diferente, SATO et al. (2018) propôs recentemente um novo critério de classificação para a atividade de doença de HAM/TSP. Pacientes foram avaliados de acordo com a taxa de progressão da disfunção motora após início de sintomas, e concentrações de neopterina e CXCL10 foram definidas no LCR, sendo a atividade da doença dividida em alta (progressão rápida), moderada (progressão lenta) e baixa (progressão muito lenta). Pacientes com progressão muito lenta apresentavam HAM/TSP a mais tempo, com baixa atividade de doença e, por isso, não haviam sido submetidos a tratamento. Os níveis destes biomarcadores no LCR, que refletem a inflamação no SNC, foram tão baixos quanto no grupo controle (constituído por ACs e por indivíduos não infectados por HTLV-1 com doença neurológica não inflamatória). Por outro lado, indivíduos com progressão rápida foram caracterizados por altos níveis de biomarcadores inflamatórios e idade avançada quando do início de sintomas. Além disso, a evolução mais rápida na fase inicial da doença pode indicar um importante fator de piora do quadro clínico para pacientes com HAM/TSP e, por isso, um diagnóstico inicial adequado pode determinar a utilização de terapias para melhorar o prognóstico desses indivíduos (SATO et al., 2018).

Algumas quimiocinas analisadas correlacionaram positivamente com os níveis de neopterina. A quimiocina CXCL9 no soro correlacionou com a neopterina no soro, enquanto as quimiocinas CCL2, CXCL8 e CXCL10 correlacionaram com os níveis de neopterina no LCR e/ou a razão de neopterina_{LCR/SORO}, mostrando a relação e a importância dos marcadores de inflamação nessa doença. A quimiocina CCL2 apresentou níveis elevados no LCR de pacientes com HAM/TSP. Foi relatado anteriormente que a infecção pelo HTLV-1 leva a expressão constitutiva de CCL2 em células infectadas. É possível que essa quimiocina, em conjunto com a expressão aumentada de CXCL10, mantenha a reação inflamatória crônica no SNC em pacientes com HAM/TSP. Observamos que ACs apresentaram níveis aumentados de

CCL2 no LCR em relação ao soro, sugerindo que essa quimiocina pode atuar em um processo inflamatório no início da doença neurológica. Uma dinâmica semelhante foi observada para a quimiocina CXCL8, embora não tenha sido observada diferença entre os grupos, a razão da quimiocina CXCL8 no LCR foi maior que 1. Talvez essa quimiocina atue num processo inicial, pois está associada a ruptura da barreira hematoencefálica. A quimiocina CXCL10 se mostrou elevada tanto no soro quanto no LCR de indivíduos com HAM/TSP. E como observado para a neopterinina, CXCL10 também se encontrava aumentada tanto em indivíduos com pouco tempo de doença como naqueles com mais tempo de doença, indicando a importância dessa quimiocina na manutenção da reação inflamatória na patogênese da HAM/TSP.

As quimiocinas são pequenas citocinas com propriedades quimioatrativas, que controlam processos de adesão, quimiotaxia e ativação leucocitária. Algumas são consideradas proinflamatórias e podem ser induzidas durante a resposta imune no sítio de infecção. Cada membro da família das quimiocinas induz ao recrutamento de subtipos bem definidos de leucócitos (GUERREIRO; SANTOS-COSTA; AZEVEDO-PEREIRA, 2011; PALOMINO et al., 2015).

Os resultados do nosso estudo demonstraram níveis séricos das quimiocinas CXCL9, CXCL10 e CXCL11 significativamente mais elevados em indivíduos com HAM/TSP em relação aos ACs, como previamente mostrado em outros estudos (GUERREIRO et al., 2006; NECO et al., 2017; SANTOS; MUNIZ; CARVALHO, 2009). Os níveis das quimiocinas CXCL10 e CXCL11 no LCR também foram maiores em pacientes com HAM/TSP do que em ACs. Entretanto, concentrações muito baixas foram observadas no LCR para CXCL11, assim como para CCL3, CCL4, CCL17 e CXCL5, embora tenha sido obtida diferença significativa entre os grupos. É possível que esses níveis não sejam fisiologicamente relevantes para a atração de células imunes ao sítio de inflamação no SNC em pacientes com HAM/TSP. CXCL9, cuja expressão é demonstrada em alguns estudos (ANDO et al., 2013; CHAVES et al., 2016; SATO et al., 2013), foi detectada no LCR de somente um terço dos pacientes com HAM/TSP.

As quimiocinas CXCL9, CXCL10 e CXCL11 são estruturalmente relacionadas, e tem o receptor CXCR3 em comum, e são fortemente induzidas por citocinas, principalmente IFN- γ , durante infecções, lesões ou respostas inflamatórias e são reconhecidas como importantes no recrutamento de células Th1 (MULLER et al., 2010; PALOMINO et al., 2015). Na HAM/TSP, a indução do recrutamento de células

expressando o receptor CXCR3 para o SNC inclui células T CD4⁺ infectadas por HTLV-1 e forte produtoras de IFN- γ . O IFN- γ estimula a produção de CXCL10 por astrócitos, os principais produtores dessa quimiocina no SNC, gerando uma alça de feedback positivo que resulta em um processo inflamatório crônico do SNC (Figura 11) (ANDO et al., 2013; BANGHAM et al., 2015; FUTSCH et al., 2018; RANSOHOFF, 2002; ZARGARI et al., 2020).

A quimiocina CCL2 foi outra que apresentou diferença significativa no LCR entre os pacientes com HAM/TSP e ACs. CCL2 é ligante de CCR2 e controla a migração e a infiltração de monócitos/macrófagos no SNC (BOSE; CHO, 2013). Diferentes estudos têm demonstrado a indução e envolvimento de CCL2 e seu receptor em distúrbios neurodegenerativos, incluindo a doença de Alzheimer, a esclerose múltipla, o complexo de demência associada ao HIV-1 e a encefalomielite autoimune experimental, que representa um modelo experimental murino para doenças desmielinizantes inflamatórias (AZIZI; KHANNAZER; MIRSHAFIEY, 2014; BOSE; CHO, 2013; FRANCIOTTA et al., 2001; RANSOHOFF, 2002). CCL2 pode ser produzida por vários tipos celulares no SNC, principalmente por astrócitos, micróglia e por células endoteliais (BOSE; CHO, 2013; RANSOHOFF, 2002). Inclusive, essa quimiocina pode aumentar a liberação de PrPc das células envolvidas em alterações do SNC na infecção por HIV (ROBERTS et al., 2010). Na HAM/TSP, CCL2 é expressa predominantemente por células endoteliais vasculares e células mononucleares infiltradas no SNC, atraindo assim células T e monócitos para o SNC (UMEHARA et al., 1996; ZARGARI et al., 2020). Foi mostrado que Tax interrompe a regulação do gene CCL2, promovendo a expressão constitutiva dessa quimiocina em células infectadas (MORI et al., 2000; ZARGARI et al., 2020). Diferentes autores têm demonstrado resultados discordantes quanto às diferenças de níveis séricos de CCL2. NECO et al. (2017) demonstraram que pacientes com HAM/TSP e ACs apresentam níveis semelhantes, enquanto GUERREIRO et al. (2006) indicaram níveis de CCL2 significativamente reduzidos no soro de pacientes com HAM/TSP na comparação com ACs e indivíduos saudáveis. Em nosso estudo, não foi observada diferença significativa entre ACs e pacientes com HAM/TSP quanto à concentração sérica de CCL2. Contudo, foram observados níveis aumentados no LCR de pacientes com HAM/TSP. Também observamos que ACs apresentaram níveis aumentados de CCL2 no LCR em relação ao soro (Figura 31), o que sugere que CCL2 possa atuar em estágios iniciais da doença neurológica, indicando a presença de um processo

inflamatório incipiente, embora não seja tão pronunciado em comparação com indivíduos com HAM/TSP. Esse processo inflamatório, sem alteração clínica, pode ser reforçado pelo achado de marcadores inflamatórios alterados em ACs, tais como os níveis de neopterina no LCR e a razão de neopterina_{LCR/SORO}.

Embora não tenha sido identificada diferença nos níveis de CXCL8 no soro e no LCR entre os grupos da nossa população de estudo, ao analisar a razão da concentração dessa quimiocina no LCR e no soro (Figura 31), foi observada uma dinâmica semelhante à da quimiocina CCL2, em que ACs apresentaram níveis aumentados de CXCL8 no LCR em relação ao soro. CXCL8 é um ligante de CXCR1 e CXCR2 e importante mediador para a infiltração de leucócitos no SNC (CHAVES et al., 2016; ZARGARI et al., 2020). Estes receptores são expressos em neutrófilos, monócitos, células NK, células T CD4⁺ e CD8⁺ (PALOMINO et al., 2015; ZARGARI et al., 2020). CXCL8 possui uma potente atividade quimiotática para linfócitos T e neutrófilos, e é comumente associada à ruptura da barreira hematoencefálica (CHAVES et al., 2016).

Diferentes estudos têm realizado a dosagem de quimiocinas no LCR de pacientes com outras doenças associadas às alterações neurológicas desmielinizantes semelhantes a HAM/TSP, como por exemplo a esclerose múltipla, em que os níveis de quimiocinas inflamatórias, tais como CXCL10 e CCL2, parecem refletir a atividade da doença, retornando à níveis normais após tratamento (FRANCIOTTA et al., 2001; MAHAD; HOWELL; WOODROOFE, 2002; NOVAKOVA et al., 2016). Esses estudos demonstram ainda a presença de células T expressando CXCR3 no LCR, que correlaciona positivamente com os níveis de CXCL10, cuja expressão é observada em lesões, confirmando assim o papel crítico de CXCR3 e CXCL10 no acúmulo de células T no SNC na esclerose múltipla (MAHAD; HOWELL; WOODROOFE, 2002; MULLER et al., 2010; SORENSEN et al., 2002).

A HAM/TSP constitui uma doença neuroinflamatória desmielinizante, crônica, e tipicamente de curso evolutivo lento. No entanto, alguns indivíduos podem apresentar evolução mais rápida ou moderada. De fato, a correlação entre o grau de incapacidade de pacientes com HAM/TSP com o tempo de doença permite definir que quanto maior o tempo de doença, maior o grau de incapacidade física. Alguns estudos relacionam esses diferentes prognósticos com a CPV. Realmente, níveis mais elevados de CPV aumentam a chance de entrada de células T infectadas no SNC e de induzirem inflamação. Por outro lado, tem sido mostrado que a CPV tem baixo valor

preditivo, não sendo capaz de indicar se um paciente apresentará piora ou permanecerá estável, ou ainda, se um indivíduo assintomático irá evoluir para doença. Nossos dados indicaram que células infectadas estão presentes no SNC de ACs, sugerindo que a simples entrada de células infectadas no SNC não é decisiva para o desencadeamento de inflamação. MARTINS et al. (2018), não observaram diferença significativa entre a CPV do LCR de ACs com carga elevada e de pacientes com HAM/TSP, o que reforça nossa conclusão. Embora em nosso estudo tenha sido observado que a média da CPV dos ACs foi menor que a de pacientes com HAM/TSP, quatro indivíduos apresentaram CPV menor que 1%, dentre elas, um paciente com HAM/TSP. Por outro lado, dentre ACs, alguns apresentaram CPV tão elevadas quanto pacientes com HAM/TSP, em torno de 10% de PBMCs infectados. Apesar da pequena amostra utilizada, a porcentagem de células infectadas por HTLV-1 no LCR foi inferior a 10% em ACs, embora dois destes indivíduos tenham apresentado relação $CPV_{LCR/PBMCs} > 1$, além de níveis elevados de neopterinina no LCR, porém, sem aumento dos marcadores de lesão neuronal. Entretanto, um desses indivíduos também apresentou níveis aumentados de CXCL8 no LCR em relação ao soro. Dessa forma, é possível que essa quimiocina participe em estágios iniciais do desenvolvimento de doença neurológica. Alguns autores tem definido que essa relação de CPV é sempre < 1 para ACs, em contraste com os pacientes com HAM/TSP, que apresentam relação > 1 e CPV no LCR $> 10\%$ (LEZIN et al., 2005; MARTINS et al., 2018; OLINDO et al., 2005). Nossos dados ainda mostraram que um dos pacientes com HAM/TSP apresentou CPV no LCR $< 10\%$ e relação < 1 . Contudo, esse paciente apresentou níveis de neopterinina e NfL aumentados no LCR.

Quanto aos marcadores de lesão neuronal, nenhum pareceu diferenciar ACs e pacientes com HAM/TSP, possivelmente, devido ao curso crônico e lento da HAM/TSP. É provável que na progressão clínica subaguda da doença esses marcadores sejam úteis, como é demonstrado na esclerose múltipla, na demência associada ao HIV ou em outras doenças neurodegenerativas agudas.

A proteína Tau é responsável por estabilizar os microtúbulos de axônios e é expressa principalmente em axônios corticais não mielinizados (PETERSON et al., 2014). Em estados patológicos, a proteína Tau sofre hiperfosforilação, perdendo afinidade pelos microtúbulos, e se acumula, formando emaranhados, e esse processo promove o dano axonal, o que resulta em morte do neurônio. A doença de Alzheimer e o mal de Parkinson são exemplos clássicos de tauopatias, doenças

neurodegenerativas causadas pela agregação de proteína Tau fosforilada nos neurônios (DEVOS et al., 2017; MATTSSON et al., 2013, 2016). MALDONADO et al. (2008) demonstraram que os níveis de Tau total (média = $64,6 \pm 54,85$ pg/mL) em pacientes com HAM/TSP foram menores que em grupo controle (média = $108,8 \pm 59,31$ pg/mL). O grupo controle foi constituído por indivíduos sem distúrbios neurológicos e com doenças neurológicas não inflamatórias ou não degenerativas. Por outro lado, a concentração de pTau-Thr181 (média = $35,8 \pm 34,03$ pg/mL) e a proporção pTau-Thr181/Tau total (média = $1,68 \pm 3,77$) foram significativamente mais altas nos indivíduos com HAM/TSP, refletindo o grau de degeneração e dano neuronal. Na doença de Creutzfeldt-Jakob, os níveis de Tau total são muito elevados, sendo mais altos do que na doença de Alzheimer, o que é explicado pela cinética do processo de degeneração neuronal dessa doença, enquanto os níveis de pTau-Thr181 são menores do que na doença de Alzheimer, que apresenta a formação de emaranhados de Tau (DOREY et al., 2015).

Em nossos resultados, a mediana da concentração total de Tau em amostras de LCR foi semelhante entre ACs e pacientes com HAM/TSP, e a pTau-Thr181 foi indetectável nos dois grupos, sugerindo que a HAM/TSP evolui de modo distinto de tauopatias clássicas. Tem sido descrito que os níveis de proteína Tau no LCR se correlacionam positivamente com a taxa de degeneração, sendo mais altos na doença de Creutzfeldt-Jakob, moderados na doença de Alzheimer e normais em pacientes com doenças com degeneração limitada (MALDONADO et al., 2008). Pelo fato da HAM/TSP evoluir de forma crônica e limitada, os pacientes incluídos em nosso estudo não estariam, portanto, sofrendo um processo agudo de destruição de neurônios, o que explicaria os resultados encontrados.

O neurofilamento é o principal constituinte do citoesqueleto de axônios mielinizados e é formado por quatro subunidades, dentre elas as cadeias leve (NfL) e pesada (NfP), que foram quantificadas nesse estudo. Quando ocorrem danos axonais, essas proteínas são liberadas e podem ser quantificadas no LCR para a indicação de dano agudo. Como são proteínas específicas das células do SNC, elas representam bons marcadores de lesão axonal ou degeneração neuronal (KRUT et al., 2014; PETZOLD, 2005; STILUND et al., 2015).

Na esclerose múltipla, diferentes grupos têm demonstrado componentes do neurofilamento como marcadores de atividade da doença, de progressão clínica, e de monitoramento de tratamento (DOMINGUES et al., 2017; NOVAKOVA et al., 2016;

STILUND et al., 2015). TRENTINI et al. (2014) demonstraram uma relação do aumento dos níveis de NfL com o aumento da pontuação em uma escala de incapacidade motora, sendo capaz de prever o desenvolvimento de incapacidade. Também observaram uma correlação de NfP com um índice de gravidade da esclerose múltipla, indicando que pode ser um bom marcador de processos ativos de dano axonal. Os níveis de NfL podem refletir danos axonais agudos, pois se elevam durante recidivas em pacientes com esclerose múltipla remitente-recorrente, a forma mais comum da doença e que apresenta cura espontânea (NOVAKOVA et al., 2016; SALZER; SVENNINGSSON; SUNDSTRÖM, 2010). A dosagem de NfL também se mostra útil na avaliação da eficácia ou monitoramento do tratamento da esclerose múltipla, pois seus níveis diminuem com as terapias modificadoras dessa doença (NOVAKOVA et al., 2016).

Os níveis de NfL também se mostram aumentados na esclerose lateral amiotrófica e na doença de Alzheimer (GAIOTTINO et al., 2013; GANGISHETTI et al., 2018). Os níveis de NfL estão mais associados ao estágio de demência da doença de Alzheimer e pode complementar com outros marcadores já conhecidos dessa doença, como o fragmento β -amiloide e Tau, para informar os processos de neurodegeneração (GANGISHETTI et al., 2018). A combinação desses marcadores melhora a precisão do diagnóstico da doença de Alzheimer (MATTSSON et al., 2016). Já nos casos de complexo de demência associado ao HIV, que se caracteriza por comprometimento cognitivo e motor, os níveis de NfL no LCR se mostraram um bom marcador preditivo, com sua elevação precedendo o desenvolvimento de demência associada ao HIV (GISSLÉN et al., 2007). Seus níveis elevados no LCR em pacientes neuroassintomáticos e não tratados indicam que a presença de lesão subclínica no SNC. Nestes indivíduos, a concentração de NfL correlacionou com a de neopterina, sugerindo que a reação inflamatória no SNC seria importante para o desenvolvimento da lesão axonal na demência associada ao HIV. No entanto, esta associação não foi observada em nosso estudo. Contudo, foi obtida uma forte correlação positiva de pNfP com os níveis de neopterina no LCR e com a razão de neopterina_{LCR/SORO}. Na infecção pelo HIV, o tratamento é capaz de reduzir as concentrações de NfL no LCR, embora os níveis se mantenham mais elevados que em grupo controle (ABDULLE et al., 2007; KRUT et al., 2014; PETERSON et al., 2014).

No presente estudo, ACs e pacientes com HAM/TSP não apresentaram diferença significativa nas concentrações de NfL e pNfP no LCR. No entanto, verificou-

se que alguns indivíduos apresentavam biomarcadores de inflamação e de lesão axonal aumentados, inclusive entre ACs, sugerindo haver uma reação inflamatória com a possível presença de lesão subclínica em ACs, assim como ocorre em indivíduos neuroassintomáticos com HIV. Esse achado pode ser fortalecido pelo estudo de MORGAN et al. (2007), que através de ressonância magnética demonstraram que lesões na substância branca são frequentes em portadores de HTLV-1.

Foi observado também que poucos pacientes com HAM/TSP apresentaram concentrações de NfL e pNfP aumentadas, provavelmente pelo curso lento da HAM/TSP, associada a degeneração axonal parcial, demonstrando que NfL e pNfP não representam bons marcadores de lesão axonal na HAM/TSP, conforme também sugerido por ALBERTI et al. (2009). Como a maioria dos pacientes apresentava longo curso de doença, outra hipótese seria que o período de inflamação mais intensa nesses pacientes já havia passado, e junto disso, o aumento significativo nos níveis desses fatores. Alguns autores mencionam que a melhor forma de se avaliar esses biomarcadores seria através de coletas seriadas (TEUNISSEN; KHALIL, 2012).

A isoforma celular da PrP é expressa constitutivamente em neurônios (ISAACS; JACKSON; ALTMANN, 2006; SPIELHAUPTER; SCHATZL, 2001) e a perda da sua função, causada por um dobramento incorreto da proteína frequentemente associada a mutações genéticas, é um mecanismo patogênico que pode ser atribuído tanto a doenças priônicas quanto a outras doenças neurodegenerativas. Por exemplo, a perda da atividade anti-apoptótica de PrPc pode levar à morte neuronal, ou redução de função pode levar a um aumento dos níveis de β -amiloide na doença de Alzheimer (PARKIN et al., 2007; WESTERGARD; CHRISTENSEN; HARRIS, 2007). Alguns estudos mencionam que os níveis de PrP no LCR correlacionam negativamente com a gravidade da doença, apresentando valores mais baixos em quadros mais graves e agudos, como na doença de Creutzfeldt-Jakob ou na demência associada à doença de Alzheimer, sendo esta associada a níveis de PrP mais altos que na doença de Creutzfeldt-Jakob (DOREY et al., 2015; MEYNE et al., 2009).

A PrPc está inteiramente localizada na membrana plasmática extracelular. Portanto, em caso de dano neuronal, é provável que seja liberada para o meio circundante, se tornando um bom biomarcador para lesão no SNC. Nesse contexto, ROBERTS et al. (2010) verificaram que a quantificação dos níveis de PrPc livre no LCR, mas não no soro, pode ser um biomarcador específico para deficiência

neurocognitiva e disfunção do SNC, com valores elevados no LCR em indivíduos com deficiência neurocognitiva associada ao HIV.

No entanto, em nosso estudo, os níveis de PrPc livre no soro em indivíduos infectados por HTLV-1 foram mais altos que no LCR. Os níveis de PrPc no LCR se mostraram extremamente baixos, porém, foram significativamente mais elevados nos pacientes com HAM/TSP que em ACs. Diferenças com os níveis descritos na literatura podem estar relacionadas com testes direcionados a epitopos distintos da PrPc e testes com diferentes níveis de sensibilidade. TORRES et al. (2012) puderam observar uma redução na expressão de PrPc no LCR de um paciente com HAM/TSP. Contudo, não é possível descartar a hipótese de que a infecção pelo HTLV-1 possa alterar a expressão de PrPc na superfície de células infectadas e modular suas funções.

Embora os objetivos desse estudo tenham sido alcançados, há algumas limitações, como o número reduzido da população de estudo, devido a dificuldade de inclusão de participantes, especialmente com relação ao consentimento para a realização de punção lombar. Além disso, não foi possível incluir um grupo de controle com indivíduos soronegativos para HTLV-1 sem doença neurodegenerativa ou neuroinflamatória, e a seleção de pacientes também não abrangeu indivíduos com evolução clínica subaguda da HAM/TSP. Além disso, o trabalho também poderia ter sido enriquecido com a determinação da frequência de populações celulares em sangue periférico e no LCR, em ACs e pacientes com HAM/TSP.

8 CONCLUSÕES

Dessa forma, podemos concluir que:

- A CPV em PBMCs foi significativamente maior em pacientes com HAM/TSP, e nesses pacientes foi maior em células do LCR que em PBMCs;
- Os marcadores de lesão neuronal, tais como níveis totais de proteína Tau e pTau-Thr181, de NfL e pNfP, e PrPc (ao menos no soro), não se mostraram bons biomarcadores de diferenciação entre ACs e pacientes com HAM/TSP;
- A dosagem de neopterin foi capaz de diferenciar ACs e pacientes com HAM/TSP, especialmente os níveis no LCR e razão de neopterin_{LCR/SORO}. A razão de neopterin_{LCR/SORO} também permitiu diferenciar indivíduos com progressão lenta daqueles com progressão rápida/moderada;
- Os níveis das quimionas CXCL9, CXCL10 e CXCL11 no soro, e de CCL2 e CXCL10 no LCR foram marcadamente mais elevados em pacientes com HAM/TSP na comparação com ACs.
- Concentrações mais elevadas das quimiocinas CCL2, CXCL8 e CXCL10 no LCR em relação ao soro demonstraram haver um processo inflamatório crônico tanto em pacientes com HAM/TSP quanto em ACs.

REFERÊNCIAS

- ABDULLE, S. et al. CSF neurofilament protein (NFL) — a marker of active HIV-related neurodegeneration. **Journal of Neurology**, v. 254, n. 8, p. 1026–1032, ago. 2007.
- ALAMY, A. H. et al. Dysautonomia in human T-cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Annals of neurology**, v. 50, n. 5, p. 681–685, nov. 2001.
- ALBAYAR, A. A. et al. Biomarkers in Spinal Cord Injury: Prognostic Insights and Future Potentials. **Frontiers in Neurology**, v. 10, 29 jan. 2019.
- ALBERTI, C. et al. Comparative study of CSF neurofilaments in HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis and other neurological disorders. **AIDS research and human retroviruses**, v. 25, n. 8, p. 803–809, ago. 2009.
- ANDERSON, A. M. et al. Plasma and Cerebrospinal Fluid Biomarkers Predict Cerebral Injury in HIV-Infected Individuals on Stable Combination Antiretroviral Therapy. **Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)**, v. 69, n. 1, p. 29–35, 1 maio 2015.
- ANDO, H. et al. Positive feedback loop via astrocytes causes chronic inflammation in virus-associated myelopathy. **Brain**, v. 136, n. 9, p. 2876–2887, 1 set. 2013.
- ARAUJO, A. Q. C.; SILVA, M. T. T. The HTLV-1 neurological complex. **The Lancet. Neurology**, v. 5, n. 12, p. 1068–1076, dez. 2006.
- ARAYA, N. et al. Human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and regulatory T cells in HTLV-1-associated neuroinflammatory disease. **Viruses**, v. 3, n. 9, p. 1532–1548, set. 2011.
- ASHKAR, S. et al. Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. **Science (New York, N.Y.)**, v. 287, n. 5454, p. 860–864, 4 fev. 2000.
- ASQUITH, B. et al. In vivo T lymphocyte dynamics in humans and the impact of human T-lymphotropic virus 1 infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 19, p. 8035–8040, 8 maio 2007.
- ASQUITH, B.; BANGHAM, C. R. M. How does HTLV-I persist despite a strong cell-mediated immune response? **Trends in immunology**, v. 29, n. 1, p. 4–11, jan. 2008.
- AZIZI, G.; KHANNAZER, N.; MIRSHAFIEY, A. The Potential Role of Chemokines in Alzheimer's Disease Pathogenesis. **American Journal of Alzheimer's Disease and Other Dementias**, v. 29, n. 5, p. 415–425, ago. 2014.
- AZRAN, I.; SCHAVINSKY-KHRAPUNSKY, Y.; ABOUD, M. Role of Tax protein in human T-cell leukemia virus type-I leukemogenicity. **Retrovirology**, v. 1, p. 20, 13 ago. 2004.

BANGHAM, C. R. M. The immune control and cell-to-cell spread of human T-lymphotropic virus type 1. **The Journal of general virology**, v. 84, n. Pt 12, p. 3177–3189, dez. 2003.

BANGHAM, C. R. M. et al. HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Nature reviews. Disease primers**, v. 1, p. 15012, 18 jun. 2015.

BANGHAM, C. R. M.; OSAME, M. Cellular immune response to HTLV-1. **Oncogene**, v. 24, n. 39, p. 6035–6046, set. 2005.

BARMAK, K. et al. Human T cell leukemia virus type I-induced disease: pathways to cancer and neurodegeneration. **Virology**, v. 308, n. 1, p. 1–12, 30 mar. 2003.

BIBLIOTECA VIRTUAL EM SAÚDE. **Dia Mundial do HTLV – 10 de Novembro – BVS SES-SP**, 16 out. 2019. Disponível em: <<https://ses.sp.bvs.br/2019/10/16/dia-mundial-do-htlv-10-de-novembro-2/>>. Acesso em: 18 jul. 2020

BITTENCOURT, A. L.; DE OLIVEIRA, M. DE F. P. Cutaneous manifestations associated with HTLV-1 infection. **International journal of dermatology**, v. 49, n. 10, p. 1099–1110, out. 2010.

BOSE, S.; CHO, J. Role of chemokine CCL2 and its receptor CCR2 in neurodegenerative diseases. **Archives of Pharmacal Research**, v. 36, n. 9, p. 1039–1050, 1 set. 2013.

BOXUS, M. et al. The HTLV-1 Tax interactome. **Retrovirology**, v. 5, p. 76, 14 ago. 2008.

CAO, S. et al. Analysis of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Particles by Using Cryo-Electron Tomography. **Journal of Virology**, v. 89, n. 4, p. 2430–2435, 15 fev. 2015.

CARNEIRO-PROIETTI, A. B. F. et al. [Infection and disease caused by the human T cell lymphotropic viruses type I and II in Brazil]. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 5, p. 499–508, out. 2002.

CARNEIRO-PROIETTI, A. B. F. **HTLV**. 6. ed. Belo Horizonte: Fundação Hemominas, 2015. v. 16

CARPENTIER, A. et al. Modes of Human T Cell Leukemia Virus Type 1 Transmission, Replication and Persistence. **Viruses**, v. 7, n. 7, p. 3603–3624, 7 jul. 2015.

CASTRO-COSTA, C. M. D. et al. Proposal for Diagnostic Criteria of Tropical Spastic Paraparesis/HTLV-I-Associated Myelopathy (TSP/HAM). **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 22, n. 10, p. 931–935, 1 out. 2006.

CATALAN-SOARES, B. C.; PROIETTI, F. A. Human T-cell lymphotropic viruses (HTLV) in the last decade (1990-2000). v. 4, p. 15, 2001.

CATALAN-SOARES, B.; CARNEIRO-PROIETTI, A. B. DE F.; 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. **Cadernos de saude publica**, v. 21, n. 3, p. 926–931, jun. 2005.

CHAVES, D. G. et al. Plasmatic proinflammatory chemokines levels are tricky markers to monitoring HTLV-1 carriers. **Journal of Medical Virology**, v. 88, n. 8, p. 1438–1447, 2016.

COFFIN, J. M. The discovery of HTLV-1, the first pathogenic human retrovirus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 51, p. 15525–15529, 22 dez. 2015.

DEVOS, S. L. et al. Tau reduction prevents neuronal loss and reverses pathological tau deposition and seeding in mice with tauopathy. **Science translational medicine**, v. 9, n. 374, p. eaag0481, 25 jan. 2017.

DOMINGUES, R. B. et al. O líquido cefalorraquidiano na esclerose múltipla: muito além das bandas. **Einstein (São Paulo)**, v. 15, n. 1, p. 100–104, mar. 2017.

DOREY, A. et al. Association of Cerebrospinal Fluid Prion Protein Levels and the Distinction Between Alzheimer Disease and Creutzfeldt-Jakob Disease. **JAMA Neurology**, v. 72, n. 3, p. 267, 1 mar. 2015.

DOUEN, A. G.; PRINGLE, C. E.; GUBERMAN, A. Human T-cell lymphotropic virus type 1 myositis, peripheral neuropathy, and cerebral white matter lesions in the absence of spastic paraparesis. **Archives of neurology**, v. 54, n. 7, p. 896–900, jul. 1997.

EISENHUT, M. Neopterin in Diagnosis and Monitoring of Infectious Diseases. **Journal of Biomarkers**, v. 2013, 2013.

ESPÍNDOLA, O. M. et al. High IFN- γ /IL-10 Expression Ratio and Increased Frequency of Persistent Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1-Infected Clones Are Associated with Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis Development. **Intervirolgy**, v. 58, n. 2, p. 106–114, 2015.

FIOCRUZ. **Estudo aponta disseminação de infecção por HTLV na Bahia**. Disponível em: <<https://portal.fiocruz.br/noticia/estudo-aponta-disseminacao-de-infeccao-por-htlv-na-bahia>>. Acesso em: 19 jul. 2020.

FORD, M. J. et al. Selective expression of prion protein in peripheral tissues of the adult mouse. **Neuroscience**, v. 113, n. 1, p. 177–192, 2002.

“**Four Parameter Logistic Curve**” online data analysis tool, MyAssays Ltd., 10 outubro 2018, <http://www.myassays.com/four-parameter-logistic-curve.assay>. Disponível em: <<http://www.myassays.com/four-parameter-logistic-curve.assay>>. Acesso em: 10 out. 2018.

FRANCIOTTA, D. et al. Serum and CSF levels of MCP-1 and IP-10 in multiple sclerosis patients with acute and stable disease and undergoing immunomodulatory therapies. **Journal of Neuroimmunology**, v. 115, n. 1, p. 192–198, 2 abr. 2001.

- FURUYA, T. et al. Elevated levels of interleukin-12 and interferon-gamma in patients with human T lymphotropic virus type I-associated myelopathy. **Journal of neuroimmunology**, v. 95, n. 1–2, p. 185–189, 1 mar. 1999.
- FUSTER-MATANZO, A.; HERNÁNDEZ, F.; ÁVILA, J. Tau Spreading Mechanisms; Implications for Dysfunctional Tauopathies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 3, 25 fev. 2018.
- FUTSCH, N. et al. Cytokine Networks Dysregulation during HTLV-1 Infection and Associated Diseases. **Viruses**, v. 10, n. 12, 5 dez. 2018.
- GAFSON, A. R. et al. Neurofilaments: neurobiological foundations for biomarker applications. **Brain**, v. 143, n. 7, p. 1975–1998, 1 jul. 2020.
- GAIOTTINO, J. et al. Increased neurofilament light chain blood levels in neurodegenerative neurological diseases. **PloS one**, v. 8, n. 9, p. e75091, 2013.
- GANGISHETTI, U. et al. Non-beta-amyloid/tau cerebrospinal fluid markers inform staging and progression in Alzheimer's disease. **Alzheimer's Research & Therapy**, v. 10, n. 1, p. 98, 25 set. 2018.
- GESSAIN, A. et al. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. **Lancet (London, England)**, v. 2, n. 8452, p. 407–410, 24 ago. 1985.
- GESSAIN, A.; CASSAR, O. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. **Frontiers in microbiology**, v. 3, p. 388, 2012.
- GIESEG, S. P.; BAXTER-PARKER, G.; LINDSAY, A. Neopterin, Inflammation, and Oxidative Stress: What Could We Be Missing? **Antioxidants**, v. 7, n. 7, 26 jun. 2018.
- GISSLÉN, M. et al. Elevated Cerebrospinal Fluid Neurofilament Light Protein Concentrations Predict the Development of AIDS Dementia Complex. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 195, n. 12, p. 1774–1778, 15 jun. 2007.
- GISSLÉN, M. et al. Amyloid and tau cerebrospinal fluid biomarkers in HIV infection. **BMC neurology**, v. 9, p. 63, 22 dez. 2009.
- GONÇALVES, D. U. et al. Epidemiology, Treatment, and Prevention of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1-Associated Diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 3, p. 577–589, 1 jul. 2010.
- GOTUZZO, E. et al. Clinical Characteristics of Patients in Peru with Human T Cell Lymphotropic Virus Type 1—Associated Tropical Spastic Paraparesis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, n. 7, p. 939–944, 1 out. 2004.
- GROSS, C.; THOMA-KRESS, A. K. Molecular Mechanisms of HTLV-1 Cell-to-Cell Transmission. **Viruses**, v. 8, n. 3, p. 74, mar. 2016.
- GUERREIRO, J. B. et al. Levels of serum chemokines discriminate clinical myelopathy associated with human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)/tropical

spastic paraparesis (HAM/TSP) disease from HTLV-1 carrier state. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 145, n. 2, p. 296–301, ago. 2006.

GUERREIRO, R.; SANTOS-COSTA, Q.; AZEVEDO-PEREIRA, J. The chemokines and their receptors: Characteristics and physiological functions. **Acta médica portuguesa**, v. 24 Suppl 4, p. 967–76, 1 dez. 2011.

HAGBERG, L. et al. Cerebrospinal fluid neopterin concentrations in central nervous system infection. **The Journal of infectious diseases**, v. 168, n. 5, p. 1285–1288, nov. 1993.

HAGBERG, L. et al. Cerebrospinal fluid neopterin: an informative biomarker of central nervous system immune activation in HIV-1 infection. **AIDS Research and Therapy**, v. 7, p. 15, 3 jun. 2010.

HENRY, J. **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. 20. ed. Barueri, SP: Manole, 2008.

HIGUCHI, M. et al. Membrane tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) expressed on HTLV-I-infected T cells mediates a costimulatory signal for B cell activation-- characterization of membrane TNF-alpha. **Clinical immunology and immunopathology**, v. 82, n. 2, p. 133–140, fev. 1997.

HIGUCHI, M.; FUJII, M. Distinct functions of HTLV-1 Tax1 from HTLV-2 Tax2 contribute key roles to viral pathogenesis. **Retrovirology**, v. 6, p. 117, 17 dez. 2009.

IGAKURA, T. et al. Spread of HTLV-I Between Lymphocytes by Virus-Induced Polarization of the Cytoskeleton. **Science**, v. 299, n. 5613, p. 1713–1716, 14 mar. 2003.

ISAACS, J. D.; JACKSON, G. S.; ALTMANN, D. M. The role of the cellular prion protein in the immune system. **Clinical and experimental immunology**, v. 146, n. 1, p. 1–8, out. 2006.

JOHNSON, J. M.; HARROD, R.; FRANCHINI, G. Molecular biology and pathogenesis of the human T-cell leukaemia/lymphotropic virus Type-1 (HTLV-1). **International Journal of Experimental Pathology**, v. 82, n. 3, p. 135–147, 2001.

KALYANARAMAN, V. et al. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. **Science**, v. 218, n. 4572, p. 571–573, 5 nov. 1982.

KAMOI, K.; MOCHIZUKI, M. HTLV-1 uveitis. **Frontiers in microbiology**, v. 3, p. 270, 2012.

KHALIL, M. et al. Neurofilaments as biomarkers in neurological disorders. **Nature Reviews Neurology**, v. 14, n. 10, p. 577–589, out. 2018.

KRUT, J. J. et al. Cerebrospinal fluid Alzheimer's biomarker profiles in CNS infections. **Journal of neurology**, v. 260, n. 2, p. 620–626, fev. 2013.

KRUT, J. J. et al. Biomarker Evidence of Axonal Injury in Neuroasymptomatic HIV-1 Patients. **PLOS ONE**, v. 9, n. 2, p. e88591, 11 fev. 2014.

KURODA, Y. et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-1 increase in cerebrospinal fluid, but not in serum, of HTLV-I-associated myelopathy. **Journal of neuroimmunology**, v. 45, n. 1–2, p. 133–136, jun. 1993.

LEBLANC, P.; BAAS, D.; DARLIX, J.-L. Analysis of the interactions between HIV-1 and the cellular prion protein in a human cell line. **Journal of molecular biology**, v. 337, n. 4, p. 1035–1051, 2 abr. 2004.

LEITE, A. C. C. et al. Peripheral neuropathy in HTLV-I infected individuals without tropical spastic paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy. **Journal of neurology**, v. 251, n. 7, p. 877–881, jul. 2004.

LENZI, M. E. R. et al. Dermatological findings of human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-I)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 36, n. 4, p. 507–513, 15 fev. 2003.

LEPOUTRE, V. et al. Role of resident CNS cell populations in HTLV-1-associated neuroinflammatory disease. **Frontiers in bioscience (Landmark edition)**, v. 14, p. 1152–1168, 1 jan. 2009.

LEZIN, A. et al. Human T Lymphotropic Virus Type I (HTLV-I) Proviral Load in Cerebrospinal Fluid: A New Criterion for the Diagnosis of HTLV-I-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis? **The Journal of Infectious Diseases**, v. 191, n. 11, p. 1830–1834, 1 jun. 2005.

LIMA, M. A. et al. Subacute progression of human T-lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Journal of neurovirology**, v. 13, n. 5, p. 468–473, out. 2007.

LIMA, M. A. S. D.; BICA, R. B. S.; ARAUJO, A. Q. C. Gender influence on the progression of HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry**, v. 76, n. 2, p. 294–296, fev. 2005.

MAHAD, D.; HOWELL, S.; WOODROOFE, M. Expression of chemokines in the CSF and correlation with clinical disease activity in patients with multiple sclerosis. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, v. 72, n. 4, p. 498–502, abr. 2002.

MAHIEUX, R.; GESSAIN, A. The human HTLV-3 and HTLV-4 retroviruses: New members of the HTLV family. **Pathologie Biologie**, v. 57, n. 2, p. 161–166, mar. 2009.

MALDONADO, H. et al. Microtubule proteins and their post-translational forms in the cerebrospinal fluid of patients with paraparesis associated with HTLV-I infection and in SH-SY5Y cells: An in vitro model of HTLV-I-induced disease. **Biological research**, v. 41, n. 3, p. 239–259, 2008.

MANNI, G. et al. The cellular prion protein beyond prion diseases. **Swiss Medical Weekly**, v. 150, n. 1718, 24 abr. 2020.

MARTINS, M. L. et al. HTLV-1 proviral load in cerebrospinal fluid may not be a good marker to differentiate asymptomatic carriers with high proviral load in blood from HAM/TSP patients. **Journal of NeuroVirology**, v. 24, n. 4, p. 432–438, ago. 2018.

MATSUOKA, M.; JEANG, K.-T. Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and leukemic transformation: viral infectivity, Tax, HBZ and therapy. **Oncogene**, v. 30, n. 12, p. 1379–1389, mar. 2011.

MATTSSON, N. et al. CSF biomarker variability in the Alzheimer's Association quality control program. **Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association**, v. 9, n. 3, p. 251–261, maio 2013.

MATTSSON, N. et al. Cerebrospinal fluid tau, neurogranin, and neurofilament light in Alzheimer's disease. **EMBO molecular medicine**, v. 8, n. 10, p. 1184–1196, out. 2016.

MCGUIRE, J. L. et al. Central and peripheral markers of neurodegeneration and monocyte activation in HIV-associated neurocognitive disorders. **Journal of neurovirology**, v. 21, n. 4, p. 439–448, ago. 2015.

MERLE, H. et al. Ocular lesions in 200 patients infected by the human T-cell lymphotropic virus type 1 in martinique (French West Indies). **American journal of ophthalmology**, v. 134, n. 2, p. 190–195, ago. 2002.

MEYNE, F. et al. Total Prion Protein Levels in the Cerebrospinal Fluid are Reduced in Patients with Various Neurological Disorders. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 17, n. 4, p. 863–873, 23 jul. 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Cadernos de atenção básica: saúde da criança, aleitamento materno e alimentação complementar. **Revista de Enfermagem UFPE on line**, v. 12, n. 1, p. 184, 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **10 de novembro, Dia Mundial de Combate ao Vírus HTLV**. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pt-br/noticias/10-de-novembro-dia-mundial-de-combate-ao-virus-htlv>>. Acesso em: 18 jul. 2020.

MORGAN, D. J. et al. Brain Magnetic Resonance Imaging White Matter Lesions Are Frequent in HTLV-I Carriers and Do Not Discriminate from HAM/TSP. **AIDS research and human retroviruses**, v. 23, n. 12, p. 1499–1504, dez. 2007.

MORI, N. et al. Human T-Cell Leukemia Virus Type I Tax Activates Transcription of the Human Monocyte Chemoattractant Protein-1 Gene through Two Nuclear Factor- κ B Sites. **Cancer Research**, v. 60, n. 17, p. 4939–4945, 1 set. 2000.

MULLER, M. et al. Review: The chemokine receptor CXCR3 and its ligands CXCL9, CXCL10 and CXCL11 in neuroimmunity--a tale of conflict and conundrum. **Neuropathology and applied neurobiology**, v. 36, n. 5, p. 368–387, ago. 2010.

MURR, C. et al. Neopterin as a Marker for Immune System Activation. **Current Drug Metabolism**, v. 3, n. 2, p. 175–187, 1 abr. 2002.

NAGAI, M.; OSAME, M. Human T-cell lymphotropic virus type I and neurological diseases. **Journal of neurovirology**, v. 9, n. 2, p. 228–235, abr. 2003.

NAKAMURA, S. et al. Detection of tumor necrosis factor-alpha-positive cells in cerebrospinal fluid of patients with HTLV-I-associated myelopathy. **Journal of neuroimmunology**, v. 42, n. 2, p. 127–130, fev. 1993.

NARIKAWA, K. et al. CSF-chemokines in HTLV-I-associated myelopathy: CXCL10 up-regulation and therapeutic effect of interferon-alpha. **Journal of neuroimmunology**, v. 159, n. 1–2, p. 177–182, fev. 2005.

NECO, H. V. P. DA C. et al. Mediators Go Together: High Production of CXCL9, CXCL10, IFN- γ , and TNF- α in HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 33, n. 11, p. 1134–1139, nov. 2017.

NEJMEDDINE, M. et al. Human T-lymphotropic virus, type 1, tax protein triggers microtubule reorientation in the virological synapse. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 33, p. 29653–29660, 19 ago. 2005.

NEUVEUT, C.; JEANG, K. T. HTLV-I Tax and cell cycle progression. **Progress in cell cycle research**, v. 4, p. 157–162, 2000.

NISHIMOTO, N. et al. Elevated levels of interleukin-6 in serum and cerebrospinal fluid of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Journal of the neurological sciences**, v. 97, n. 2–3, p. 183–193, jul. 1990.

NISHIURA, Y. et al. Increased production of inflammatory cytokines in cultured CD4+ cells from patients with HTLV-I-associated myelopathy. **The Tohoku journal of experimental medicine**, v. 179, n. 4, p. 227–233, ago. 1996.

NOVAKOVA, L. et al. Cerebrospinal fluid biomarkers as a measure of disease activity and treatment efficacy in relapsing-remitting multiple sclerosis. **Journal of neurochemistry**, 27 out. 2016.

NUNES, D. et al. HTLV-1 is predominantly sexually transmitted in Salvador, the city with the highest HTLV-1 prevalence in Brazil. **PLoS ONE**, v. 12, n. 2, 3 fev. 2017.

OLINDO, S. et al. HTLV-1 proviral load in peripheral blood mononuclear cells quantified in 100 HAM/TSP patients: a marker of disease progression. **Journal of the neurological sciences**, v. 237, n. 1–2, p. 53–59, 15 out. 2005.

OSAME, M. et al. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. **Lancet (London, England)**, v. 1, n. 8488, p. 1031–1032, 3 maio 1986.

PALOMINO, D. C. T. et al. Quimiocinas e imunidade. **Einstein (São Paulo)**, v. 13, n. 3, p. 469–473, set. 2015.

PARKIN, E. T. et al. Cellular prion protein regulates beta-secretase cleavage of the Alzheimer's amyloid precursor protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 26, p. 11062–11067, 26 jun. 2007.

PETERSON, J. et al. Cerebrospinal fluid (CSF) neuronal biomarkers across the spectrum of HIV infection: hierarchy of injury and detection. **PLoS one**, v. 9, n. 12, p. e116081, 2014.

PETZOLD, A. Neurofilament phosphoforms: surrogate markers for axonal injury, degeneration and loss. **Journal of the neurological sciences**, v. 233, n. 1–2, p. 183–198, 15 jun. 2005.

PIQUE, C.; JONES, K. S. Pathways of cell-cell transmission of HTLV-1. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, 2012.

POIESZ, B. J. et al. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 77, n. 12, p. 7415–7419, dez. 1980.

PRINCE, H. E. et al. Spontaneous lymphocyte proliferation in human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) and HTLV-II infection: T-cell subset responses and their relationships to the presence of provirus and viral antigen production. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 1, n. 3, p. 273–282, maio 1994.

PROIETTI, F. A. et al. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. **Oncogene**, v. 24, n. 39, p. 6058–6068, set. 2005.

PUCCIONI-SOHLER, M. et al. Increasing awareness of human T-lymphotropic virus type-1 infection: a serious, invisible, and neglected health problem in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, 2019.

RANSOHOFF, R. M. The Chemokine System in Neuroinflammation: An Update. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. Supplement_2, p. S152–S156, 1 dez. 2002.

RIBAS, J. G. R.; MELO, G. C. N. DE. Mielopatia associada ao vírus linfotrópico humano de células T do tipo 1 (HTLV-1). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 4, p. 377–384, ago. 2002.

ROBERTS, T. K. et al. PrPC, the cellular isoform of the human prion protein, is a novel biomarker of HIV-Associated Neurocognitive Impairment and Mediates Neuroinflammation. **The American journal of pathology**, v. 177, n. 4, p. 1848–1860, out. 2010.

ROMANELLI, L. C. F.; CARAMELLI, P.; PROIETTI, A. B. DE F. C. Human T cell lymphotropic virus (HTLV)1: when to suspect infection? **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 3, p. 340–347, 2010.

ROSADAS, C. et al. Estimation of HTLV-1 vertical transmission cases in Brazil per annum. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 11, 12 nov. 2018.

SAGGIORO, D. Anti-apoptotic effect of Tax: an NF-kappaB path or a CREB way? **Viruses**, v. 3, n. 7, p. 1001–1014, jul. 2011.

SALZER, J.; SVENNINGSSON, A.; SUNDSTRÖM, P. Neurofilament light as a prognostic marker in multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis Journal**, v. 16, n. 3, p. 287–292, mar. 2010.

SANTOS, S. B.; MUNIZ, A. L.; CARVALHO, E. M. Imunopatogênese da mielopatia associada ao HTLV-I. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 79, n. 9, p. 11–17, 2009.

SATO, T. et al. CSF CXCL10, CXCL9, and neopterin as candidate prognostic biomarkers for HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 10, p. e2479, 2013.

SATO, T. et al. Proposal of Classification Criteria for HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis Disease Activity. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 1651, 2018.

SILVA, M. et al. Neuropsychological assessment in HTLV-1 infection: a comparative study among TSP/HAM, asymptomatic carriers, and healthy controls. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, v. 74, n. 8, p. 1085–1089, ago. 2003.

SILVA, M. T. T. et al. Human T Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1) Proviral Load in Asymptomatic Carriers, HTLV-1–Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis, and Other Neurological Abnormalities Associated with HTLV-1 Infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, n. 5, p. 689–692, 1 mar. 2007.

SINGH, A. et al. Phosphorylated neurofilament heavy: A potential blood biomarker to evaluate the severity of acute spinal cord injuries in adults. **International Journal of Critical Illness and Injury Science**, v. 7, n. 4, p. 212–217, 2017.

SJÖGREN, M. et al. Tau and Abeta42 in cerebrospinal fluid from healthy adults 21–93 years of age: establishment of reference values. **Clinical Chemistry**, v. 47, n. 10, p. 1776–1781, out. 2001.

SORENSEN, T. L. et al. Multiple sclerosis: a study of CXCL10 and CXCR3 co-localization in the inflamed central nervous system. **Journal of neuroimmunology**, v. 127, n. 1–2, p. 59–68, jun. 2002.

SPIELHAUPTER, C.; SCHATZL, H. M. PrPC directly interacts with proteins involved in signaling pathways. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 48, p. 44604–44612, 30 nov. 2001.

STILUND, M. et al. Biomarkers of Inflammation and Axonal Degeneration/Damage in Patients with Newly Diagnosed Multiple Sclerosis: Contributions of the Soluble CD163 CSF/Serum Ratio to a Biomarker Panel. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, 10 abr. 2015.

SUN, S.-C.; YAMAOKA, S. Activation of NF- κ B by HTLV-I and implications for cell transformation. **Oncogene**, v. 24, n. 39, p. 5952–5964, set. 2005.

TAKATANI, M. et al. Clinical and laboratory features of HTLV-I asymptomatic carriers and patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis from the

Brazilian Amazon. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 59, p. e5, 3 abr. 2017.

TAKATSUKI, K. Discovery of adult T-cell leukemia. **Retrovirology**, v. 2, n. 1, p. 16, 2 mar. 2005.

TAKENOUCI, N. et al. Usefulness of proviral load measurement for monitoring of disease activity in individual patients with human T-lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Journal of neurovirology**, v. 9, n. 1, p. 29–35, fev. 2003.

TEUNISSEN, C. E.; KHALIL, M. Neurofilaments as biomarkers in multiple sclerosis. **Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)**, v. 18, n. 5, p. 552–556, maio 2012.

TORRES, M. et al. Altered Prion Protein Expression Pattern in CSF as a Biomarker for Creutzfeldt-Jakob Disease. **PLOS ONE**, v. 7, n. 4, p. e36159, 27 abr. 2012.

TRENTINI, A. et al. N-acetylaspartate and neurofilaments as biomarkers of axonal damage in patients with progressive forms of multiple sclerosis. **Journal of neurology**, v. 261, n. 12, p. 2338–2343, dez. 2014.

UCHIYAMA, T. et al. Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. **Blood**, v. 50, n. 3, p. 481–492, set. 1977.

UMEHARA, F. et al. Cytokine expression in the spinal cord lesions in HTLV-I-associated myelopathy. **Journal of neuropathology and experimental neurology**, v. 53, n. 1, p. 72–77, jan. 1994.

UMEHARA, F. et al. Expression of adhesion molecules and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in the spinal cord lesions in HTLV-I-associated myelopathy. **Acta Neuropathologica**, v. 91, n. 4, p. 343–350, 1 mar. 1996.

VILLAR, L. M. et al. Cerebrospinal fluid immunological biomarkers associated with axonal damage in multiple sclerosis. **European journal of neurology**, v. 22, n. 8, p. 1169–1175, ago. 2015.

WEIS, S. et al. Expression of cellular prion protein (PrP(c)) in schizophrenia, bipolar disorder, and depression. **Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)**, v. 115, n. 5, p. 761–771, maio 2008.

WESTERGARD, L.; CHRISTENSEN, H. M.; HARRIS, D. A. The Cellular Prion Protein (PrPC): Its Physiological Function and Role in Disease. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1772, n. 6, p. 629–644, jun. 2007.

WHITE, G. E.; IQBAL, A. J.; GREAVES, D. R. CC Chemokine Receptors and Chronic Inflammation—Therapeutic Opportunities and Pharmacological Challenges. **Pharmacological Reviews**, v. 65, n. 1, p. 47–89, jan. 2013.

YAMANO, Y.; SATO, T. Clinical Pathophysiology of Human T-Lymphotropic Virus-Type 1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, 9 nov. 2012.

YUAN, A. et al. Neurofilaments and Neurofilament Proteins in Health and Disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 9, n. 4, abr. 2017.

ZARGARI, R. et al. The Role of Chemokines in the Pathogenesis of HTLV-1. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 2020.

ZHANG, W. et al. Morphology and ultrastructure of retrovirus particles. **AIMS biophysics**, v. 2, n. 3, p. 343–369, 2015.

ANEXO A

Escala IPEC-2
Escore motor: Marcha () 0. Normal 1. Anormal mas deambula de forma independente 2. Anormal e dependente de suporte unilateral eventual 3. Anormal e dependente de suporte unilateral permanente 4. Anormal e dependente de suporte bilateral eventual 5. Anormal e dependente de suporte bilateral permanente 6. Anormal, dependente de suporte bilateral permanente e uso ocasional de cadeira de rodas (CR) 7. Uso permanente de CR, é capaz de levantar e permanecer em pé sem suporte 8. Uso permanente de CR, usa os braços para se levantar, permanece em pé sem suporte 9. Uso permanente de CR, precisa de ajuda de terceiros para se levantar e permanece em pé com suporte 10. Uso permanente de CR, não consegue se levantar, realiza movimentos voluntários com os membros inferiores quando sentado 11. Uso permanente de CR, não consegue se levantar, não apresenta movimentos voluntários nos membros inferiores
Escore motor: Corrida () 0. Corre 1. Incapaz de correr
Escore motor: Subir escadas () 0. Sobe escadas 1. Sobe escadas somente segurando no corrimão 2. Incapaz de subir escadas
Escore motor: Pular () 0. Pula com um ou dois pés 1. Pula somente com os dois pés 2. Pula somente com suporte para as mãos 3. Incapaz de pular
Escore de espasticidade: Clônus () – Ao apoiar os pés, eles tremem? Se sim, marcar (2) 0. Ausente 1. Somente induzido pelo examinador 2. Espontâneo
Escore de espasticidade: Espasmos flexores/extensores () - Suas pernas ficam rígidas, esticando ou dobrando involuntariamente? 0. Ausente 1. Presente
Escore sensitivo: Parestesias () 0. Ausente 1. Presente, eventualmente (>2 vezes semana) 2. Presente, permanentemente
Escore sensitivo: Dor lombar () 0. Ausente 1. Presente eventualmente (>2 vezes semana) 2. Presente permanentemente
Escore sensitivo: Dor de membros inferiores () 0. Ausente 1. Presente eventualmente (>2 vezes semana) 2. Presente permanentemente
Escore esfinteriano: Controle vesical () 0. Total 1. Urgência 2. Incontinência ou retenção eventuais 3. Uso permanente de cateter de demora ou uso regular de cateter de alívio
Escore esfinteriano: Continência fecal () 0. Normal 1. Constipação 2. Incontinência ou retenção total com necessidade de extração manual ou enemas
Escore total: ___/31

Estados clínicos:

0 = Normal ou Assintomático

1-10 = LEVE

11-21 = MODERADA

22-31 = GRAVE

Piora ou melhora = Diferença mínima clinicamente relevante de alteração: ± 5 pontos (ou cerca de 15%).

ANEXO B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

INSTITUIÇÃO: Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI)

Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) – RJ

TÍTULO DO PROJETO: Estudo de biomarcadores associados à lesão neuronal, inflamação, e migração celular no sistema nervoso central, e de exaustão da função de células T CD8+, na infecção por HTLV-1, e avaliação *in vitro* da ação de inibidores de histona deacetilases sobre a resposta citotóxica anti-HTLV-1.

COORDENADOR DO PROJETO: Otávio de Melo Espíndola, PhD.

Eu, _____, declaro que sou voluntário no Estudo de biomarcadores associados à lesão neuronal, inflamação, e migração celular no sistema nervoso central, e de exaustão da função de células T CD8+, na infecção por HTLV-1, e avaliação *in vitro* da ação de inibidores de histona deacetilases sobre a resposta citotóxica anti-HTLV-1. Fui informado que este estudo procura obter maiores informações sobre o desenvolvimento de doença afetando o sistema nervoso central na infecção por HTLV-1, e que serão testadas, em laboratório, novas drogas com possível ação contra esta infecção, e que estou participando deste estudo, pois apresento condição clínica decorrente da infecção por HTLV-1. Além disso, que o melhor conhecimento de fatores relacionados ao desenvolvimento e evolução de doença neurológica na infecção por HTLV-1 poderá, no futuro, auxiliar no acompanhamento clínico dos portadores desta infecção. Da mesma forma, o melhor conhecimento do modo de ação de drogas com possível atividade anti-HTLV-1, possibilitará a definição de futuros ensaios clínicos, com o objetivo de avaliar tratamentos para as doenças desenvolvidas durante a infecção por HTLV-1.

A minha participação é inteiramente voluntária e caso não queira participar, isto de forma alguma afetará meu atendimento no INI.

Os resultados dos exames laboratoriais são confidenciais e serão fornecidos somente ao interessado, sendo arquivados no Laboratório de Pesquisa em Patogenia Viral, sob responsabilidade do coordenador do estudo (Dr. Otávio de Melo Espíndola) e no prontuário médico. Os resultados deste estudo poderão não me beneficiar diretamente, mas poderão fornecer subsídios para um maior conhecimento sobre a infecção pelo HTLV-1, a evolução de suas manifestações clínicas, e do mecanismo de ação de drogas com potencial atividade anti-HTLV-1, e serão divulgados na forma de comunicação científica, não sendo permitido divulgar a minha identidade.

Declaro que fui informado de que:

Poderei recusar-me a participar da pesquisa, sem que este fato me venha a causar qualquer constrangimento, e que o meu atendimento clínico em nada será modificado pela minha recusa;

Os exames e o tratamento aplicados serão gratuitos;

Antes de assinar este Termo, devo ser informado plenamente sobre a pesquisa e sob minha participação nela, não hesitando em fazer perguntas de qualquer natureza que julgar conveniente esclarecer;

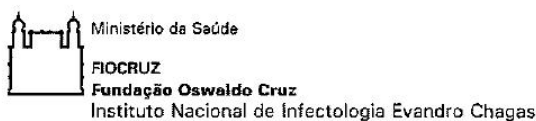
Este projeto procura descrever fatores que possam ser usados para medir a morte de células do sistema nervoso central (neurônios) durante a infecção por HTLV-1, e tentar entender como ocorre este processo, e como se comporta a resposta do sistema imune contra a infecção e a carga proviral no sangue, e que procura também entender, através de testes com as células separadas a partir da amostra de sangue doada, como atua um tipo de medicamento (os inibidores de histonas deacetilases) sobre as células infectadas;

Será obtida uma única amostra de 3 a 5 mililitros do líquido que banha o sistema nervoso central (líquido cefalorraquidiano - LCR), que é coletado através de punção da coluna vertebral, na região lombar. A coleta do LCR é realizada de forma asséptica, e pode gerar desconforto temporário no local da punção. Ocasionalmente, pode haver dor de cabeça após o procedimento, que geralmente dura entre dois e três dias, sendo comum a melhora com o repouso e uso de analgésicos. Raramente, pode haver hematoma ou infecção no local da punção;

No momento da coleta do LCR, também serão coletados 30 ml de sangue (quatro tubos de heparina e um tubo para coleta de soro) para a separação de soro e de células do sangue a serem usados nos testes de laboratório. O sangue será colhido assepticamente por punção de uma veia do braço. A coleta de sangue é um exame seguro, podendo causar pequeno desconforto, como um pequeno hematoma, ou seja, uma mancha arroxeadada devido à saída de sangue da veia para o tecido, no local da punção;

Esta pesquisa poderá não trazer benefícios imediatos para o meu acompanhamento clínico, mas trará um maior conhecimento a respeito da infecção por HTLV-1;

ANEXO C



**PEDIDO DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPENSA DE APLICAÇÃO DO
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

À

Dra. Léa Camillo-Coura

Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa do IPEC

Venho por meio deste, solicitar à V. Sa. a dispensa da aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) referente ao projeto de pesquisa intitulado “Estudo de biomarcadores associados à lesão neuronal, inflamação, e migração celular no sistema nervoso central de pacientes com mielopatia associada ao HTLV-1”, que constitui uma tese de doutorado vinculada ao programa de pós-graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do INI/Fiocruz. O presente estudo é subprojeto do estudo intitulado “Estudo de biomarcadores associados à lesão neuronal, inflamação, e migração celular no sistema nervoso central, e de exaustão da função de células T CD8+, na infecção por HTLV-1, e avaliação *in vitro* da ação de inibidores de histona deacetilases sobre a resposta citotóxica anti-HTLV-1” de responsabilidade do pesquisador Otávio de Melo Espíndola, do Laboratório de Pesquisa Clínica em Neuroinfecções do INI/Fiocruz, aprovado pelo CEP/INI em 21/03/2016 (CAAE: 53518416.9.0000.5262).

Uma vez que o presente estudo é um subprojeto, e não serão necessárias novas intervenções para coleta de amostras clínicas, pois serão utilizadas as amostras coletadas para o projeto principal no período de 01/02/2017 a 31/07/2018, e ambos os estudos buscam identificar biomarcadores associados ao desenvolvimento de doença do sistema nervoso central em indivíduos infectados pelo HTLV-1, solicitamos a dispensa de aplicação do TCLE.

Não obstante, anexo ao presente o **Termo de Compromisso e Responsabilidade** devidamente assinado, assumindo o compromisso com o sigilo das informações obtidas.

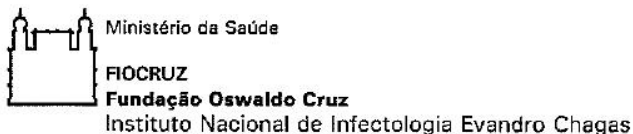
Atenciosamente,

Rio de Janeiro, 04 de abril de 2017.



Assinatura do Pesquisador responsável

ABELARDO DE MELO ESPÍNDOLA



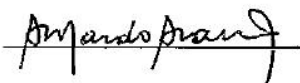
TERMO DE COMPROMISSO E RESPONSABILIDADE

Eu, Coordenador do projeto de pesquisa intitulado "Estudo de biomarcadores associados à lesão neuronal, inflamação, e migração celular no sistema nervoso central de pacientes com mielopatia associada ao HTLV-1", comprometo-me a manter a confidencialidade dos dados coletados, assim como a privacidade dos participantes do projeto.

A identidade dos participantes e os resultados obtidos com este projeto serão mantidos em um banco de dados sob a minha responsabilidade.

Os resultados obtidos com esta pesquisa serão divulgados em comunicações científicas mantendo o anonimato dos participantes, e o material utilizado não será empregado em outras pesquisas, a não ser quando abertos novos protocolos com a devida aprovação pela Coordenação do CEP/INI.

Rio de Janeiro, 04 de abril de 2017



ABELARDO AUGUSTO

ANEXO D

INSTITUTO NACIONAL DE
INFECTOLOGIA EVANDRO
CHAGAS - INI / FIOCRUZ



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo de biomarcadores associados à lesão neuronal, inflamação, e migração celular no sistema nervoso central de pacientes com mielopatia associada ao HTLV-1

Pesquisador: abelardo de queiroz campos araujo

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 64426517.8.0000.5262

Instituição Proponente: INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS - INI/FIOCRUZ

Patrocinador Principal: Fundação Oswaldo Cruz
MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.065.081

Apresentação do Projeto:

Trata-se de estudo de corte transversal aninhado a uma coorte de pacientes infectados por HTLV-1 que pretende determinar novos parâmetros na rotina de exames complementares para determinar o grau de lesão do sistema nervoso central (SNC) em indivíduos infectados pelo HTLV-1 com mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP), podendo auxiliar na identificação de indivíduos assintomáticos com maiores chances de desenvolvimento da HAM/TSP, ou de pacientes com HAM/TSP apresentando pior prognóstico de doença, possibilitando o uso de intervenções profiláticas, uma vez que a lesão neurológica é irreversível. Considerando-se dados de estudos de triagem sorológica em hemocentros, estima-se que cerca de um milhão de indivíduos estejam infectados pelo HTLV-1 no Brasil. Contudo, apenas 0,5–5% dos indivíduos infectados evoluem para a HAM/TSP após um prolongado período de infecção, que pode se estender até 40 anos. No entanto, cerca de 8% destes pacientes apresentam rápido declínio do quadro neurológico, com perda da capacidade motora e necessidade do uso de cadeiras de rodas em até dois anos do início dos sintomas. Contudo, a diferenciação destes dois grupos somente é possível pela observação da evolução clínica. Além disso, até o momento não há parâmetros definidos para a tomada de

Endereço: Avenida Brasil 4365

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3865-9585

E-mail: cep@ini.fiocruz.br

INSTITUTO NACIONAL DE
INFECTOLOGIA EVANDRO
CHAGAS - INI / FIOCRUZ



Continuação do Parecer: 2.065.081

decisão em intervenções terapêuticas, definição de prognóstico ou de frequência de acompanhamento dos pacientes. Dessa forma, futuros resultados deste projeto apresentam forte potencial de inovação no estabelecimento de novas diretrizes para o diagnóstico auxiliar e a condução clínico-laboratorial de pacientes com HAM/TSP. A patogênese da HAM/TSP ainda não é completamente compreendida, e marcadores de progressão ou prognóstico necessitam definição. Com isso, o estabelecimento de parâmetros para determinar o grau de lesão axonal associada à HAM/TSP pela quantificação de produtos deste processo, tais como proteínas Tau e do neurofilamento, assim como da PrPc, possibilitaria uma melhor determinação dos estágios de evolução clínica desta doença. Além disso, os eventos que levam à migração de células infectadas para o SNC ainda não estão esclarecidos. Tem sido descrito que indivíduos com HAM/TSP apresentam concentração aumentada de citocinas e quimiocinas envolvidas na inflamação do tipo Th1, tanto no sangue periférico quanto no SNC. Contudo, o perfil quimiotático presente no SNC de portadores assintomáticos da infecção por HTLV-1 ainda permanece desconhecido, assim como o fenótipo das populações linfoides que constituem o infiltrado mononuclear do SNC destes indivíduos. Dessa forma, a identificação do perfil de expressão de diferentes classes de quimiocinas e seus receptores em populações de células T do sangue periférico e do SNC, além da descrição de marcadores de inflamação, como a neopterina, possibilitaria uma melhor compreensão da patogênese da HAM/TSP. O tamanho amostral total é de 60 participantes, sendo 20 indivíduos infectados pelo HTLV-1 assintomáticos e 40 pacientes com HAM/TSPA, todos acompanhados no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI/FIOCRUZ). As amostras clínicas serão analisadas pelos Laboratórios de Pesquisa Clínica em Neuroinfecções e Imunodiagnóstico do INI/FIOCRUZ. A duração do estudo é de aproximadamente 4 anos conforme cronograma apresentado. O presente estudo é subprojeto o estudo intitulado “Estudo de biomarcadores associados à lesão neuronal, inflamação, e migração celular no sistema nervoso central, e de exaustão da função de células T CD8+, na infecção por HTLV-1, e avaliação in vitro da ação de inibidores de histona deacetilases sobre a resposta citotóxica anti-HTLV-1” de responsabilidade do pesquisador Otávio de Melo Espíndola, aprovado pelo CEP/INI em 21/03/2016 (CAAE: 53518416.9.0000.5262). Este subprojeto constitui uma tese de doutorado vinculada ao programa de pós-graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do INI/FIOCRUZ.

Endereço: Avenida Brasil 4365

Bairro: Manguinhos

UF: RJ

Telefone: (21)3865-9585

CEP: 21.040-360

Município: RIO DE JANEIRO

E-mail: cep@ini.fiocruz.br

**INSTITUTO NACIONAL DE
INFECTOLOGIA EVANDRO
CHAGAS - INI / FIOCRUZ**



Continuação do Parecer: 2.065.081

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Contribuir para uma melhor compreensão da patogênese da HAM/TSP através da avaliação de marcadores de lesão axonal, inflamação e de fatores de migração celular, e estabelecer uma nova rotina de exames de complementação diagnóstica para determinar o grau de lesão do SNC em indivíduos infectados pelo HTLV-1 com HAM/TSP.

Objetivo Secundário:

- 1) Determinar a carga proviral de HTLV-1 no LCR e em sangue periférico de ACs e pacientes com HAM/TSP;
- 2) Quantificar os níveis totais de proteína Tau, de pTau-Thr181, e das cadeias leve (NfL) e pesada (NfP) do neurofilamento, no LCR de ACs e de pacientes com HAM/TSP;
- 3) Quantificar os níveis de neopterin e de quimiocinas pró-inflamatórias no soro e no LCR de ACs e de pacientes com HAM/TSP;
- 4) Quantificar os níveis totais de proteína PrPc livre no LCR de ACs e de pacientes com HAM/TSP, e comparar com níveis expressos por células do sangue periférico;
- 5) Determinar a frequência de diferentes populações celulares em sangue periférico, e da expressão dos receptores de quimiocinas CCR4, CCR5, CXCR3 e CCR6 por células T CD4+ e T CD8+ em sangue periférico e no LCR de ACs e de pacientes com HAM/TSP.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos são associados à punção venosa periférica e a punção lombar. No caso da punção venosa periférica, pode haver pequeno desconforto durante o procedimento, ou a formação de eritema no local da punção, que regride naturalmente após uma semana. Com relação à punção lombar para retirada de LCR, há o risco de desconforto durante a coleta ou dor no local da punção, reação alérgica ao anestésico, cefaleia ortostática, parestesias transitórias, leve hemorragia no local da punção, herniação de amígdalas cerebelares, e/ou infecção. Contudo, a incidência destas complicações é muito pequena, e quando realizada corretamente, a punção lombar apresenta riscos mínimos. De modo a reduzir os riscos de herniação, será previamente realizado exame de fundo de olho, para evidência de papiledema, e indivíduos que apresentarem provável hipertensão líquórica terão a coleta de sangue, soro e LCR reagendada. A patogênese da HAM/TSP ainda não é completamente compreendida, e fatores relacionados ao seu desencadeamento, assim como marcadores de progressão ou prognóstico, necessitam serem definidos. Com isso, a degeneração axonal associada à HAM/TSP poderia ser

Endereço: Avenida Brasil 4365

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3865-9585

E-mail: cep@ini.fiocruz.br

**INSTITUTO NACIONAL DE
INFECTOLOGIA EVANDRO
CHAGAS - INI / FIOCRUZ**



Continuação do Parecer: 2.065.081

avaliada através da detecção de produtos deste processo, tais como isoformas de proteínas Tau e do neurofilamento, assim como da PrPc, possibilitando uma melhor determinação dos estágios de evolução clínica desta doença. Além disso, os eventos que levam à migração de células infectadas para o SNC ainda não estão esclarecidos. Tem sido descrito que indivíduos com HAM/TSP apresentam concentração aumentada de citocinas e quimiocinas envolvidas na inflamação do tipo Th1, tanto no sangue periférico quanto no SNC. Contudo, o perfil quimiotático presente no SNC de portadores assintomáticos da infecção por HTLV-1 ainda permanece desconhecido, assim como o fenótipo das populações linfoides que constituem o infiltrado mononuclear do SNC destes indivíduos. Por isso, o estudo do perfil de expressão de diferentes classes de quimiocinas e seus receptores em populações de células T do sangue periférico e do SNC, além da descrição de marcadores de inflamação, permitirá uma melhor compreensão da patogênese da HAM/TSP. Dessa forma, novos parâmetros que venham a ser identificados para uma melhor classificação dos indivíduos assintomáticos com maiores chances de desenvolvimento da HAM/TSP, ou de pacientes com HAM/TSP apresentando pior prognóstico de doença, possibilitará o uso prematuro de intervenções profiláticas, pois a lesão neurológica na HAM/TSP é irreversível e, atualmente, não há disponível tratamento específico eficaz.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo importante para compreensão da patogênese da HAM/TSP e determinação de parâmetros laboratoriais que possam auxiliar na identificação de indivíduos infectados pelo HTLV-1 com maiores chances de desenvolvimento da HAM/TSP. A descrição da metodologia está adequada aos objetivos determinados no estudo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não foram encontradas pendências e nem inadequações.

Considerações Finais a critério do CEP:

O parecer foi aprovado pelo colegiado.

Endereço: Avenida Brasil 4365

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3865-9585

E-mail: cep@ini.fiocruz.br

INSTITUTO NACIONAL DE
INFECTOLOGIA EVANDRO
CHAGAS - INI / FIOCRUZ



Continuação do Parecer: 2.065.081

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_854592.pdf	04/04/2017 15:27:52		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Dispensa_TCLE_e_termo_confidencialidade.pdf	04/04/2017 15:25:42	OTÁVIO DE MELO ESPÍNDOLA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Doutorado_Flavia_CEP.doc	03/02/2017 14:51:31	FLAVIA DOS SANTOS SOUZA	Aceito
Folha de Rosto	Folha_PB.pdf	03/02/2017 14:48:47	FLAVIA DOS SANTOS SOUZA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 17 de Maio de 2017

Assinado por:
Léa Ferreira Camillo Coura
(Coordenador)

Endereço: Avenida Brasil 4365

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3865-9585

E-mail: cep@ini.fiocruz.br

APÊNDICE A – Caracterização da população do estudo: portadores assintomáticos.

Amostra	Sexo	Idade (anos)	Tempo de infecção (anos)	Tempo de doença (anos)	EIPEC-2	Grau de Incapacidade	Alterações cutâneas	ITU repetição	Glicose LCR (mg/dl)	Protéina LCR (mg/dl)	Citologia LCR (mm3)	CPV PBMC (%)
1	F	39,08	6,38	-	-	Não	Não	Não	58	43,4	1	3.89
2	F	72,75	15,72	-	-	Não	Não	Não	86	44,1	1	0.37
3	F	60,32	16,47	-	-	Não	Não	Não	62	23,9	1	4.45
4	F	64,71	21,17	-	-	Não	Não	Não	78	42,8	2	9.12
5	F	67,99	21,49	-	-	Não	Não	Não	56	77,9	1	6.46
6	F	50,70	21,83	-	-	Não	Não	Não	51	46,3	5	10.05
7	F	72,89	23,88	-	-	Não	Não	Não	66	48,8	1	4.58
8	M	75,55	16,18	-	-	Não	Não	Não	61	54,0	1	2.83
9	M	59,50	16,58	-	-	Não	Não	Não	49	45,5	2	0.51
10	M	57,33	16,92	-	-	Não	Não	Não	51	39,1	1	1.55
11	M	68,03	16,98	-	-	Não	Não	Não	60	49,7	1	10.91
12	M	54,17	21,71	-	-	Não	Não	Não	62	67,2	1	3.15
13	M	64,94	22,31	-	-	Não	Não	Não	79	44,6	4	0.56
Mín	-	39,08	6,38	-	-	-	-	-	49	23,9	1	0,37
Md	-	64,71	16,98	-	-	-	-	-	61	45,5	1	3,89
IQ₂₅₋₇₅	-	57,33-68,03	16,47-21,71	-	-	-	-	-	56-66	43,4-49,7	1-2	1,55-6,46
Máx	-	75,55	23,88	-	-	-	-	-	86	77,9	5	10,91
X ± DP	-	62,15 ± 10,21	18,28 ± 4,59	-	-	-	-	-	63 ± 11,52	48,25 ± 13,06	1,69 ± 1,32	4,49 ± 3,64

APÊNDICE B – Caracterização da população do estudo: pacientes com HAM/TSP.

Amostra	Sexo	Idade (anos)	Tempo de infecção (anos)	Tempo de doença (anos)	EIPEC-2	Grau de Incapacidade	Alterações cutâneas	ITU repetição	Glicose LCR (mg/dl)	Protéina LCR (mg/dl)	Citologia LCR (mm3)	CPV PBMC (%)
14	F	61,31	-	1,20	3	Leve	Não	Não	55	60,5	1	0,60
15	F	59,54	-	6,12	2	Leve	Não	Não	73	59,7	1	9,38
16	F	54,39	-	7,13	8	Leve	xerodermia	Não	62	41,9	10	13,96
17	F	28,00	-	8,06	16	Moderada	Não	Não	52	30,6	9	8,79
18	F	54,18	-	11,43	4	Leve	Não	Não	57	50,6	1	4,82
19	F	50,11	-	12,53	9	Leve	Não	Não	53	36,5	3	2,68
20	F	82,43	-	13,62	9	Leve	xerodermia, dermatite seborreica	Sim	57	38,0	7	3,00
21	F	34,42	-	13,96	5	Leve	Não	Não	53	32,9	1	5,96
22	F	69,28	-	14,50	22	Grave	Não	Não	75	36,5	4	13,60
23	F	43,46	-	15,75	9	Leve	Não	Não	61	45,4	2	3,34
24	F	67,81	-	18,03	22	Grave	xerodermia	Não	64	42,7	1	5,40
25	F	48,35	-	18,51	22	Grave	xerodermia	Sim	71	23,7	4	16,01
26	F	68,11	-	29,04	18	Moderada	Não	Não	48	43,1	3	2,72
27	M	58,18	-	0,44	8	Leve	Não	Não	61	67,7	8	1,25
28	M	55,38	-	0,55	3	Leve	xerodermia	Não	64	-	4	10,30
29	M	60,39	-	3,13	14	Moderada	Não	Não	85	63,8	8	4,45
30	M	59,53	-	14,34	5	Leve	Não	Não	67	36,7	4	16,93
31	M	61,13	-	16,41	20	Moderada	dermatite seborreica	Não	58	-	5	11,09
32	M	28,81	-	16,87	13	Moderada	xerodermia	Não	58	-	5	10,73
33	M	52,49	-	24,31	9	Leve	dermatite seborreica	Não	54	37,6	2	26,42
34	M	65,47	-	25,82	9	Leve	Não	Não	67	-	9	6,21
<i>Mín</i>	-	28	-	0,44	2	-	-	-	48	23,7	1	0,6
<i>Md</i>	-	58,18	-	13,96	9	-	-	-	61	41,9	4	6,21
<i>IQ₂₅₋₇₅</i>	-	50,11-61,31	-	7,13-16,87	5-16	-	-	-	55-67	36,5-50,6	2-7	3,34-11,09
<i>Máx</i>	-	82,43	-	29,04	22	-	-	-	85	67,7	10	26,42
<i>X ± DP</i>	-	55,37 ± 13,42	-	12,94 ± 8,07	10,95 ± 6,70	-	-	-	61,7 ± 9,0	44,0 ± 12,5	4,4 ± 3,0	8,46 ± 6,37