



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA
TROPICAL

CONCENTRAÇÕES DE NEOPTERINA NO SORO E LÍQUIDO
CEFALORRAQUIDIANO EM PACIENTES COM
PARAPARESIA ESPÁSTICA TROPICAL/MIELOPATIA
ASSOCIADA AO HTLV-I (TSP/HAM) E INDIVÍDUOS HTLV-I
ASSINTOMÁTICOS EM MANAUS, AM - BRASIL

MASSANOBU TAKATANI

MANAUS
2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA
TROPICAL

MASSANOBU TAKATANI

CONCENTRAÇÕES DE NEOPTERINA NO SORO E LÍQUIDO
CEFALORRAQUIDIANO EM PACIENTES COM
PARAPRESIA ESPÁSTICA TROPICAL/MIELOPATIA
ASSOCIADA AO HTLV-I (TSP/HAM) E INDIVÍDUOS HTLV-I
ASSINTOMÁTICOS EM MANAUS, AM – BRASIL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Tropical da Universidade Federal do Amazonas como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Patologia Tropical na área de concentração “diagnóstico e Controle”.

Orientadora: Prof^a. Dra Dagmar Kiesslich

Co-orientadora: Prof^a. Dra Maria Cristina dos Santos

MANAUS
2004

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

T136c Takatani, Massanobu
Concentrações de neopterina no soro e líquido cefalorraquidiano em pacientes com paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-I (TSP/HAM) e indivíduos HTLV-I assintomáticos em Manaus, AM-Brasil / Massanobu Takatani. 2004
108 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Dagmar Kiesslich
Coorientadora: Maria Cristina dos Santos
Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical) - Universidade Federal do Amazonas.

1. htlv-1. 2. tsp/ham. 3. neopterina. 4. soro. 5. liquido cefalorraquidiano. I. Kiesslich, Dagmar II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CONCENTRAÇÕES DE NEOPTERINA NO SORO E LÍQUIDO
CEFALORRAQUIDIANO EM PACIENTES COM
PARAPARESIA ESPÁSTICA TROPICAL/MIELOPATIA
ASSOCIADA AO HTLV-I (TSP/HAM) E INDIVÍDUOS HTLV-I
ASSINTOMÁTICOS EM MANAUS, AM - BRASIL

Dissertação apresentada ao Programa
de Mestrado em Patologia Tropical da
Faculdade de Ciências da Saúde da
Universidade Federal do Amazonas,
como requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Patologia Tropical.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr^a Dagmar Kiesslich, Presidente
Universidade federal do Amazonas, Manaus - AM

Prof. Dr Eurico Manoel de Franco Azevedo
Universidade Federal do Amazonas, Manaus - AM

Prof. Dr^a Ana Carolina Paulo Vicente
Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro - RJ

DEDICATÓRIA

A meus pais, Nobuo e Toshimi, o meu eterno agradecimento.

A minha esposa Yee, e a minha filha Vitória, por fazerem tudo valer a pena.

AGRADECIMENTOS

Ao plano superior pela força invisível;

Aos pacientes que participaram deste trabalho, pois sem eles seria impossível a conclusão;

À minha orientadora, Prof^a.Dr^a Dagamar Kiesslich, pela sua orientação segura e competente em todas as etapas desta pesquisa, pelo privilégio de tê-la como orientadora e desfrutado da sua agilidade intelectual, e ter despertado em mim o interesse pela biologia molecular.

Ao Prof. Dr. Eurico Manoel de Franco Azevedo, coordenador da disciplina de Neurologia/Neurocirurgia da Faculdade de Medicina da UFAM, pela amizade e por ter despertado em mim o interesse pelas atividades de docente, e por ter incentivado a uma maior qualificação profissional;

À Universidade Federal do Amazonas – UFAM, com o respectivo coordenador do Mestrado em Patologia Tropical, Prof. Dr. Nelson Abrahim Fraiji, o qual tenho estima e admiração.

À minha colega Myuki Alfaia Esashika Crispim, farmacêutica-bioquímica, que alia à sua capacidade técnica no Laboratório de Pesquisa da FHEMOAM, a amizade e a dedicação no exercício de suas funções, sem a qual este trabalho seria quase impossível.

Destaco ainda a colaboração das colegas farmacêuticas Márcia Poinho e Christiane Melo, do Laboratório de Sorologia da FHEMOAM pelos testes sorológicos e ajuda na seleção e convocação dos indivíduos que participaram da pesquisa.

Marines, Sonia, Cristina e Bruno, sempre disponíveis para apoiar e participar ativamente dos projetos.

À Dr^a Rossicleia Lins Monte do Laboratório de Bacteriologia da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, pela análise das amostras do líquido cefalorraquidiano.

Ao Prof. Dr. Jorge Simão do Rosário Casseb, pelo apoio nas dificuldades técnicas laboratoriais em biologia molecular.

À Dr^a Beatriz Vaz da Fundação Osvaldo Cruz - RJ, cujo conhecimento e sabedoria contribuíram para realização deste trabalho;

Aos Diretores e às equipes responsáveis pelo atendimento aos pacientes: Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, Ambulatório Araújo Lima da Universidade Federal do Amazonas, Hospital Universitário Getúlio Vargas, por franquear o acesso e facilitar o contato com os pacientes;

Agradeço a todos que de alguma forma, presentes ou à distância, me acompanharam neste caminho.

RESUMO

Introdução: A infecção pelo vírus HTLV-I pode levar a Paraparesia Espástica Tropical/Mielopatia Associada ao HTLV-I (TSP/HAM), a qual é uma doença desmielinizante crônica progressiva que afeta a medula espinhal e a substância branca do cérebro. Menos de 5% dos portadores crônicos do HTLV-I desenvolverão essa complicação. As primeiras manifestações da doença ocorrem na quarta década de vida sendo que os distúrbios da marcha, a fraqueza e o enrijecimento dos membros inferiores constituem os principais sinais e sintomas de sua apresentação. Não há tratamento eficaz para essa mielopatia. Numerosos estudos sustentam a idéia de que processos inflamatórios e imunológicos contribuem para a etiopatogênese da TSP/HAM. Nesse estudo avaliaram-se as concentrações de neopterinina no soro e líquido cefalorraquidiano (LCR), em pacientes com TSP/HAM e indivíduos HTLV-I assintomáticos. Neopterinina é uma substância liberada pelos macrófagos após estimulação pelo interferon gama durante o processo de ativação do sistema imune.

Metodologia: Concentrações de neopterinina foram avaliadas em 11 pacientes com TSP/HAM e 21 indivíduos HTLV-I assintomáticos. Sendo 11 (34,4%) amostras de soro e 10 (62,5%) amostras de LCR de pacientes com TSP/HAM, e 21 (65,6%) amostras de soro e 06 (37,5%) amostras de LCR de indivíduos HTLV-I assintomáticos. A determinação quantitativa das concentrações de neopterinina no soro e LCR foram realizadas empregando-se um conjunto diagnóstico comercial, baseado no princípio dos ensaios imunoenzimático (ELISA), do tipo competitivo.

Resultados: A média de idade para os pacientes com TSP/HAM foi de $48,5 \pm 11,1$ anos e para os indivíduos HTLV-I assintomáticos de $41,5 \pm 7,7$ anos ($p=0,0440$). A concentração média (DP) de neopterinina no soro de pacientes com TSP/HAM foi $10,3 \pm 8,9$ nmol/l e $4,6 \pm 1,2$ nmol/l em indivíduos HTLV-I assintomáticos (*Mann-Whitney*, $p=0,0069$). A concentração média (DP) de neopterinina no LCR em pacientes com TSP/HAM foi $30,8 \pm 47,8$ nmol/l, e $3,4 \pm 1,1$ nmol/l em indivíduos HTLV-I assintomáticos (*Mann-Whitney*, $p=0,0011$). A média (DP) para o tempo de doença na TSP/HAM foi de $8,0 \pm 5,0$ anos e a média (DP) para o grau de incapacidade motora foi de $4,6 \pm 1,8$ (variação de 0 a 10).

Conclusão: Encontramos diferenças nas médias das concentrações de neopterinina no soro e LCR entre pacientes com TSP/HAM e indivíduos HTLV-I assintomáticos. Em pacientes com TSP/HAM, concentrações de neopterinina no soro e LCR não apresentaram correlação com o tempo de doença. As concentrações de neopterinina no LCR apresentaram correlação com o grau de incapacidade motora, porém, o mesmo não foi observado no soro.

Palavras chave: HTLV-I, TSP/HAM, neopterinina, soro, líquido cefalorraquidiano.

ABSTRACT

Introduction: The HTLV-I infection may lead to the HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP), which is a chronic demyelinating neurological disease that affects the spinal cord and the white brain substance. Less than 5% of HTLV-I asymptomatic individuals will develop this disease. The first appearances of the disease occur in the fourth life decade and the march disorders, the muscle weakness and the hardness of the inferior members constitute the most important signs and symptoms. There is no effective treatment for this myelopathy. Numerous researches sustain the idea that the inflammation and immunological process contribute for HAM/TSP pathophysiology. In this research, the neopterin concentrations in cerebrospinal fluid (CSF) serum were evaluated in patients with HAM/TSP and individuals with HTLV-I asymptomatic. Neopterin is a substance released by macrophage after stimulation by interferon- during the immune system activation process.

Methodology: A neopterin concentrations were being in eleven HAM/TSP patients and twenty-one HTLV-I asymptomatic individuals. From this, eleven (34, 4%) of serum samples and ten (62, 5%) CSF samples from HAM/TSP patients, and twenty-one (65, 6%) serum samples and six (37, 5%) CSF samples from HTLV-I asymptomatic individuals. The quantitative determination of neopterin concentration in serum and CSF was carried out by using a commercial diagnosis set, based on the principle of Enzyme immunoassay (ELISA), competitive type.

Results: The average age for HAM/TSP patients was $48, 5 \pm 11, 1$ years-old and for HTLV-I asymptomatic individuals was $41, 5 \pm 7, 7$ years-old ($p=0, 0440$). The neopterin concentration average (DP) in serum of HAM/TSP patients was $10, 3 \pm 8, 9$ nmol/l and for HTLV-I asymptomatic individuals was $4, 6 \pm 1, 2$ nmol/l (*Mann-Whitney*, $p=0, 0069$). The average neopterin concentration (DP) in CSF of HAM/TSP patients was $30, 8 \pm 47, 8$ nmol/l and for HTLV-I asymptomatic individuals was $3, 4 \pm 1, 1$ nmol/l (*Mann-Whitney*, $p=0, 0011$). The average duration of the disease of HAM/TSP patients was $8, 0 \pm 5$ years and the average (DP) for motor disability was $4, 6 \pm 1, 8$ (variation from 0 to 10).

Conclusion: Differences in the average of neopterin concentration in serum and CSF were found between HAM/TSP patients and HTLV-I asymptomatic individuals. In HAM/TSP patients, neopterin concentration in serum and CSF haven't shown any correlation with the disease period. The neopterin concentrations in CSF have shown correlation with the grade of motor disability, however, the same result was not observed in the serum.

Key words: HTLV-I, HAM/TSP, neopterin, soro, cerebrospinal fluid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação Esquemática da Estrutura e Composição da Partícula Viral do HTLV-I	18
Figura 2	Representação esquemática do ciclo replicativo de um retrovírus humano	20
Figura 3	Origem (África e Melanésia) e distribuição do HTLV nos cinco continentes	21
Figura 4	Biosíntese dos derivados neopterin em monócitos/macrófagos humanos	36
Figura 5	Distribuição das médias das concentrações de neopterin no soro e no LCR em relação aos grupos HTLV-I assintomáticos e pacientes com TSP/HAM	58
Figura 6	Figura 6 – Correlação entre as concentrações de neopterin no soro em relação ao tempo de doença nos pacientes com TSP/HAM	64
Figura 7	Correlação entre as concentrações de neopterin no LCR em relação ao tempo de doença nos pacientes com TSP/HAM	64
Figura 8	Correlação entre as concentrações de neopterin no soro em relação ao grau de incapacidade motora nos pacientes com TSP/HAM	65
Figura 9	Correlação entre as concentrações de neopterin no LCR em relação ao tempo de doença nos pacientes com TSP/HAM	66
Figura 10	Correlação das concentrações de neopterin em relação número de células no LCR em pacientes com TSP/HAM	67
Figura 11	Correlação entre as concentrações de neopterin e quantidade de proteínas no LCR em 10 pacientes com TSP/HAM	67
Figura 12	Correlação entre as concentrações de neopterin e quantidade de glicose no LCR em 10 pacientes com TSP/HAM	68
Figura 13	Ressonância nuclear magnética da coluna vertebral	77
Figura 14	RNM cerebral com áreas de alteração do sinal T2	78

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1	Distribuição da população de estudo de acordo com o sexo e idade	54
Tabela 2	Comparação da média de idade em relação aos grupos TSP/HAM e HTLV-I assintomático	55
Tabela 3	Distribuição das médias das concentrações de neopterina no soro e LCR entre indivíduos HTLV-I assintomáticos e pacientes com TSP/HAM	57
Tabela 4	Distribuição do sexo, idade e valores das concentrações de neopterina no soro e LCR em pacientes com TSP/HAM (grupo I)	59
Tabela 5	Distribuição da idade, sexo e concentração de neopterina no soro e LCR em indivíduos HTLV-I assintomático (grupo II)	60
Tabela 6	Distribuição da comparação das médias das concentrações de neopterina no soro em relação ao sexo, entre os indivíduos HTLV-I assintomáticos e pacientes com TSP/HAM	61
Tabela 7	Distribuição da comparação das médias das concentrações de neopterina no LCR em relação ao sexo, entre os indivíduos HTLV-I assintomáticos e pacientes com TSP/HAM	62
Tabela 8	Distribuição do tempo de doença, grau de incapacidade motora e as concentrações de neopterina no soro e LCR nos pacientes com TSP/HAM	62
Quadro I	Critérios de Interpretação dos Resultados do <i>HTLV blot 2.4</i> da GLD	49

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ATLL	<i>Adult T-cell leukemia</i>
ATLV	<i>Adult T-cell leukemia virus</i>
CA	Capsídeo
CN	Controle negativo
Da	Dalton
DNA	Ácido desoxirribonucléico
GIM	Grau de incapacidade motora
EDTA	Ácido etilenodiamino-tetra acético
et al	E colaboradores
ELISA	Ensaio imunoenzimático
ENV	Gene do envelope viral
FHEOMAM	Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas
GAG	Gene do core viral
GP	Glicoproteína
GTP	Guanosina trifosfato
TSP/HAM	Paraparesia Espástica Tropical/Mielopatia Associada ao HTLV-I
HLA	Antígeno de Histocompatibilidade
HUGV	Hospital Universitário Getúlio Vargas
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HTLV-I	Vírus Linfotrópico de células T humana tipo I
HTLV-II	Vírus Linfotrópico de células T humana tipo II
IL	Interleucinas
IFN	Interferon
LCR	Líquido cefalorraquidiano
NC	Núcleocapsídeo
P24	Proteína de 24 kilodaltons
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PM	Peso molecular
°C	Grau Celsius
rgp	Recombinante glicoproteína

RNA	Ácido ribonucléico
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
T CD4+	Linfócitos TCD4+
T CD8+	Linfócitos TCD8+
Th1	T helper 1
TR	Transcriptase reversa
ul	Microlítros
WB	Western-blot
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 O vírus HTLV-I	15
1.2 Morfologia do HTLV	16
1.3 Ciclo replicativo do HTLV-I	18
1.4 Epidemiologia do HTLV-I	20
1.4.1 Distribuição geográfica do HTLV-I	21
1.4.1 Epidemiologia do HTLV no Brasil	22
1.5 Modos de transmissão do HTLV-I	23
1.5.1 Transmissão materno infantil	23
1.5.2 Transmissão sexual	23
1.5.3 Transmissão Parenteral	24
1.6 Paraparesia Espástica Tropical/Mielopatia Associada ao HTLV I(TSP/HAM)	25
1.6.1 Patologia da TSP/HAM	27
1.6.2 Resposta imunológica ao HTLV-I	28
1.6.3 Diagnóstico laboratorial da TSP/HAM	31
1.6.4 Tratamento da TSP/HAM	32
1.7 Manifestações sistêmicas	34
1.8 Neopterinina	34
2 OBJETIVOS	40
3 METODOLOGIA	41
3.1 Modelo de estudo	41
3.2 População de estudo	41
3.2.1 Grupo I	41
3.2.1.1 Critérios de inclusão para o grupo I	42
3.2.1.2 Critérios de exclusão para o grupo I	42
3.2.2 Grupo II	43
3.2.2.1 Critérios de inclusão para o grupo II	43
3.2.2.2 Critérios de exclusão para o grupo II	43
3.3 Avaliação clínica	44
3.4 Avaliações laboratoriais	45

3.4.1 Amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR)	45
3.4.2 Amostras de sangue venoso	45
3.4.3 Determinação de anticorpos anti-HTLV-I/II	46
3.4.4 Diagnóstico confirmatório pelo teste <i>Western blot</i>	48
3.4.5 Reação em cadeia de polimerase (PCR)	49
3.4.6 Determinação da concentração de neopterina	51
3.5 Metodologia estatística	53
4 RESULTADOS	54
4.1 Características da população amostral	54
4.2 Concentrações de neopterina no soro e LCR nos pacientes com TSP/HAM e indivíduos HTLV-I assintomáticos.	56
4.3 Concentrações de neopterina no soro e LCR em relação ao sexo.	60
4.4 Tempo de evolução e grau de incapacidade motora da TSP/HAM	62
4.4.1 Tempo de evolução da TSP/HAM	63
4.4.2 Grau de incapacidade motora da TSP/HAM	64
4.5 Concentrações de neopterina e características do LCR	66
5 DISCUSSÃO	69
6 CONCLUSÕES	82
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
8 ANEXOS	97

1. INTRODUÇÃO

1.1 – O VÍRUS HTLV-I

Os retrovírus foram descobertos há mais de 80 anos e ganharam novo alento com a pandemia da AIDS, na década de 80. São assim chamados porque convertem os seus genomas RNA em DNA, através de enzima viral transcriptase reversa (TR), uma DNA polimerase dependente de RNA. A família Retroviridae é composta por três subfamílias: o Oncoviridae, com o vírus linfotrópico de células T humanas tipo I e II (HTLV-I e HTLV-II); o Lentivirinae, com os vírus da imunodeficiência humana tipo I e II (HIV-I e II); e o Spumavirinae, de patogenia ainda desconhecida para o homem (VERONESI, 2000).

O HTLV-I foi descrito em 1980 como o primeiro retrovírus humano, o qual foi isolado a partir de linhagem celular de linfócitos periféricos e de linfonodo de uma paciente com linfoma cutâneo de célula T (POEIZ *et al*, 1980).

Posteriormente, pesquisadores japoneses conseguiram isolar um retrovírus a partir de paciente com leucemia de célula T do adulto (ATL), neoplasia hematológica prevalente nas ilhas situadas na região sudoeste do Japão, denominando-o, então, ATLV, vírus associado à leucemia de células T do adulto (YOSHIDA *et al*, 1982). Concluiu-se, a seguir, no entanto, que ambos os vírus tratavam-se de um único agente etiológico e, a partir de então, foi adotada a nomenclatura internacional de HTLV-I para o mesmo (POPOVIC *et al*, 1982).

A infecção pelo HTLV-I foi associada a distúrbio neurológico degenerativo denominado Paraparesia Espástica Tropical (PET ou, em inglês, *TSP* de *Tropical Spastic Paraparesis*) no Caribe e na América Central (UCHIYAMA *et al*, 1977) ou mielopatia associada ao HTLV-I (MAH ou, em inglês, *HAM* de *HTLV-Associated Mielopathy*) no Japão (OSAME *et al*, 1986). As duas síndromes foram descritas

como sendo a mesma doença e foram chamadas de TSP/HAM (GESSAIN & GOUT, 1992).

O HTLV-I é classificado em 4 subtipos principais: cosmopolita (ou subtipo II), africano (ou subtipo I), japonês (ou subtipo III) e melanesiano (SEGURADO, 2000).

Um segundo membro da subfamília Oncoviridae, descoberto em 1982, numa linhagem de células T estabelecida de um paciente com leucemia de células T cabeluda, mostrando ser relacionado, mas distinto do HTLV tipo I, foi denominado HTLV-II (KALYANARAMAN *et al*, 1982).

Devido ao alto grau de homologia na seqüência de RNA do genoma viral e reação cruzada de testes sorológicos entre HTLV-I e HTLV-II, esses vírus têm sido referidos em conjunto HTLV-I/II. No que diz respeito ao HTLV-II apesar de sua relação inicialmente descrita com a leucemia de célula cabeluda, não se tem ainda uma conexão definitiva com patologias, exceto alguns casos semelhantes a TSP/HAM com sintomatologia atáxica (HJELLE *et al*, 1992; MURPHY *et al*, 1993; SILVA, *et al*, 2002). Outros estudos sugerem que o HTLV-II parece predispor os portadores à infecções bacterianas (MURPHY *et al*, 1997).

Ao contrário do que se observa na infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), na infecção pelos vírus HTLV-I e II não se detectam partículas virais livres no sangue ou em fluidos biológicos de indivíduos infectados, acreditando-se, assim, que as partículas virais sejam exclusivamente associadas aos linfócitos infectados (KALYANARAMAN *et al*, 1982).

1.2- MORFOLOGIA DO HTLV

Em relação à morfologia do HTLV, o HTLV-I e HTLV-II são típicos retrovírus exógenos humanos. A estrutura morfológica do HTLV é similar a de outros retrovírus, o vírion é uma partícula envelopada, com 110-140 nm de diâmetro. Um complexo protéico está presente na superfície do vírion, consistindo de duas subunidades glicoprotéicas: a proteína transmembrana, ou gp21, que atravessa o envelope, e a proteína de superfície, ou gp46, que se projeta da superfície viral sob a forma de 72 espículas, às quais se ancoram as demais estruturas da partícula viral através da glicoproteína transmembrana (gp21) (DELAMARRE *et al.*, 1996).

Três proteínas formam o núcleo central da partícula viral: a proteína da matriz (MA), que possui um ácido graxo no seu terminal amino, cuja presença determina uma modificação característica de muitas proteínas presentes na face interna da membrana celular; o capsídeo (CA), cujas proteínas constituem o núcleo viral; e por último, o nucleocapsídeo (NC), formado por pequenas proteínas básicas. Todas essas proteínas são codificadas pelo gene gag, e denominadas p19, p24 e p15, respectivamente, de acordo com o seu peso molecular (COFFIN, 1996; TANGY, 1996; SEGURADO, 2000) (Figura 1).

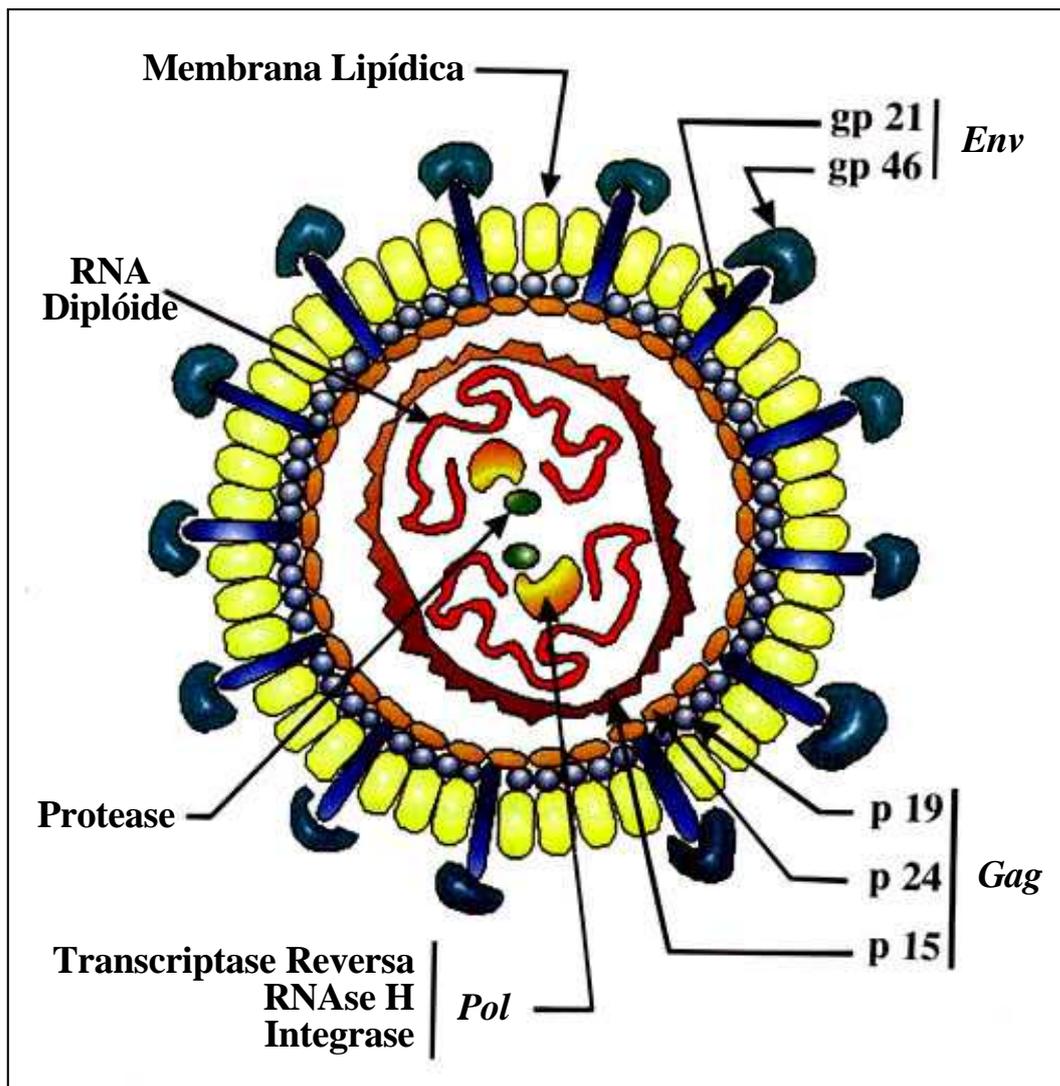


Figura 1 – Representação Esquemática da Estrutura e Composição da Partícula Viral do HTLV-I
FONTE: Modificado de TANGY (1996)

1.3 - CICLO REPLICATIVO DO HTLV-I

A infecção por HTLV-I inicia-se quando partículas virais invadem novas células-alvo, os linfócitos CD4+. Geralmente isto se dá por transmissão viral célula a célula, a partir de outras células já infectadas. Após a interiorização da partícula viral, verifica-se a liberação de seu material genético no citoplasma do linfócito infectado. O genoma viral de RNA sofre, então, ação da enzima transcriptase reversa viral, codificando-se uma molécula de DNA a ele complementar. Esta, por sua vez, após

migrar até o núcleo, incorpora-se ao genoma da célula hospedeira, integrando-se por ação da enzima integrase. O genoma viral agora integrado passa a ser denominado DNA proviral e será passível de replicação, quando da divisão celular e de transcrição sob ação de estímulos endógenos ou exógenos. A transcrição viral produz inicialmente moléculas de RNA mensageiro, capazes de codificar a síntese de proteínas reguladoras da replicação viral, p40tax e p23rex. Essa proteína exerce atividade reguladora pós-transcricional, provocando a formação de RNA mensageiro genômico, capaz de codificar as proteínas estruturais da matriz, do *core* e do envelope, e, conseqüentemente, propiciar a formação de novas partículas virais. Estas emergem da superfície celular por brotamento, carregando consigo parte da membrana celular bilipídica como constituinte de seu envelope (COFFIN, 1996; SEGURADO, 2000) (Figura 2).

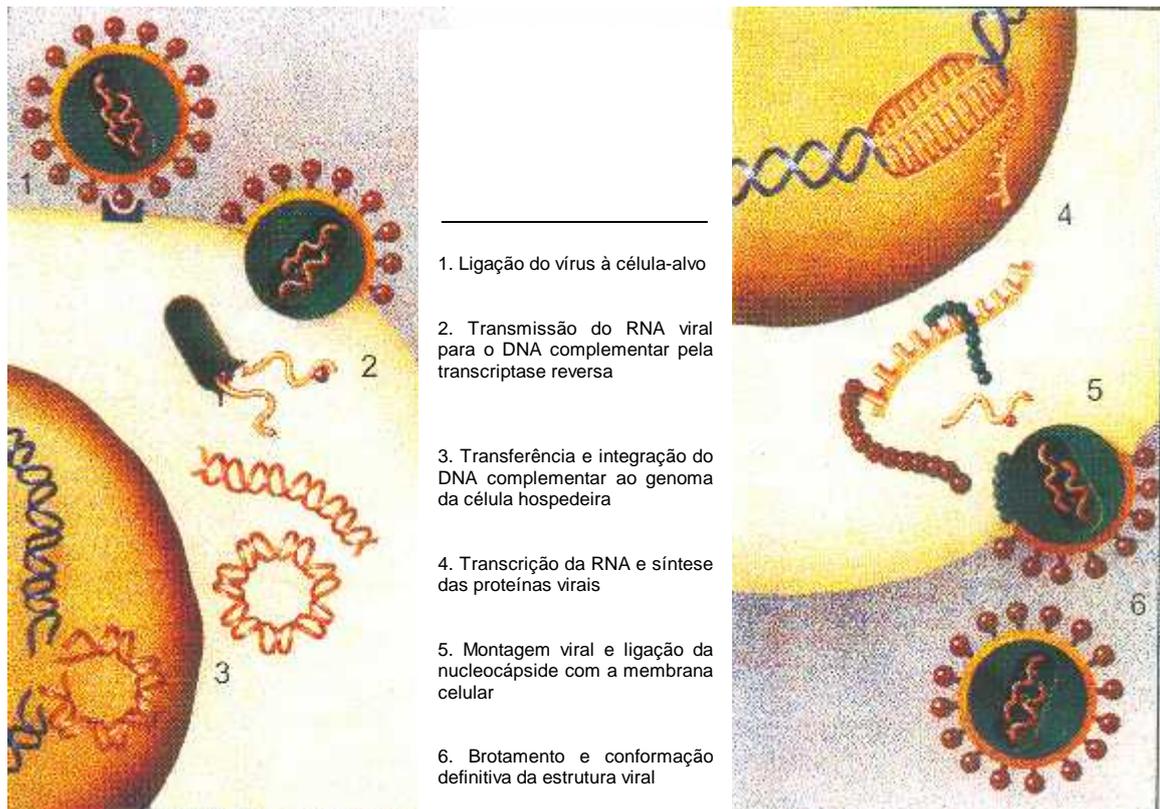


Figura 2 – Representação esquemática do ciclo replicativo de um retrovírus humano.
 FONTE: Adaptado de Gallo RC, (1986) *apud* Segurado (2000, p 4)

1.4 - EPIDEMIOLOGIA DO HTLV-I

A infecção pelo HTLV-I apresenta um padrão epidemiológico que assim se caracteriza: por agrupamento da infecção, em áreas geográficas definidas no mundo; aumento da soroprevalência com a idade; soroprevalência mais elevada em mulheres, notadamente após os 40 anos (KAJIYAMA *et al*, 1986; SARIM *et al*, 1990).

A capacidade do vírus de produzir endemias em grupos raciais diferentes parece refletir a tendência de agrupamento da infecção e não uma predisposição genética para adquirir o vírus (MALONEY *et al*, 1989). Contudo, o fator genético

parece ter importância no desenvolvimento de patologias nos infectados (JEFFERY *et al*, 1999).

1.4.1 - DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA INFECÇÃO PELO HTLV-I

Estima-se que de 15 a 20 milhões de pessoas estão infectadas pelo HTLV-I no mundo (EDLICH *et al*, 2000; CARNEIRO-PROIETTI, 2002).

O HTLV-I, do ponto de vista epidemiológico, é endêmico na África Central e Ocidental, no Caribe, em algumas partes da América do Sul, no Japão e na Melanésia/Austrália (SOARES *et al*, 2000) (Figura 3).

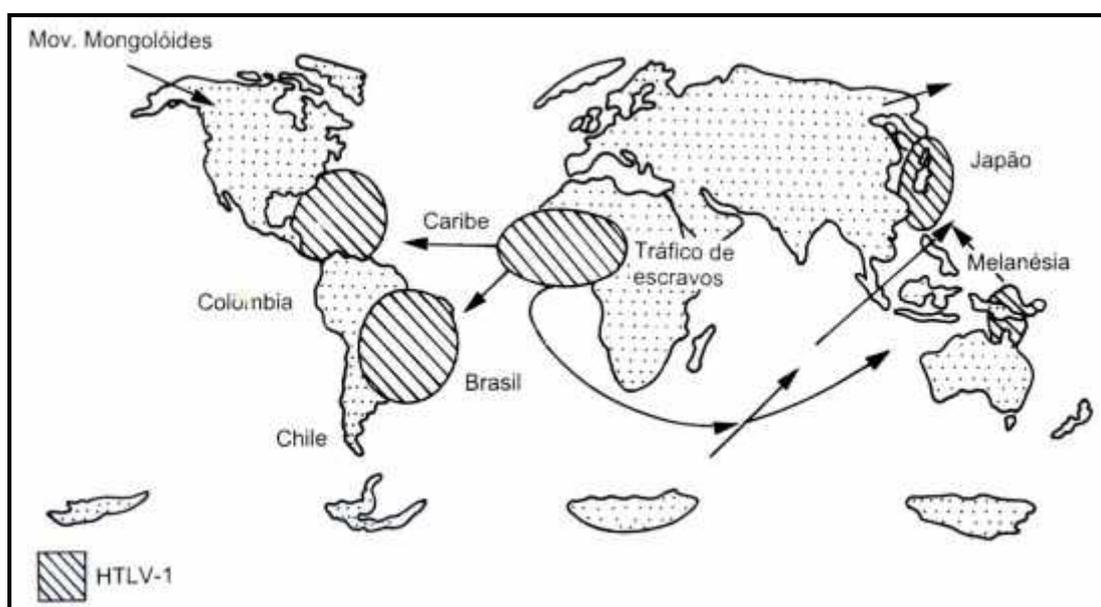


Figura 3 – Origem (África e Melanésia) e distribuição do HTLV nos cinco continentes, No mapa estão representados as cinco maiores aglomerações de indivíduos infectados pelos HTLV na Terra.
FONTE: *apud* Langhorn, 2000

O Japão foi o primeiro foco endêmico de infecção pelo HTLV-I a ser descrito no mundo, apresentando taxas de prevalência para a população geral que variam

desde a ausência completa do vírus, ou taxas baixas (menos de 1%), a taxas que vão de 37-45% no Sudeste (Ilhas de Shikoku, Kyushu e Okinawa) e Nordeste do País (Ilha de Hokkaido) (HINUMA *et al*, 1982; ISHIDA *et al*, 1985).

Na Melanésia, a infecção foi encontrada em Papua, Nova Guiné e nas Ilhas Salomão. A soroprevalência elevada na primeira área (cerca de 14% para HTLV-I/II) foi observada entre os Hagahai (YANAGIHARA *et al*, 1990).

1.4.2 - EPIDEMIOLOGIA DO HTLV NO BRASIL

O HTLV provavelmente veio para o Brasil por uma das seguintes vias: nativos que vieram da América do Norte, cujos ancestrais eram asiáticos; negros africanos, provenientes do tráfico de escravos; migração japonesa no início do século XX; e associação das vias anteriores (POMBO DE OLIVEIRA *et al*, 1996).

No Brasil o HTLV-I/II está presente em praticamente todas as regiões, sendo encontrado na população em geral, em grupos específicos de doadores de sangue e em pacientes com doenças hematológicas ou neurológicas. A soroprevalência do HTLV-I/II em doadores de sangue no Brasil varia de 0,08% em Florianópolis-SC e Manaus-AM seundo Galvão (1994) *apud* Soares *et al* (2000) a 1,80% em Salvador-BA (MOREIRA *et al*, 1993). No Ceará, essa prevalência é de 0,40% (DE CASTRO-COSTA *et al.*, 1995). No Rio de Janeiro, foram detectados anticorpos anti-HTLV-I em 3,7% de 215 pacientes observados no Instituto Nacional do Câncer, e em 1 dentre 119 indivíduos de raça negra assintomático (ANDRADA-SERPA *et al*, 1989). A média de soroprevalência no País é de 0,46% (GALVÃO-CASTRO *et al*, 1997). Essa prevalência média é cerca de 20 a 100 vezes maior que a relatada nos EUA e Europa. Esses dados colocam o Brasil à frente no *ranking* em termos de valor

absoluto de indivíduos soropositivos para HTLV-I/II, onde a população estimada é de cerca de 150 milhões de habitantes (SOARES *et al*, 2000).

1.5 - MODOS DE TRANSMISSÃO DO HTLV-I

Com relação à transmissão do HTLV-I, sabe-se que os vírus podem ser transmitidos por:

1.5.1 - TRANSMISSÃO MATERNO-INFANTIL.

A transmissão vertical do HTLV-I da mãe infectada para o feto pode se dar por via transplacentária, durante o parto, ou por leite materno (TAKAHASHI *et al*, 1991). No caso do aleitamento materno, foi comprovado que cerca de 20 a 35% das crianças nascidas de mães portadoras do HTLV-I apresentam soroconversão (KUSUHARA, 1987).

A presença de linfócitos infectados pelo HTLV-I no leite materno parece ser um dos fatores determinantes dessa infectividade (KUSUHARA *et al*, 1987). Altos títulos de anticorpos maternos, presença de anticorpos anti-p40x são outros fatores que estão associados com a infectividade (KASHIWAGI *et al*, 1990; WIKTOR *et al*, 1993).

1.5.2 - TRANSMISSÃO SEXUAL.

O HTLV-I é transmitido através de relações sexuais, principalmente do homem contaminado para a mulher. Um estudo realizado no Japão, por 10 anos, concluiu que 60% das mulheres se infectam com o HTLV-I a partir de seus maridos,

enquanto em apenas 0,4% a transmissão se deu da mulher infectada para o homem (KAJIYAMA,1986). A transmissão desse vírus também pode ocorrer em relações entre homossexuais masculinos, porém com menos eficiência que a transmissão do HIV (BARTHOLOMEW *et al*, 1987).

1.5.3 - TRANSMISSÃO PARENTERAL.

Em relação à transfusão sangüínea e de hemoderivados, no Japão, foi bem documentada a transmissão do HTLV-I/II mediante componentes celulares do sangue, onde a taxa de conversão de 63% (26/41) ocorreu em receptores desses produtos contaminados com o vírus; o tempo de soroconversão variou de 20 a 50 dias após a transfusão. Não foi observada soroconversão entre receptores de unidades de plasma fresco HTLV-I/II soropositivos (OKOCHI *et al*, 1984).

Somente componentes sangüíneos celulares (concentrados de hemácias e plaquetas) podem transmitir o vírus HTLV-I. A eficácia da transmissão é inversamente proporcional ao tempo de estocagem do hemoderivado (LEVINE *et al*, 1993; KLEINMAN *et al*, 1993), provavelmente relacionada à viabilidade dos linfócitos (LEVINE *et al*, 1993; SATO *et al*, 1986).

Kleinman *et al* (1993) encontraram correlação significativa entre o tempo de estocagem de concentrado de hemácias (≤ 14 dias e > 14 dias) e o índice de transmissão para o vírus HTLV-I/II.

Existem relatos na literatura de indivíduos que se tornaram soropositivos para o HTLV-I através de transfusões sangüíneas contaminadas, que desenvolveram leucemia linfoma de células T do adulto (ATLL) ou TSP/HAM em um tempo

relativamente curto. Casos de TSP/HAM ocorreram, após a transfusão, num intervalo de três anos (OSAME *et al*, 1990b; GOUT *et al*, 1990).

Outro modo de transmissão sanguínea do HTLV-I é o uso de drogas injetáveis: a alta soroprevalência para HTLV-I/II entre usuários de drogas injetáveis parece decorrer do uso compartilhado de seringas e agulhas. Entretanto, são poucos os dados na literatura que determinam e quantificam a associação de soropositividade para HTLV-I/II com o uso de drogas injetáveis (SOARES *et al*, 2000).

Em regra, o HTLV-I está presente em grupos populacionais fechados, indicando uma transmissão horizontal. Outra importante característica da transmissão do HTLV-I é que ela necessita de contato célula-célula, o que não é necessário para a transmissão do HIV, já que virions livres, presentes no plasma, são altamente infectantes (LEVY *et al*, 1984).

1.6 - PARAPRESIA ESPÁSTICA TROPICAL/MIELOPATIA ASSOCIADA AO HTLV-I (TSP/HAM).

No Brasil, casos de TSP/HAM foram descritos pela primeira vez em 1989, no Ceará e em São Paulo (DE CASTRO-COSTA *et al*, 1989; MARTINS-CASTRO *et al*, 1989). Posteriormente, esta mesma condição foi descrita em outras regiões do país (DE CASTRO-COSTA *et al*, 1991; ANDRADE-FILHO *et al*, 1996).

Em contraste com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), a grande maioria dos indivíduos infectados pelo HTLV-I é clinicamente assintomática e menos de 5% dos portadores crônicos do HTLV-I desenvolverão a TSP/HAM, que é uma

doença desmielinizante crônica progressiva que afeta a medula espinhal e a substância branca do cérebro (LEVIN, 1997).

Os sintomas iniciais surgem geralmente de maneira insidiosa, após um período de latência muito variável, e tendem a ser mais curtos se correlacionados com o contágio transfusional (KLEINMAN *et al*, 1993).

Raramente, o paciente pode apresentar-se com uma afecção de instalação abrupta. Após a fase de progressão inicial, usualmente ocorre uma lenta deterioração do quadro clínico até atingir um platô (MENA-BARRETO *et al*, 2000).

Os distúrbios da marcha, a fraqueza e o enrijecimento dos membros inferiores são afetados com maior intensidade e constituem os principais sinais e sintomas de apresentação da doença. O tônus muscular torna-se aumentado e o grau de espasticidade torna-se, portanto, o principal fator limitante. Há restrição da deambulação comunitária e o paciente necessitará de auxílio progressivo de bengalas e andadores para realizá-la. A cadeira de rodas representa o estágio final da evolução da doença (TAKAYANAGUI, 2000).

A espasticidade pode variar de moderada a intensa e à dor lombar baixa, e a outros sinais de liberação piramidal como sinais de Babinski, hiperreflexia dos tendões patelares e aquilianos, muitas vezes com clônus são comuns (RIBAS & MELO, 2002).

Os sintomas de disfunção autonômica podem anteceder, serem concomitantes ou manifestar-se tardiamente na evolução da doença. Os sintomas compatíveis com bexiga neurogênica, de importante morbidade, podem manifestar-se com a sensação de esvaziamento incompleto e urgência miccional. A disfunção erétil no homem pode ocorrer precocemente. Se não, ocorrerá com a evolução da doença. O envolvimento sensitivo mostra-se discreto e manifesta-se com graus

variados de perdas sensitivas e sensação de disestesia (MENA-BARRETO *et al*, 2000)

1.6.1 - PATOLOGIA DA TSP/HAM

Macroscopicamente, não se identificam alterações visíveis no encéfalo, em comparação com sinais evidentes de moderada a grave atrofia medular. As áreas predominantemente afetadas no sistema nervoso central (SNC) são as zonas de circulação marginal (*watershed zones*) da medula espinhal em pacientes com TSP/HAM, onde os linfócitos estagnados podem facilmente aderir ao endotélio e invadir o SNC. Isto explicaria a maior predisposição a lesões da medula torácica na TSP/HAM. (OSAME, 1997).

As alterações histopatológicas encontradas correspondem a um processo inflamatório progressivo crônico com marcante exsudação parenquimatosa de linfócitos e monócitos nas substâncias cinzenta e branca da medula, perpetuando-se por mais de três anos após o início dos sintomas neurológicos, resultando em severa degeneração da substância branca acompanhada por marcantes reações tissulares glio-mesenquimais. Não somente inflamação, mas também a degeneração da substância branca é mais acentuada na medula torácica inferior. As colunas laterais da medula espinhal estão sempre e mais severamente lesadas, a degeneração simétrica dos tratos piramidal laterais é evidente em todos os casos, e os achados são consistentes com o quadro neurológico de paraparesia espástica dos membros inferiores. Os danos da coluna posterior e anterior são mais variáveis e menos expressivos comparados com os danos da coluna lateral (DE CASTRO-COSTA, *et al*, 2002; NAGAI & OSAME, 2003

1.6.2 - RESPOSTA IMUNOLÓGICA AO HTLV-I

Ainda é desconhecido como indivíduos infectados por HTLV-I podem desenvolver TSP/HAM; sabe-se, porém, que a mielopatia não resulta exclusivamente da infecção direta pelo vírus e sim de mecanismos imunopatogênicos ou auto-ímmunes. Em fases precoces da doença, os linfócitos são abundantes e consistem em um número equivalente de linfócitos CD8+, CD4+ e células B. Na apresentação crônica de TSP/HAM, células inflamatórias são infreqüentes e quase que exclusivamente representadas por CD8+. Em contraste com portadores assintomáticos de HTLV-I e controles soronegativos, pacientes com TSP/HAM desenvolvem uma resposta específica contra peptídeos virais imunodominantes do HTLV-I, a partir de linfócitos CD8+ (HANON *et al*, 2000; JACOBSON, 2002).

Os primeiros anticorpos produzidos a partir da infecção pelo vírus HTLV-I são dirigidos contra a proteína Gag e predominam nos primeiros dois meses. Posteriormente, anticorpos anti-envelope são produzidos e, finalmente, cerca de cinquenta por cento dos indivíduos infectados vão apresentar anticorpo anti-Tax (MUELLER *et al*, 1997; MANNIS *et al*, 1991).

Duas grandes teorias tentam explicar o desenvolvimento da TSP/HAM: um modelo auto-ímmune e um modelo citotóxico. Na teoria auto-ímmune, a infecção pelo HTLV-I provocaria a ativação de células T auto-reativas, as quais migrariam para o sistema nervoso central (SNC), com secreção de citocinas, iniciando-se o processo inflamatório, com destruição tecidual; prenuncia a ausência do vírus HTLV-I no SNC, sendo exclusivo dos linfócitos T. Na teoria citotóxica, haveria um ataque citolítico, mediado por células CD8+, contra células do SNC infectadas por HTLV-I ou contra

células CD4 infectadas dentro do SNC; prenuncia infecção por HTLV-I e sua transcrição no SNC (HOLLSBERG, 1995).

Vários estudos buscam correlacionar fatores ligados aos mecanismos imunopatológicos/imunoprotetores com o desenvolvimento ou manutenção das diferentes formas clínicas da infecção, no sentido de compreender o papel do sistema imunológico no processo de cronicidade diferenciada da infecção pelo HTLV-I. Os fatores e os mecanismos pelos quais eles se manifestam ainda estão por ser esclarecidos. Alguns parâmetros como elevada linfoproliferação espontânea *in vitro*, alta carga proviral, altos títulos de anticorpos para antígenos do HTLV-I, tanto no soro quanto no líquido cefalorraquidiano (LCR) parecem estar associadas com a presença de TSP/HAM (BARMAK et al, 2003; KUBOTA, 2000; NAGAI & OSAME, 2003;)

Uma vez que os linfócitos T CD4+ também podem desempenhar um papel importante modulando a resposta de células T CD8+ antivirais, as células T CD4+ infectadas pelo HTLV exerceriam um papel duplo, regulando a resposta imune contra elas próprias e contra células T CD8+ infectadas. Neste contexto, linfócitos T CD8+, de forma controversa, atuariam em mecanismos antivirais e imunopatológicos, uma vez que a infecção pelo HTLV poderia interferir em aspectos centrais da resposta imune do hospedeiro importante para o desenvolvimento de auto-agressão. As células T CD8+ citotóxicas assumem um papel importante no desenvolvimento/manutenção dessa patologia (NAGAI. 2001)

O provírus HTLV-I é encontrado principalmente em células T CD4+ *in vivo*, mas até um quarto da carga proviral é encontrado em células T CD8+ (HANON,2000). Títulos de anticorpos séricos correlacionam-se com a carga proviral do HTLV-I. Contudo, permanece obscuro se altos títulos de anticorpos contribuem

significativamente para proteção ou patogênese da doença associada ao HTLV-I (NAGAI, 1998). A frequência média de células T CD4+ HTLV-I específico foi 25 vezes maior em pacientes com TSP/HAM do que em portadores HTLV-I assintomático com uma carga proviral similar (GOON, 2002).

Células tipo Th1 (produzindo IFN- γ) predominaram entre células T helper HTLV-I específicos ambas em pacientes com TSP/HAM e em portadores assintomáticos (BANGHAM, 2003) O antígeno HTLV-I dominante reconhecido por células T CD4+ foi proteína Env, seguido por Gag e Pol (GOON, 2002).

A principal característica da resposta celular T CD8+ é a alta frequência de células T CD8+ HTLV-I específicas e seu estado de ativação crônica (BANGHAM, 2003). A frequência de células T CD8+ HTLV-I específicos está correlacionada positivamente com a carga proviral, especialmente em portadores HTLV-I assintomáticos (KUBOTA, 2000), e a frequência é ligeiramente mais alta em pacientes com TSP/HAM do que em portadores HTLV-I assintomáticos (BANGHAM, 2003)

Acredita-se que células T CD8+, além de exercerem sua função citotóxica, secretam citocinas essenciais para a manutenção da resposta inflamatória. O aumento de citocinas, tais como IFN- γ e TNF- α , nos compartimentos afetados durante a infecção viral, acompanhado da manutenção do processo inflamatório, parece ser controlador importante da ativação de linfócitos T CD8+ auto-reativos e/ou da perda da tolerância à auto-antígenos. A análise da ativação celular, tanto no sangue periférico quanto no LCR, chama a atenção para o fato de que pacientes com TSP/HAM apresentam aumento de células T ativadas, positivas para os marcadores HLA-DR e CD28 (BRITO-MELO, 2000; IJICHI, 1989)

Células T CD4+ e CD8+ ativadas têm sido encontradas nas lesões da substância branca em pacientes com TSP/HAM, linfócitos ativados e altos títulos de anticorpos anti-HTLV-I têm sido encontrados no líquido cefalorraquidiano de pacientes com TSP/HAM (JACOBSON, 2002). A frequência de células T CD8+ HTLV-I específicas no líquido cefalorraquidiano podem exceder a frequência de tais células no sangue, frequência de células T CD4+ HTLV-I específica não tem sido mensurada (BANGHAM, 2003).

A co-existência de alta carga proviral e células T CD8 vírus específicas são importantes características dessa doença, em que a expressiva resposta imune celular continuamente dirigida para esses vírus pode contribuir para o processo inflamatório nas lesões do sistema nervoso central (SNC) nos pacientes com TSP/HAM (NAGAI *et al*, 2001).

1.6.3 - DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA TSP/HAM

A pesquisa de anticorpos anti-HTLV-I é feita tanto no soro como no líquido cefalorraquidiano (LCR). Alguns testes podem ser sensíveis à detecção de IgM e IgA, porém há preponderância dos de classe IgG, os quais são reativos contra proteínas do *gag* (p15, p19, p24 e p53), como ocorre nos testes de triagem: ensaio imunoenzimático (ELISA) e a aglutinação de partículas (MENNA-BARRETO *et al*, 2000)

Pelo elevado número de reações falso-positivas, são necessárias técnicas confirmatórias que possam, se possível, diferenciar o HTLV-I do HTLV-II, adicionando-se proteínas do *env* (gp21 e gp 46) ou recombinantes (gd 21, rgp 46-I e rgp 46-II). As mais utilizadas são a imunofluorescência indireta,

radioimunoprecipitação (RIPA) e *Western blot*. Visando a detectar a presença de antígenos do HTLV-I/II no soro e LCR, alguns casos pressupõem a conveniência da realização da reação em cadeia da polimerase (PCR) (MENNA-BARRETO *et al*, 2000).

1.6.4 - TRATAMENTO DA TSP/HAM

Embora significantes quantidades de informações tenham sido obtidas por mais de duas décadas através da epidemiologia, imunologia, virologia e biologia molecular da infecção pelo HTLV-I, ainda não dispomos de uma terapêutica satisfatória para o tratamento da TSP/HAM, não há um consenso quanto ao melhor medicamento ou procedimento terapêutico a ser adotado. A escolha do esquema terapêutico deve ser individualizada (MORA *et al*, 2003).

As primeiras tentativas terapêuticas foram realizadas com os corticosteróides. Osame *et al* (1990) administraram prednisolona por via oral, na dose inicial de 60-80 mg em dias alternados durante 2 meses, com redução mensal de 10 mg durante 6 meses e manutenção de 5mg/dia por mais 3 meses; melhora clínica não foi duradoura, havendo uma tendência à piora, após interrupção da corticoterapia. A pulsoterapia com metilprednisolona por via endovenosa (1g/d por 3 dias) apresentou uma resposta favorável mas de caráter fugaz (OSAME *et al*, 1990). Outros estudos revelaram não haver diferenças (GOUT *et al*, 1989; ARAÚJO *et al*, 1993).

A plasmaferese apresentou resultados animadores (NAKAGAWA *et al*, 1995), mas seu efeito foi apenas transitório (MATSUO *et al*, 1988).

A gamaglobulina em altas doses foi testada por Kuroda *et al* (1991), com resultados benéficos em 10 dos 14 pacientes, no entanto, apenas por algumas semanas.

O interferon- α , com provável ação anti-retroviral e imunomoduladora, Yamasaki *et al*, (1997) preconizaram a administração de 6 x 10⁶ UI/ dia por 2 semanas e, a seguir, 3 vezes / semana durante 22 semanas, obtendo melhora clínica em 5 dos 7 casos; o tempo de seguimento variou de 3 a 6 meses após o tratamento.

Entre as drogas antivirais, a zidovudina (AZT), um potente inibidor da transcriptase reversa e da replicação *in vitro* do HTLV-I, seria uma droga potencialmente benéfica na TSP/HAM. Entretanto, num estudo aberto realizado por Gout *et al* (1991), 5 pacientes, recebendo 0,5 ou 1g / dia de AZT durante 6 meses, não apresentaram a melhora esperada. Esta ocorreu por um curto período, desaparecendo, em praticamente todos, com a interrupção da medicação, fato observado também em um outro estudo (SHEREMATA *et al*, 1993).

Danazol, um andrógeno sintético tem sido utilizado no tratamento da TSP/HAM, possivelmente pelo efeito benéfico da ação do mesmo sobre as funções imunológicas (MELO *et al*, 1992).

Outros agentes imunomoduladores têm sido testados isoladamente ou em associações: o uso intermitente de altas doses de vitamina C (2-3 g/dia), produzindo uma supressão da proliferação espontânea de linfócitos (KATAOKA *et al*, 1993) e de pentoxifilina (200 –1200 mg/dia), um inibidor da fosfodiesterase, com efeito, supressor do fator de necrose tumoral-alfa e da expressão de moléculas de adesão *in vitro*, inibindo, assim, a adesão de células T ativadas às células endoteliais

submetidas a processo inflamatório no encéfalo e na medula e abortando o primeiro estágio da migração de linfócitos ao sistema nervoso central (SHIRABE *et al*, 1997).

A espasticidade tem sido melhor manejada com diazepam (10-30 mg/dia), baclofen (15-90 mg/dia) e tizanidina (4-16 mg/dia). O tratamento fisioterápico visa a determinar a melhor prevenção de incapacidades, assim como estabelecer estratégias de autocuidado e incremento nas atividades da vida diária (MORA *et al*, 2003).

1.7 - MANIFESTAÇÕES SISTÊMICAS

Outras condições foram também relacionadas ao HTLV-I, tais como leucemia linfoma de células T do adulto (ATLL), uveíte, alveolite, dermatopatias, síndrome de Sjögren, polimiosite, artrite e outras condições (GESSAIN & GOUT, 1992; MELO *et al*, 1994; KUBOTA *et al*, 2000). No entanto, a maioria das pessoas infectadas com esse vírus permanece assintomática, sendo a possível relação para a instalação de patologias associadas de cerca de 1:2.000 no caso de TSP e de 1:10.000 no caso de ATLL (KONDO *et al.*, 1987; KAPLAN *et al*, 1990).

1.8 - NEOPTERINA

A neopterina é uma 2-amino-4-hidroxi-6-(D-erithro-1',2',3'-trihidroxipropil)-pteridina com baixo peso molecular (253 Da). É produzida por monócitos/macrófagos ativados por guanosina trifosfato (GTP) via GTP ciclohidrolase I (BERDOWSKA & KORCZALA 2001; MURR *et al*, 2002).

O sistema imune está diretamente implicado na produção de neopterina, de forma que quando é estimulado aumenta notavelmente os níveis dessa substância (LOPEZ *et al*, 1996). O processo se inicia quando o macrófago apresenta o antígeno processado para os linfócitos T, estimulando-os por meio de interleucina-1. Esses linfócitos T produzem interleucina-2 que vão aumentar a resposta linfocitária e a secreção de linfocinas, como o interferon- γ (IFN- γ) que vai promover a maturação dos macrófagos para a qual aumentará notavelmente a síntese de guanosina trifosfato (GTP). O IFN- γ é o principal indutor da síntese de neopterina, sendo 400 vezes mais potente que o interferon- α (IFN- α) ou interferon- β (IFN- β). Portanto, neopterina é um marcador indireto da atividade linfocitária e direto da atividade macrofágica (LOPEZ *et al*, 1996).

No macrófago, a guanosina trifosfato (GTP) é convertida pela ação da GTP ciclohidrolase I para 7,8-dihidroneopterinatrifosfato, do qual neopterina ou 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina poderá ser sintetizada. A 7,8-dihidroneopterinatrifosfato é convertida pela 6-piruviltetrahidropterina sintetase para 5,6,7,8 tetrahidrobiopterina (BH4) (BERDOWSKA & KORCZALA, 2001; MURR *et al*, 2002).

A BH4 será importante na hidroxilação da fenilalanina para tirosina no fígado, tirosina para levodopa, e triptofano para 5-hidroxitriptofano em tecido neuroendócrino que sintetiza neurotransmissores tais como as catecolaminas e serotonina. A 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina é também o co-fator da síntese de óxido nítrico (BERDOWSKA & KORCZALA, 2001).

Quase todas as células humanas produzem 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina de GTP, com exceção de monócitos/macrófagos, em que devido à falta da enzima 6-piruviltetrahidropterina sintetase ocorrerá acúmulo de 7,8-dihidroneopterinatrifosfato.

Esta pela ação das fosfatases será convertida para neopterina e 7,8-dihidroneopterina (MURR *et al*, 2002) (Figura 4).

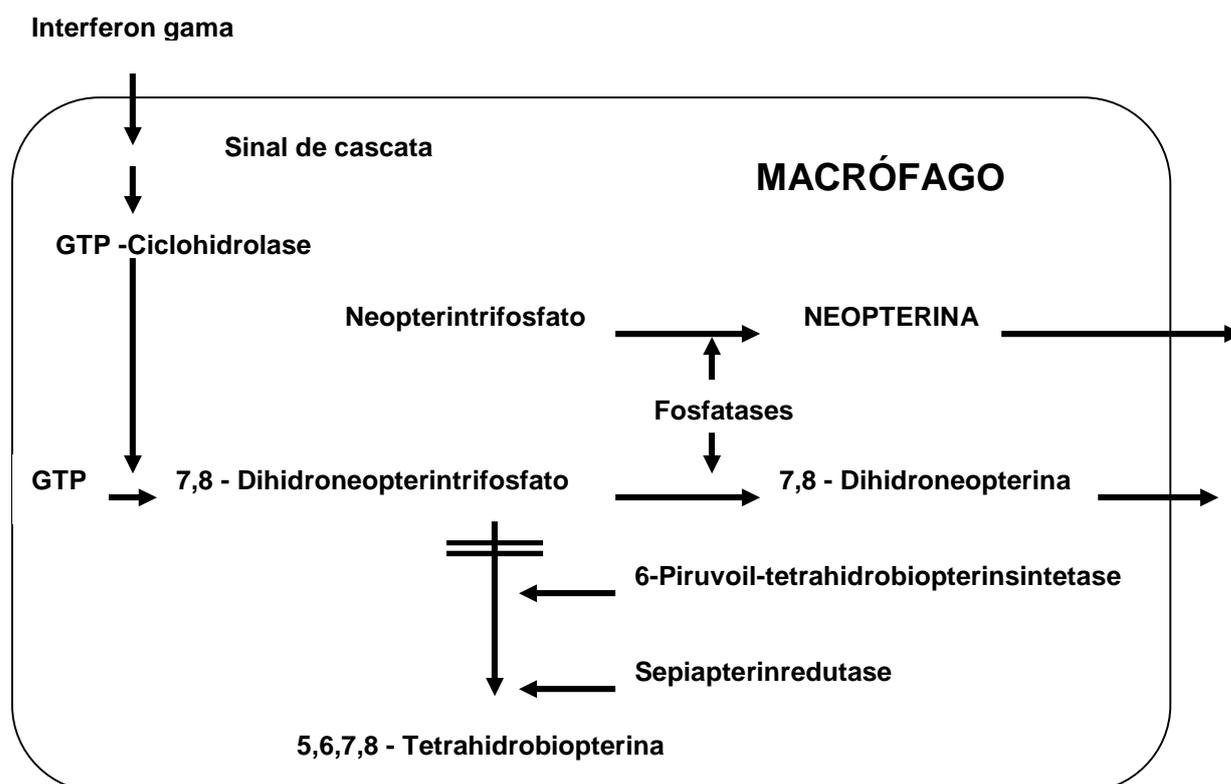


Figura 4 - Biosíntese dos derivados neopterina em monócitos/macrófagos humanos. A síntese inicia-se da GTP (guanosina trifosfato) pela estimulação da GTP ciclohidrolase I via interferon gama. Grandes quantidades de derivado neopterina são produzidos em decorrência da deficiência de 6-Piruvil-tetrahidropterinsintetase em macrófagos humanos
 FONTE: Modificado de MURR (2002)

Concentrações relevantes de neopterina somente podem ser detectadas em humanos e primatas. Grandes quantidades de neopterina são liberadas de monócitos/macrófagos humanos, preferencialmente sob estimulação com Interferon- γ (IFN- γ), uma típica citocina tipo Th 1 (BERDOWSKA & KORCZALA, 2001; HOFFMANN *et al*, 2003). Produção aumentada de neopterina em fluidos

corporais pode ser usada para monitorar a ativação da imunidade mediada por células (MURR *et al*, 2002).

Outras células, tais como células endoteliais da veia umbilical humana ou cultura de células epiteliais renais podem produzir neopterina sob estimulação com INF- γ , porém em quantidades menores do que pelos macrófagos (MURR *et al*, 2002).

Conseqüentemente, doenças semelhantes a infecções virais serão acompanhadas por produção aumentada de neopterina, pois haverá domínio da resposta imune mediada por células. Ao contrário, em situações como infecções bacterianas agudas, somente produção moderada de neopterina poderá ser encontrada. Neste caso, haverá domínio da resposta imune Th2, caracterizado pela formação de IL-4, -5, -6, -9, -10 e -13, que corresponderá à resposta imune humoral (BERDOWSKA & KORCZALA,2001; MURR *et al*, 2002).

Durante a infecção viral aguda, produções aumentadas de neopterina podem ser observadas, e correlacionam-se com a atividade da doença, sendo descritas na hepatite viral aguda, Epstein-Barr, citomegalovírus, sarampo, caxumba, rubéola, influenza. Portanto, concentrações elevadas de neopterina nos fluidos corporais podem ser encontradas no final do período de incubação antes do início dos sintomas clínicos. Os níveis altos de neopterina ocorrem antes dos anticorpos específicos contra os vírus se tornarem detectáveis, fato que acontece até cerca de 2 a 3 semanas após o início da produção de neopterina aumentada. Na soroconversão, concentrações de neopterina declinam e normalizam, se o sistema imune combater o agente infeccioso (HOFFMANN *et al*, 2003; MURR *et al*, 2002).

No caso da infecção viral crônica, tais como pelo HIV, as concentrações de neopterina declinam após a soroconversão, porém não normalizam. Assim, mais do

que três quartos dos HIV infectados mostram ainda produção elevada de neopterina, embora sem sintomas. Já nas fases iniciais da doença, as concentrações de neopterina serão de valor prognóstico: Quando ocorre concentração elevada de neopterina no soro ou urina, a doença tende a progredir mais rapidamente acelerando o desenvolvimento da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). Com a progressão da doença, a concentração de neopterina aumenta em paralelo com diminuição da contagem de linfócitos T CD4+. Valores de neopterina também correlacionam com a carga viral e a terapia antiretroviral diminui a produção de neopterina (BERDOWSKA & KORCZALA, 2001; MURR *et al*, 2002).

Hagberg *et al* (1993) estudaram as concentrações de neopterina no LCR em 24 indivíduos saudáveis, sendo a média de 4,2 nmol/L (intervalo 3,2-5.5) enquanto que a concentração média de neopterina no soro foi de 6.0 nmol/l.

Millner *et al* (1998) estudaram as concentrações de neopterina no LCR e soro em grupos de pacientes com infecção do SNC e SNP e em controles saudáveis, concluindo que concentrações de neopterina no LCR não estavam correlacionadas com concentrações de neopterina no soro, portanto, neopterina no LCR pareceu ser produzido intratecalmente e sugeriram a microglia como fonte celular primária.

Existem poucos estudos em relação às concentrações de neopterina em indivíduos HTLV-I assintomáticos e em pacientes com TSP/HAM. Nomoto *et al* (1991) relataram que as concentrações de neopterina estavam extremamente elevadas no LCR de pacientes com TSP/HAM e em indivíduos HTLV-I assintomáticos estavam normais. Ali *et al* (1992) estudaram LCR de 22 pacientes com TSP. Em 12 amostras, concentrações de neopterina estavam elevadas e em 7 amostras foram indetectáveis.

Concentrações de neopterin têm se mostrado anormal no fluido corporal em vários estados clínicos, tais como rejeição de enxerto, infecções, doença auto-imune, neoplasias, insuficiência renal e cardíaca, doença arterial coronariana e infarto miocárdico (BERDOWSKA & KORCZALA, 2001).

Na Áustria, doadores de sangue são triados para concentrações elevadas de neopterin desde 1994, doadores com concentração de neopterin no soro $>11\text{nmol/l}$ são excluídos para transfusão (LAICH, 2002; SCHENNACH, 2002).

2 – OBJETIVOS

2.1-GERAL:

Avaliar as concentrações de neopterina no soro e líquido cefalorraquidiano (LCR) em pacientes com TSP/HAM e em indivíduos HTLV-I assintomáticos.

2.2 -ESPECÍFICOS:

Estudar a associação entre as concentrações de neopterina e o tempo de doença na TSP/HAM.

Estudar a associação entre as concentrações de neopterina e o grau da incapacidade motora na TSP/HAM.

Estudar a associação entre as concentrações de neopterina e celularidade, níveis de glicose e de proteínas no líquido cefalorraquidiano.

3 – METODOLOGIA

3.1- MODELO DE ESTUDO:

Para o estudo do perfil clínico e laboratorial de pacientes HTLV-I soropositivos com paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-I (TSP/HAM), e indivíduos HTLV-I soropositivos assintomáticos sem mielopatia, optou-se por um estudo observacional do tipo caso-controle.

3.2- POPULAÇÃO DE ESTUDO:

A população, objeto do estudo, foi constituída por dois grupos de pacientes com presença de anticorpos anti-HTLV-I.

3.2.1- GRUPO I:

Constituído por pacientes infectados pelo HTLV-I, sintomáticos, com paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-I, entidade conhecida universalmente por TSP/HAM.

Para compor este grupo, foram convidados, para participar da pesquisa, todos os pacientes com diagnóstico de TSP/HAM do Ambulatório de Neurologia do Hospital Universitário Getúlio Vargas (HUGV) da Universidade Federal do Amazonas –UFAM em um total de 11 pacientes. A abordagem dos pacientes foi realizada no período de 07 de maio de 2003 a 28 de fevereiro de 2004.

3.2.1.1 - Critérios de inclusão para o Grupo I (pacientes HTLV-I sintomáticos com TSP/HAM):

- Maiores de 18 anos de idade;
- sorologia positiva para HTLV-I no teste de ELISA e *Western blot*, e Reação em Cadeia de Polimerase (PCR);
- pacientes que apresentam diagnóstico de mielopatia lenta e progressiva, conforme critérios diagnósticos para TSP/HAM da Organização Mundial de Saúde -OMS-1988 (OSAME,1990a). (Anexo 1)

3.2.1.2 - Critérios de exclusão para o Grupo I (pacientes HTLV-I sintomáticos com TSP/HAM):

- menores de 18 anos de idade;
- patologias compressivo-degenerativas da coluna cervical (espondilose ou discopatia, fraturas e traumas);
- neoplasias (tumores extra ou intramedulares);
- vasculopatias da medula (malformações arteriovenosas ou infartos isquêmicos);
- doenças neurodegenerativas (esclerose lateral amiotrófica, siringomielia);
- doenças desmielinizante (esclerose múltipla, encefalomielite disseminada aguda-ADEM);
- causa nutricional de mielopatia (deficiência de vitamina B12);
- causas de mielopatia infecciosa como espôndilo-discite (tuberculose,bactérias);
- doenças autoimune (lupus eritematoso sistêmico, artrite reumatóide, glomerulonefrite, doença de Graves);
- sorologia positiva para citomegalovírus, vírus das hepatites B e C, HIV, HTLV-II, sífilis, doença de Chagas;
- história atual de malária ou tuberculose pulmonar.

Todos os pacientes do Grupo I foram submetidos a exame físico geral e neurológico, e aos seguintes testes laboratoriais: hematológicos, bioquímicos, sorológicos, avaliação do líquido cefalorraquidiano (LCR) além de raios-X de tórax. Entre os métodos de imagem, a ressonância nuclear magnética do encéfalo e da coluna vertebral foi empregada na investigação para diagnóstico diferencial com outras patologias de lesões cerebrais e medulares.

Uma paciente foi excluída do estudo em decorrência de estar em uso de corticosteróide e apresentar infecções do trato urinário de repetição.

3.2.2 - GRUPO II:

Constituídos por indivíduos HTLV-I infectados, assintomáticos, selecionados a partir da população de doadores de sangue da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (FHMOAM).

Para compor este grupo foram convidados, para consulta médica, os doadores com sorologia positiva para HTLV-I e que preenchiam os requisitos iniciais dos critérios de inclusão. Em um total de 21 pacientes. A abordagem dos candidatos realizou-se no Ambulatório de doadores de sangue da FHMOAM no período de 07 de maio de 2003 a 28 de fevereiro de 2004.

3.2.2.1 - Critérios de inclusão para o Grupo II (indivíduos HTLV-I assintomáticos):

- indivíduos HTLV-I infectados, maiores de 18 anos de idade, sem sinais ou sintomas de mielopatia, selecionados a partir da população de doadores de sangue da Fundação HEMOAM;
- sorologia positiva para HTLV-I no teste de ELISA e diagnóstico confirmado por *Western blot* e Reação em Cadeia de Polimerase (PCR).

3.2.2.2 - Os critérios de exclusão para o Grupo II (indivíduos HTLV-I assintomáticos):

- Indivíduos sintomáticos com queixas subjetivas de mielopatia e neuropatias;
- história atual de hepatopatias, nefropatias, cardiopatias, pneumopatias (pneumonia, tuberculose pulmonar) e doenças dermatológicas;
- sinais de doença infecciosa atual ou de ter apresentado doença febril nos últimos 30 dias;
- doença autoimune (LES, artrite reumatóide, glomerulonefrite, doença de Grave);
- sorologia positiva para vírus da hepatite B e C, HIV , HTLV-II, sífilis, doença de Chagas; CMV.
- gravidez.

Foram excluídos do estudo doadores de sangue do interior do Estado do Amazonas e doadores cujos testes de triagem para HTLV-I/II, após repetição em duplicata, não apresentaram reatividade para o teste ELISA.

Este grupo era composto inicialmente por 24 indivíduos assintomáticos, sendo 15 do sexo feminino e 09 do sexo masculino, porém, 3 destes indivíduos foram positivos para HTLV-II na genotipagem por análise de polimorfismo de fragmento de restrição, sendo excluídos do estudo.

Todos os indivíduos incluídos no grupo I e II foram examinados pelo mesmo examinador (pesquisador).

Selecionaram-se, ainda aleatoriamente, 20 amostras de soro de doadores de sangue, 10 homens e 10 mulheres, idade média de 34,6 anos e intervalo de 23 a 44 anos, HTLV-I soronegativos, para padronização da concentração de neopterinina no soro de indivíduos normais.

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da FHEMOAM e aprovado segundo o Parecer 0010/2003 de 07/07/2003.

3.3 – AVALIAÇÃO CLÍNICA:

Os dados dos pacientes foram obtidos por meio de protocolo específico, aplicado para coleta das variáveis, constituída de uma ficha de investigação clínica previamente elaborada (Anexo 2ª e 2b). Os dados foram obtidos diretamente dos participantes do estudo, em consultório reservado, e de forma individual. O exame físico geral e neurológico foi realizado na mesma semana da coleta das amostras biológicas. Os principais dados clínicos coletados foram:

Nome, data de nascimento, idade, sexo, hábitos pessoais, características das manifestações neurológicas - mielopatia (idade de início; forma de início, tempo de doença, grau de incapacidade motora, modo de evolução, sinais e sintomas neurológicos), tratamento realizado. Para avaliar o grau de incapacidade motora

foi utilizada a Escala de Incapacidade Motora Revisada de Osame (NAKAGAWA *et al*, 1996) (Anexo 3).

Todos os participantes do estudo não estavam em uso de medicamentos imunossupressores nos últimos três meses que antecederam a coleta das amostras.

3.4 - AVALIAÇÕES LABORATORIAIS

Foram coletadas amostras de sangue venoso e líquido cefalorraquidiano (LCR) na FHEMOAM sempre com a participação do pesquisador, após a aceitação através do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexos 4a, 4b, 4c, 4d).

3.4.1 - Amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR)

Foram coletadas em um total de 8ml de LCR, no período de 01 de agosto de 2003 a 30 de janeiro de 2004, através de punção lombar na posição de decúbito lateral entre 7:30 e 9 horas da manhã, em ambiente apropriado e confortável, com assepsia local com álcool iodado e uso de agulha de punção lombar descartável. Somente amostras de LCR sem contaminação sanguínea foram aceitas para o estudo. As amostras de LCR foram fracionadas, 5ml enviadas imediatamente para o laboratório de bacteriologia da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas para os testes de rotina, e as restantes foram divididas em alíquotas de 300ul em microtubos de 1,5ml e imediatamente congeladas.

3.4.2 - Amostras de sangue venoso

Foram coletadas em um total de 10ml sem ácido etilenodiamino-tetra acético (EDTA), para obtenção de soro, e 5ml de sangue total com EDTA. As amostras foram coletadas no mesmo dia e momento da coleta do líquido cefalorraquidiano

(LCR). Foram coletadas amostras adicionais de sangue venoso para a realização de exames complementares laboratoriais: hemograma completo, glicemia, lipidograma, uréia, creatinina, transaminases, tempo de atividade da protrombina, bilirrubinas totais e frações, fosfatase alcalina, VHS. Estas análises laboratoriais tiveram como finalidade identificar distúrbio metabólico e/ou infeccioso em atividade.

Após a obtenção do soro, as amostras foram conservadas à -80 °C até a realização dos testes sorológicos . Para os testes moleculares (PCR) amostras de sangue total foram conservados a menos 80 C.

. A pesquisa de anticorpos anti-HTLV-I/II foi realizada pelo método imunoenzimático (ELISA) com posterior diagnóstico pelo método *Western-blot* no soro e LCR. Todos os testes foram realizados no Laboratório de Sorologia da FHEMOAM. A avaliação da concentração de neopterinina no soro e LCR, e o estudo molecular (PCR) foram realizados no Laboratório de Pesquisa da mesma Fundação.

No exame do líquido cefalorraquidiano (LCR), incluiu-se ainda a citologia, citometria e bioquímica (glicose, proteínas, cloretos). além da avaliação por GRAM, Ziehl e Nankin que foram realizados por meio de técnicas de rotina no laboratório de microbiologia do Instituto de Medicina Tropical do Estado do Amazonas (IMTM).

3.4.3 - DETERMINAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-HTLV-I/II

A pesquisa de anticorpos anti-HTLV I/II foi realizada pelo Ensaio imunoenzimático (ELISA) preparado com proteínas recombinantes, derivadas da proteína transmembrana do HTLV-I e do HTLV-II e com peptídeos sintéticos de regiões imunodominantes do envelope de HTLV-I e HTLV-II. Foram realizadas empregando-se um conjunto diagnóstico comercial (*MUREX HTLV I+ II GE80/81*,

MUREX Diagnósticos, Brasil). A realização dos testes seguiu as recomendações do fabricante.

Resumidamente, 200ul de soro diluído, que contém anticorpos contra o HTLV-I ou HTLV-II, foi adicionada às cavidades de uma microplaca previamente recoberta com um lisado viral purificado de HTLV-I, um lisado viral purificado de HTLV-II e um antígeno recombinante p21 de HTLV-I/II. A interação entre os anticorpos na amostra (quando presentes) e os antígenos na cavidade leva à formação de complexos imunológicos. Após incubação, a amostra foi aspirada e a cavidade lavada com solução tampão. Subseqüentemente, acrescentou-se imunoglobulina anti-humana (de cabra) conjugada com peroxidase, que se ligou ao complexo antígeno-anticorpo durante uma segunda incubação. A reação enzimática foi interrompida com solução de ácido sulfúrico e após 15 minutos, foi realizada a leitura da absorvância com espectrofotômetro, utilizando-se filtro de 450 nm

Cálculo dos Resultados: Controle Negativo (CN) –Calcular a absorvância média dos três (3) controles negativos. *Cut-off* – Calcular o *cut-off* pela adição de 0,2 à média do CN. Os critérios utilizados para a interpretação dos resultados foram de acordo com a técnica da *Murex*. Amostras com absorvância menor que o valor do *cut-off* foram consideradas negativas. Amostras com absorvância maior ou igual ao valor do *cut-off* foram consideradas reativas.

Amostras com resultados positivos foram retestadas em duplicata. Caso as amostras sejam reativas em pelo menos uma das duplicatas retestadas, elas foram consideradas reativas para o teste HTLV-I ou II. Amostras não-reativas em duplicata foram consideradas não-reativas para anticorpos HTLV.

3.4.4 - DIAGNÓSTICO CONFIRMATÓRIO PELO TESTE *WESTERN BLOT* (WB)

Para confirmação com o método ***Western-blot***, foi empregado o conjunto diagnóstico comercial *HTLV BLOT 2.4*, fabricado por *Genelabs Diagnostics Pte. Ltda Singapore Science Park*. O ensaio *HTLV BLOT 2.4* é um ensaio imunoenzimático qualitativo para a detecção *in vitro* de anticorpos para o HTLV-I e HTLV-II em soro ou plasma humano. Ele tem seu uso como um teste suplementar mais específico para amostras repetidamente reativas em procedimentos de triagem como ELISA.

Para a realização do ensaio pela técnica de WB (*Western blot*), procedeu-se da seguinte maneira: fitas de nitrocelulose contendo as proteínas virais (bandas antigênicas – HTLV-I/II) foram hidratadas com solução tampão Tris-NaCl; bloquearam-se os sítios inespecíficos com soro humano tamponado e, posteriormente, incubaram-se as fitas de nitrocelulose com o soro dos pacientes. Os anticorpos específicos para HTLV, se presentes na amostra, ligaram-se às proteínas virais. As tiras de nitrocelulose foram então lavadas para remover materiais não ligados, e em seguida, incubadas com anti-IgG humana marcada com enzima. Nessa técnica, foi utilizado anticorpo secundário ligado à fosfatase alcalina. Após a incubação, as tiras foram lavadas para retirar o excesso de conjugado e outros possíveis interferentes do ensaio. A interação antígeno-anticorpo foi visualizada após a adição do substrato 5-Br-4-Cl-3-Indol-fosfato (BCIP) e nitroblue tetrazolium (NBT). Os resultados foram bandas coloridas para cada antígeno reagente.

Os critérios utilizados para a interpretação dos resultados foram de acordo com as instruções do fabricante:

Soronegativo:	Nenhuma reatividade para proteínas específicas de HTLV.
HTLV-I soropositivo:	Apresenta reatividade para gag (p19, com ou sem p24) e para 2 proteínas do env (GD21 e rgp46-I).
HTLV-II soropositivo:	Apresenta reatividade para gag (p24, com ou sem p19) e para 2 proteínas do env (GD21 e rgp46-II).
HTLV soropositivo:	Apresenta reatividade para gag (p19 e p24) e env (GD21).
Soroindeterminado:	Bandas específicas detectadas de HTLV, mas que não preenchem os critérios de soropositividade para HTLV-I, HTLV-II ou HTLV.

Quadro I – Critérios de Interpretação dos Resultados do *HTLV blot 2.4* da GLD

3.4.5 - REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR)

A extração do DNA para realização da PCR foi feita com 200ul de sangue total com a utilização do conjunto diagnóstico comercial *Qiagen blood, Germany* conforme as instruções do fabricante.

Para realização da PCR procedeu-se segundo Tuke *et al* (1992), com pequenas modificações da seguinte maneira:

Primeira etapa: a reação foi preparada utilizando-se os seguintes reagentes para uma amostra; água mili-Q autoclavada 29,0ul; tampão 10 x,10ul; MgCl₂ (50mM), 2,5ul; dNTP's (10mM), 1,0ul; *primer* SK 44-A (externo) – 100 pmoles, 1,0 ul; *primer* SK 44-B (externo) – 100 pmoles, 1,0ul; Taq DNA pol, 0,5ul e 05ul da amostra

de DNA totalizando um volume final de 50ul. A seguir, as amostras foram submetidas aos seguintes termocíclon ,após uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C, foram realizados 35 ciclos de 1 minuto a 95°C, 35 ciclos de 1 minuto a 50°C, 35 ciclos de 1 minuto a 72°C, seguido por uma extensão final de 7 minutos a 72°C. O termociclador utilizado foi o *Eppendorf Mastercycle* tanto para a primeira quanto para a segunda etapa da PCR.

Segunda etapa: foi preparado utilizando-se os seguintes reagentes para uma amostra: água mili-Q autoclavada 31,5ul; tampão 10 x,10ul; MgCl₂ (50mM), 2,5ul; dNTP's (10mM), 1,0ul; *primer* SK43-A (interno) – 100 pmoles, 1,0 ul; *primer* SK 43-B (interno) – 100 pmoles, 1,0ul; Taq DNA pol, 0,5ul e 2,5ul do produto da PCR da primeira etapa totalizando um volume final de 50ul. Após uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C, foram realizados 35 ciclos de 1 minuto a 95°C, 25 ciclos de 1 minuto a 50°C, 25 ciclos de 1 minuto a 72°C, seguido por uma extensão final de 7 minutos a 72°C. Os *primers* utilizados na PCR foram os seguintes:

Descrição	Localização da sequência	Tamanho do produto
externo / <i>sense</i> (SK 44-A)	5'CGG ATA CCC AGT CTA CGT GT 7358 – 7377 (HTLV-I)	159 pb
externo / <i>antisense</i> (SK 44-B)	5'GAG CCG ATA ACG CGT CCA TC 7516 – 7497 (HTLV-I)	
Interno / <i>Sense</i> (SK 43-A)	5'GTG TTT GGC GAT TGT GTA CA 7264 – 7283 (HTLV-II)	128 pb
Interno / <i>antisense</i> (SK 43-B)	5'CCA TCG ATG GGG TCC CA 7501 – 7485 (HTLV-I)	

Os produtos de amplificação da segunda etapa (20ul) foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 2,0%. A visualização dos fragmentos amplificados foi feita através de transiluminação do gel em luz ultravioleta, após coloração em solução de brometo de etídeo. Para definição do tamanho do produto (128 pares de base), utilizou-se um padrão de peso molecular (*Ladder 100pb*) (Anexo 6).

Para diferenciação do HTLV-I e HTLV-II utilizou-se a enzima de restrição TAQ1 (*Invitrogen Life Technologies*) com sítio de reconhecimento 5'...T↓CGA...3' e 3'...AGC↓T...5', 05ul do produto positivo da segunda etapa. Foi preparada uma reação contendo os seguintes reagentes: água mili-Q autoclavada 10,0ul, tampão 2,0ul, BSA 2,0ul, TAQ1 1,0ul, e 0,5ul do produto da segunda reação da PCR perfazendo um volume final de 20ul.

O fragmento produzido após a digestão para o HTLV-I foi 122pb + 06pb e para o HTLV-II 69pb + 53pb + 06pb, utilizou-se um padrão de peso molecular (*Ladder 50pb*) (Anexo 6).

3.4.6 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NEOPTERINA

A determinação quantitativa das concentrações de neopterina no soro e líquidocefalorraquidiano (LCR) foram realizadas empregando-se um conjunto diagnóstico comercial (*IBL neopterin enzyme immunoassay Kit, IBL-Hamburg, Germany*), baseado nos princípios dos ensaios imunoenzimáticos (ELISA), do tipo competitivo, em microplaca. Este teste baseia-se na competição entre o antígeno conjugado à peroxidase e o antígeno não conjugado (se presente nas amostras dos pacientes), por anticorpos antineopterina, produzidos em coelho.

Resumidamente, 8 padrões, com concentrações crescentes de neopterinina foram pipetados nas cavidades da microplaca, além de amostras de soros controles, amostras de soros e LCR dos pacientes. Posteriormente, foram adicionadas 100ul de neopterinina conjugada à peroxidase e, em seguida, distribuídos 50ul de anti-soro anti-neopterinina. Após lavagem, foram pipetados 200ul da solução de substrato tetrametilbenzidine (TMB). Após bloqueio da reação, a densidade óptica das amostras foi medida com espectrofotômetro, utilizando-se filtro de 450 nm.

De acordo com o fabricante, o coeficiente de variação intra-ensaio é de 3,6 a 6,8%, e o inter-ensaio é de 7,6 a 10,3%, em amostras de soro. A sensibilidade analítica do teste é descrita pelo fabricante como sendo de 0,7nmol/l ou 0,18ng/ml e, na avaliação da especificidade apresentou reação cruzada com dihidroneopterinina em 3,5%, sendo abaixo de 1% nas demais substâncias testadas.

A quantificação das concentrações de neopterinina nas amostras foram obtidas pela comparação com a curva estabelecida pelos padrões conhecidos, fornecidos pelo fabricante. Em um gráfico, com escala semilogarítmica, foram plotados, além dos valores dos padrões, os valores de densidade óptica encontrados nas amostras, para fins de comparação. Em anexo (Anexo 5) apresenta-se o modelo de uma curva obtida com os padrões, em um dos testes realizados.

O valor normal da concentração da neopterinina no soro segundo o fabricante é de ≤ 10 nmol/l. O valor normal da concentração de neopterinina no LCR, em indivíduos saudáveis, não foi ainda estabelecido. De acordo com alguns autores pode variar entre $3,2 \pm 1,8$ nmol/l segundo Dotevall *et al* (1990); 4,2 nmol/l com intervalo de 3,2 a 5,5nmol/l segundo Hagberg *et al* (1993); 4,2 nmol/l segundo Andersson *et al* (2001) e $2,9 \pm 1,5$ nmol/l segundo Nikkila *et al* (2002), em nosso estudo, não foi possível a obtenção de valores de neopterinina no líquido

cefalorraquidiano (LCR) de indivíduos saudáveis (HTLV-I soronegativos) por razões éticas. Em nossa pesquisa consideramos o valor limite normal superior da neopterina no LCR de 4,2 nmol/l, considerando os estudos citados.

3.5 - METODOLOGIA ESTATÍSTICA

O programa utilizado para o armazenamento e a análise dos dados foi o programa *Epi-info* versão 6 distribuído pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) (<http://www.cdc.gov/epiinfo/>).

Na análise descritiva dos dados, calcularam-se a média, mediana e desvio padrão para os dados quantitativos e freqüências absolutas e relativas para os dados qualitativos.

Os testes utilizados, na análise dos dados quantitativos, foram teste t de *student* e correlação de *Pearson*, quando observada a normalidade, e os testes de *Mann-Whitney* quando não foi observada a normalidade.

O nível de significância utilizado nos testes foi de 5%.

4- RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO AMOSTRAL

A população de estudo compreendeu 32 indivíduos, sendo 11 (34.4%) pacientes do grupo I com TSP/HAM e 21 (65.6%) indivíduos do grupo II HTLV-I assintomáticos, constituídas por 08 (25%) indivíduos do sexo masculino e 24 (75%) indivíduos do sexo feminino. A média de idade e o desvio padrão da população de estudo foram de $43,9 \pm 9,5$ anos, respectivamente (Tabela 1).

Variáveis	n	%
Grupos		
TSP/HAM	11	34,4
HTLV-I assintomático	21	65,6
Sexo		
Masculino	08	25,0
Feminino	24	75,0
Idade		
Média (DP)	$43,9 \pm 9,5$	
Mediana	44	
Intervalo	20-66	

Tabela 1 – Distribuição da população de estudo de acordo com o sexo e idade

Na distribuição da casuística analisada neste trabalho, podemos observar que o grupo I, constituído pelos pacientes com TSP/HAM, era composto por 11 (34,4%)

pacientes, sendo 02 (18,2%) do sexo masculino e 09 (81,8%) do sexo feminino. O grupo II representado por indivíduos HTLV-I assintomáticos era composto por 21 (65,6%) indivíduos, sendo 06 (28,6%) do sexo masculino e 15 (71,4%) do sexo feminino.

A Tabela 2 mostra que o grupo de pacientes com TSP/HAM apresentou uma média e desvio padrão para idade de $48,5 \pm 11,1$ anos, enquanto a média e o desvio padrão para idade no grupo de indivíduos HTLV-I assintomáticos foram de $41,5 \pm 7,7$ anos, respectivamente. A diferença entre as médias de idade entre pacientes com TSP/HAM e indivíduos HTLV-I assintomáticos foi estatisticamente significativa ao nível de 5% ($p=0,0440$).

Grupo	Idade (anos)	
TSP/HAM		
(n = 11)	Média (DP)	48.5 (11.1)
	Mediana	48
HTLV-I assintomático		
(n= 21)	Média (DP)	41.5 (7.7)
	Mediana	44
	p-valor	<i>0,0440</i>

Tabela 2 – Comparação da média de idade em relação aos grupos TSP/HAM e HTLV-I assintomático

Foram ainda incluídas neste trabalho 20 amostras de soro de doadores de sangue de repetição da FHMOAM, sendo 10 (50%) do sexo masculino e 10 (50%) do sexo feminino, idade média e desvio padrão de $34,6 \pm 8,31$ anos, mediana de 35 anos, intervalo de 23-44 anos. A média e o desvio padrão das concentrações de neopterinina no soro dos 20 indivíduos doadores de sangue foram de $5,0 \pm 1,3$ nmol/l

e mediana de 4,7 nmol/l. A análise das concentrações da neopterina nestas amostras teve como finalidade a padronização da neopterina no soro de indivíduos HTLV-I soronegativos.

4.2 – CONCENTRAÇÕES DE NEOPTERINA NO SORO E LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO (LCR) NOS PACIENTES COM TSP/HAM E INDIVÍDUOS HTLV-I ASSINTOMÁTICOS.

As dosagens das concentrações de neopterina no soro e líquido cefalorraquidiano (LCR) foram realizadas em 32 amostras de soro e 16 amostras de LCR, correspondendo respectivamente a 11 (34,4%) amostras de soro e 10 (62,5%) amostras de LCR de pacientes com TSP/HAM (grupo I), e 21 (65,6%) amostras de soro e 06 (37,5%) amostras de LCR de indivíduos HTLV-I assintomáticos (grupo II). Uma paciente com diagnóstico confirmado anteriormente de TSP/HAM, não permitiu a coleta de nova amostra de LCR para a pesquisa, somente aceitou a coleta de sangue.

Apenas 06 (28,6%) pessoas entre 21 indivíduos HTLV-I assintomáticos (grupoll) autorizaram a coleta de LCR para o presente estudo.

A Tabela 3 e figura 5 mostram que a concentração média e o desvio padrão de neopterina no soro de pacientes com TSP/HAM foram de $10,3 \pm 8,9$ nmol/l, enquanto que no grupo HTLV-I assintomáticos foram de $4,6 \pm 1,2$ nmol/l respectivamente. A diferença entre as médias das concentrações de neopterina no soro entre os grupos foi estatisticamente significativa ao nível de 5% (Mann-Whitney, $p= 0,0069$).

Grupo	Estatística	Neopterina Soro (<10nmol/l)	Neopterina LCR (<4,2nmol/l)
HTLV-I assintomático	Intervalo	2,7-7,2	2,2-5,2
	Média (DP)	4,6 (1,2)	3,4 (1,1)
	Mediana	4,4 (n = 21)	3,1 (n = 6)
TSP/HAM	Intervalo	2,8-35	7,8-166
	Média (DP)	10,3 (8,9)	30,8(47,8)
	Mediana	6,8 (n = 11)	17,0 (n = 10)
	p-valor	0,0069	0,0011

Tabela 3 – Distribuição das médias das concentrações de neopterina no soro e LCR entre indivíduos HTLV-I assintomáticos e pacientes com TSP/HAM

A concentração média e o desvio padrão de neopterina no LCR de pacientes com TSP/HAM foram de $30,8 \pm 47,8$ nmol/l, e em indivíduos HTLV-I assintomáticos foram de $3,4 \pm 1,1$ nmol/l respectivamente. No grupo de pacientes com TSP/HAM, os valores das concentrações de neopterina no LCR foram bastante elevados em relação ao grupo de indivíduos HTLV-I assintomáticos. A diferença entre as médias das concentrações de neopterina no LCR entre cada grupo foi estatisticamente significativa ao nível de 5% (Mann-Whitney, $p= 0,0011$).

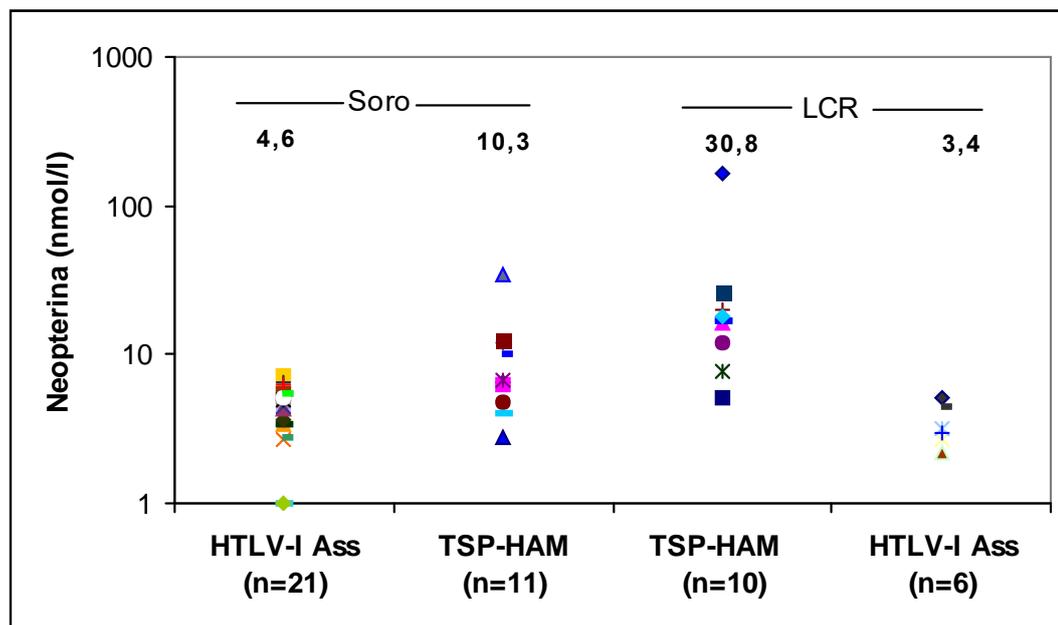


Figura 5 - Distribuição das médias das concentrações de neopterin no soro e no LCR em relação aos grupos HTLV-I assintomáticos e pacientes com TSP/HAM

A Tabela 4 mostra a distribuição por sexo, idade e valores das concentrações de neopterin no soro e LCR nos pacientes com TSP/HAM. Nela podemos observar que somente 04 (36,4%) amostras de soro apresentaram concentrações de neopterin acima do limite superior estabelecido, enquanto, em todas amostras de LCR as concentrações de neopterin apresentaram valores acima do limite superior da referencia.

Casos de TSP/HAM	Sexo	Idade (anos)	Neopterina soro (<10nmol/l)	Neopterina LCR (<4,2nmol/l)
1	M	27	10	17
2	F	40	12,5	18
3	F	40	4,0	17
4	F	44	4,8	12
5	F	44	12,5	26
6	M	48	12	20
7	F	52	6,2	16,5
8	F	55	6,8	-
9	F	56	6,5	7,8
10	F	62	2,8	7,8
11	F	66	35	166
Média = 48,5 (11,1)			Média = 10,3 (8,9) Média = 30,8 (47,8)	

Tabela 4 – Distribuição do sexo, idade e valores das concentrações de neopterina no soro e LCR em pacientes com TSP/HAM (grupo I)

Na tabela 5 podemos observar a distribuição da idade, sexo e valores das concentrações de neopterina no soro e LCR, nos indivíduos HTLV-I assintomáticos. As concentrações de neopterina no soro e no LCR apresentaram valores dentro da normalidade.

HTLV-I Assintomático	Sexo	Idade (anos)	Neopterina soro (<10nmol/l)	Neopterina LCR (<4,2nmol/l)
1	F	36	2,8	4,5
2	F	46	3,6	2,7
3	M	38	4,3	2,2
4	F	47	4,5	3,2
5	F	35	4,8	5,2
6	M	54	6,6	3,0

7	F	38	3,4	-
8	F	35	3,4	-
9	M	20	3,7	-
10	F	44	3,8	-
11	F	44	5,5	-
12	F	52	4,3	-
13	F	44	4,3	-
14	M	45	4,4	-
15	F	39	4,9	-
16	M	41	5,2	-
17	F	44	6,2	-
18	M	54	7,2	-
19	F	37	5,4	-
20	F	34	2,7	-
21	F	44	5,5	-
		Média=41,5 (7,7)	Média =4,6 (1,2)	Média =3,4 (1,1)

Tabela 5 - Distribuição da idade, sexo e concentração de neopterinina no soro e LCR em indivíduos HTLV-I assintomático (grupo II)

4.3- CONCENTRAÇÕES DE NEOPTERINA NO SORO E LCR EM RELAÇÃO AO SEXO NOS INDIVÍDUOS HTLV-I ASSINTOMÁTICOS E PACIENTES COM TSP/HAM.

A Tabela 6 mostra a concentração média e o desvio padrão de neopterinina no soro por sexo, em 21 amostras de indivíduos HTLV-I assintomáticos, sendo 15 (62,5%) feminino e 6 (37,5%) masculino, os valores foram respectivamente $4,3 \pm 1,1$ nmol/l e $5,2 \pm 1,4$ nmol/l. ($p=0.1244$). Enquanto em 11 amostras de soro de pacientes

com TSP/HAM a concentração média e o desvio padrão de neopterin foram de $10,1 \pm 9,9$ nmol/l em 9 (81,8 %) pacientes do sexo feminino e $11,0 \pm 1,4$ nmol/l em 2 (18,2%) pacientes do sexo masculino. ($p= 0,9073$). A comparação entre as médias das concentrações de neopterin no soro em relação ao sexo para cada grupo, não apresentou significância estatística ao nível de 5% (Mann-Whitney).

Grupo	Estatística	Neopterin (nmol/l) no soro		P valor
		F	M	
HTLV-I Assintomático n=21	Intervalo	2,7-6,2	3,7-7,2	0,1244
	Média(DP)	4,3 (1,1)	5,2 (1,4)	
	Mediana	4,3 (n=15)	4,8 (n=6)	
TSP/HAM n=11	Intervalo	2,8-35	10-12	0,9073
	Média(DP)	10,1 (9,9)	11,0 (1,4)	
	Mediana	6,5 (n=9)	11 (n=2)	

Tabela 6 - Distribuição da comparação das médias das concentrações de neopterin no soro em relação ao sexo, entre os indivíduos HTLV-I assintomáticos e pacientes com TSP/HAM

Na Tabela 7 podemos verificar que no grupo dos indivíduos HTLV-I assintomáticos, em relação ao sexo, a concentração média de neopterin em 6 amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) foi de $3,9 \pm 1,1$ nmol/l em 4 (66,7%) femininos e $2,6 \pm 0,5$ nmol/l em 2,0 (33,3%) masculinos ($p= 0,2212$). Nas 10 amostras de LCR de pacientes com TSP/HAM, a concentração média de neopterin foi de $33,8 \pm 53,7$ nmol/l em 8,0 (80%) femininos e $18,5 \pm 2,1$ nmol/l em 2,0 (20%) masculinos. ($p= 0,7086$). A comparação entre as médias das concentrações de

neopterinina no LCR, em relação ao sexo para cada grupo, não apresentou significância estatística ao nível de 5% (Mann-Whitney).

Grupo	Estatística	Neopterinina (nmol/l) LCR		P valor
		Sexo		
		F	M	
HTLV-I Assintomático (n=6)	Intervalo	2,7-5,2	2,2-3,0	0,2212
	Média (DP)	3,9 (1,1)	2,6 (0,5)	
	Mediana	3,8 (n=4)	2,6 (n=2)	
TSP/HAM (n=10)	Intervalo	7,8-166	17-20	0,7086
	Média (DP)	33,8 (53,7)	18,5(2,1)	
	Mediana	16,7 (n=8)	18,5 (n=2)	

Tabela 7 - Distribuição da comparação das médias das concentrações de neopterinina no LCR em relação ao sexo, entre os indivíduos HTLV-I assintomáticos e pacientes com TSP/HAM

4.4 - TEMPO DE EVOLUÇÃO E GRAU DE INCAPACIDADE MOTORA (GIM) DA TSP/HAM.

Em nossa amostra de 11 pacientes com TSP/HAM, a distribuição do tempo de doença, grau de incapacidade motora e os valores das concentrações de neopterinina no soro e LCR, encontram-se apresentada na Tabela 8.

Casos de TSP/HAM	Sexo	Idade (anos)	Tempo de doença (anos)	Grau de Incapacidade motora (0-10)	Neopterinina soro (<10nmol/l)	Neopterinina LCR (<4,2nmol/l)
1	M	27	4	7	10	17
2	F	40	3	2	12,5	18
3	F	40	7	4	4,0	17

4	F	44	15	5	4,8	12
5	F	44	14	6	12,5	26
6	M	48	1	2	12	20
7	F	52	5	4	6,2	16,5
8	F	55	8	5	6,8	-
9	F	56	10	4	6,5	7,8
10	F	62	6	4	2,8	7,8
11	F	66	16	8	35	166
Média (DP)		48,5±11,1	8,0±5,0	4,6±1,8	10,2±8,9	30,8±47,8
Mediana		48,0	7,0	4,0	6,8	17

Tabela 8 - Distribuição do tempo de doença, grau de incapacidade motora e as concentrações de neopterin no soro e LCR nos pacientes com TSP/HAM

4.4.1 - TEMPO DE EVOLUÇÃO DA TSP/HAM:

Podemos observar que no nosso estudo a média e o desvio padrão, para o tempo de doença dos pacientes com TSP/HAM foram de 8,0±5,0 anos respectivamente (intervalo de 1 a 16 anos).

A análise das concentrações de neopterin no soro e LCR em relação ao tempo de doença não evidenciaram correlação, conforme mostram as figuras 6 ($r=0,39$; $p=0,2339$) e 7 ($r=0,51$; $p=0,1090$) respectivamente.

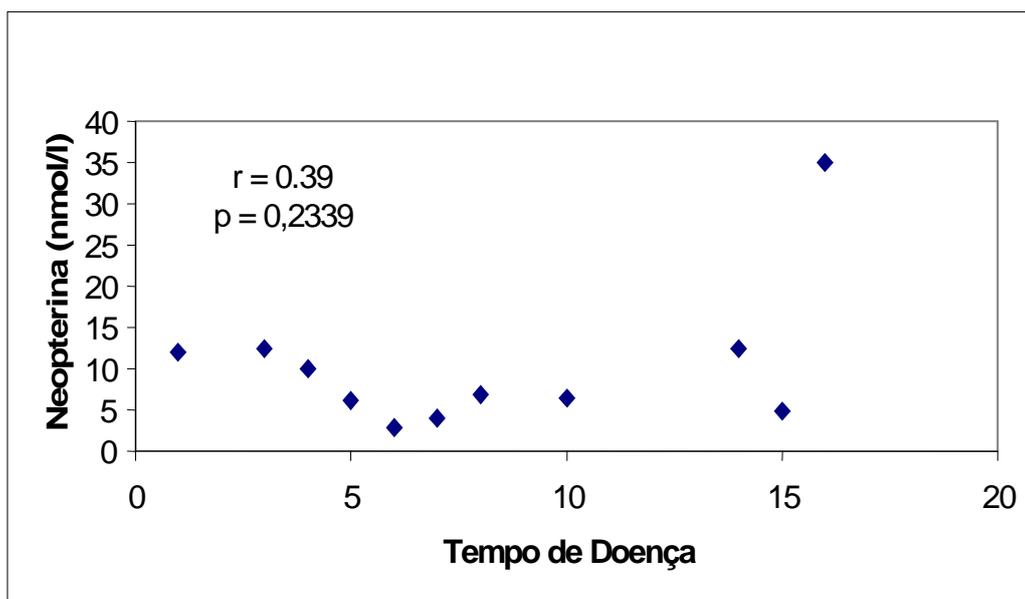


Figura 6 – Correlação entre as concentrações de neopterin no soro em relação ao tempo de doença nos pacientes com TSP/HAM

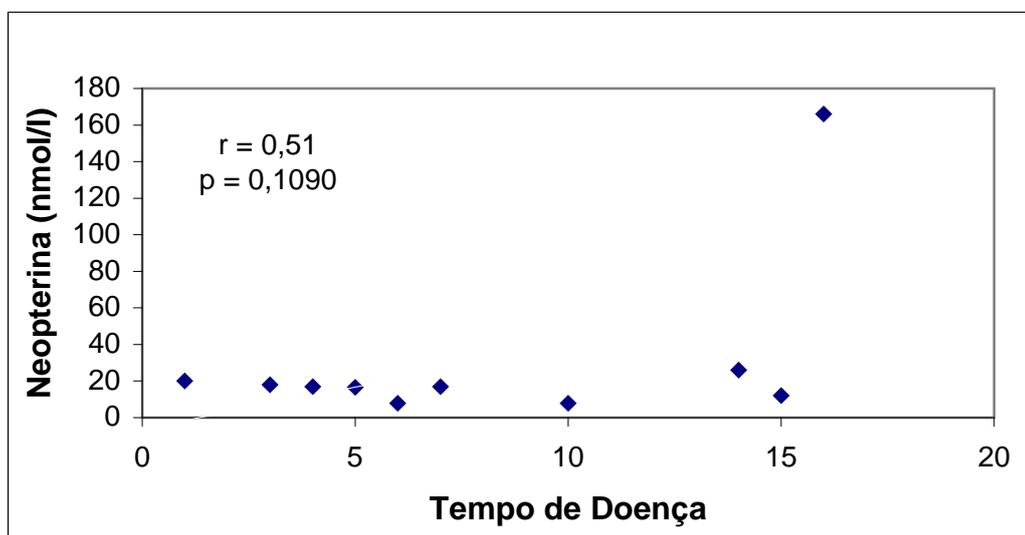


Figura 7 – Correlação entre as concentrações de neopterin no LCR em relação ao tempo de doença nos pacientes com TSP/HAM

4.4.2 GRAU DE INCAPACIDADE MOTORA (GIM) DA TSP/HAM.

A média e o desvio padrão para o grau de incapacidade motora nos pacientes do grupo II com TSP/HAM foram de $4,6 \pm 1,8$ respectivamente. Entre os pacientes deste grupo, 9 (81,9%) deambulavam sem ajuda ($GIM \leq 6$), e somente 2 (18,1%) eram incapazes de caminhar, mesmo com auxílio ($GIM \geq 7$), movimentando-se em cadeira de rodas (tabela 8).

Pode ser observada na Figura 8 que os nossos resultados não apresentaram correlação entre as concentrações de neopterina no soro e o grau de incapacidade motora na TSP/HAM ($r = 0,52$, $p = 0,1030$).

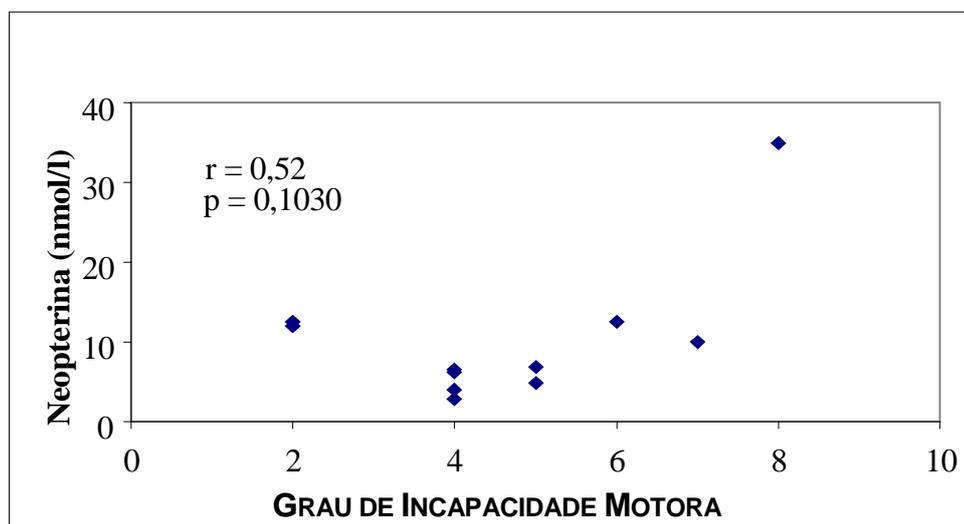


Figura 8 – Correlação entre as concentrações de neopterina no soro em relação ao grau de incapacidade motora nos pacientes com TSP/HAM

Na Figura 9 podemos observar que os nossos resultados apresentaram uma fraca correlação entre as concentrações de neopterina no LCR em relação ao grau de incapacidade motora na TSP/HAM ($r = 0,62$, $p = 0,0437$).

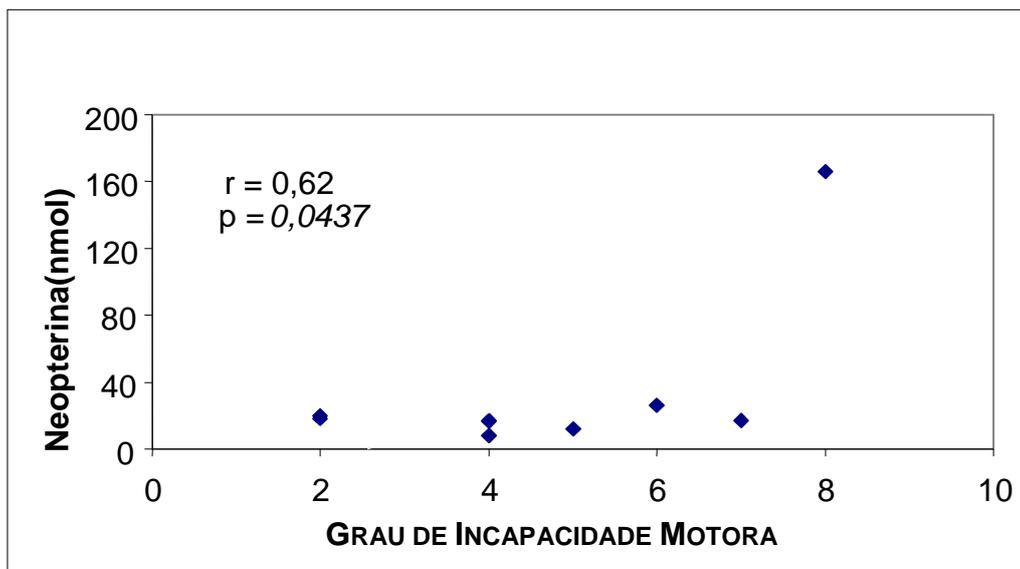


Figura 9 – Correlação entre as concentrações de neopterin no LCR em relação ao tempo de doença nos pacientes com TSP/HAM

4.5 CONCENTRAÇÕES DE NEOPTERINA E CARACTERÍSTICAS DO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO (LCR).

Na análise das nossas amostras de LCR de pacientes com TSP/HAM, podemos verificar na figura 10 que alguns pacientes (40%) apresentaram leve pleiocitose (> 4 células/mm³) com intervalo de 1 a 21 células/mm³, contudo não houve correlação entre as concentrações de neopterin e contagem de células no LCR ($r = -0,21$; $p = 0,5626$).

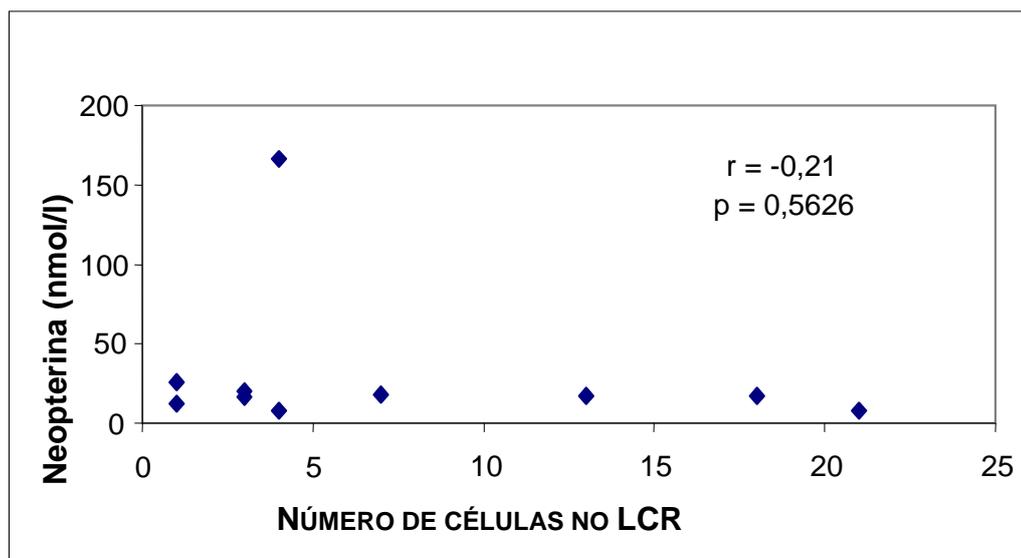


Figura 10 – Correlação das concentrações de neopterin em relação número de células no LCR em pacientes com TSP/HAM

As figuras 11 e 12 mostram que não houve correlação entre concentrações de neopterin e quantidade de proteínas ($r = 0,07$; $p = 0,8390$), ocorrendo o mesmo para glicose ($r = 0,04$; $p = 0,9196$) e concentrações de neopterin no líquido cefalorraquidiano (LCR).

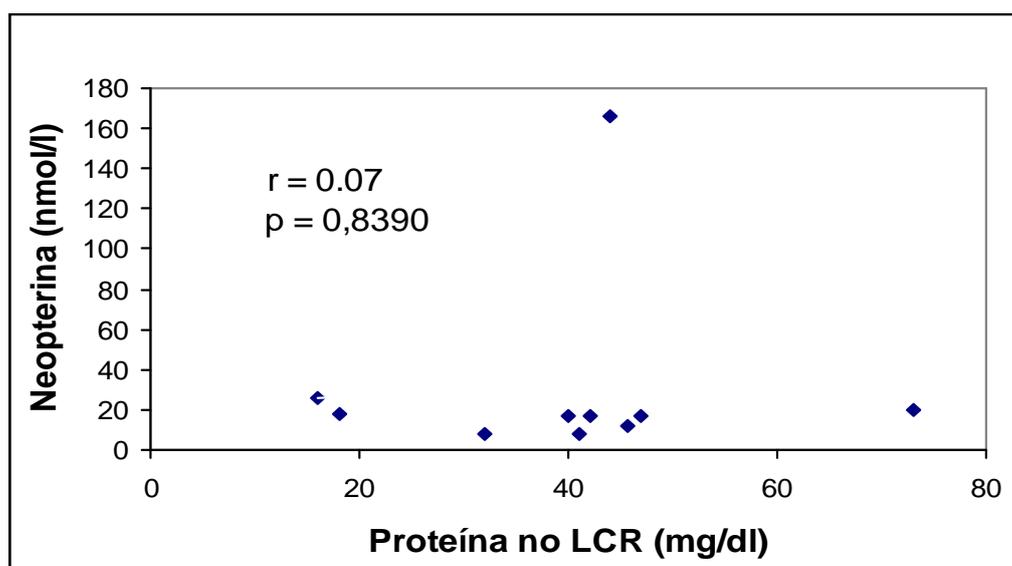


Figura 11 – Correlação entre as concentrações de neopterin e quantidade de proteínas no LCR em 10 pacientes com TSP/HAM

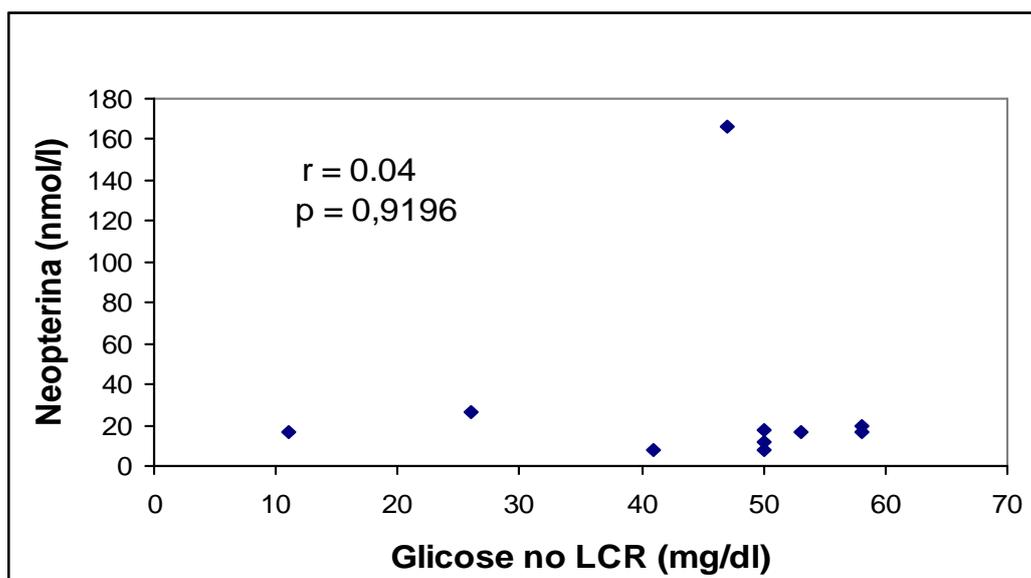


Figura 12 – Correlação entre as concentrações de neopterin e quantidade de glicose no LCR em 10 pacientes com TSP/HAM

No grupo II dos pacientes HTLV-I assintomáticos, também não apresentaram correlação entre concentrações de neopterin e celularidade no LCR, assim como concentrações de neopterin e quantidade de proteínas e glicose no líquidocefalorraquidiano (não mostrado).

5- DISCUSSÃO

A associação do HTLV-I com uma mielopatia clinicamente caracterizada por paraparesia espástica de evolução crônica, insidiosa e progressiva tem sido gradualmente descrita no mundo (GESSAIN *et al*, 1985; OSAME *et al*, 1986, NAKAGAWA *et al*, 1996; NAGAI *et al*, 1998) e, no Brasil, desde a sua detecção em 1989 (De CASTRO-COSTA *et al*, 1989; CASTRO *et al*, 1989; SPINA-FRANÇA *et al*, 1990; ARAÚJO *et al*, 1996; SEGURADO *et al*, 2002).

Os primeiros casos descritos de associação entre o HTLV-I e TSP/HAM na região Norte do Brasil foram relatados por Ishak *et al* (2002) em Belém, Pará.

Os pacientes do nosso estudo com TSP/HAM são os primeiros casos descritos em Manaus, Amazonas, os quais se tornaram presentes, mediante os critérios diagnósticos para TSP/HAM da Organização Mundial de Saúde (OSAME, 1990).

Em nossa população de estudo, observamos uma predominância do sexo feminino em ambos os grupos analisados, TSP/HAM (81,8%) e indivíduos HTLV-I assintomáticos (71,4%), estando de acordo com relatos de outros autores (NAGAI *et al*, 1998, MALONEY *et al*, 2000).

Uma justificativa para o predomínio da infecção no sexo feminino seria a maior eficácia da transmissão sexual do HTLV-I do homem para mulher do que o inverso (KAJIYAMA *et al*, 1986; MALONEY *et al*, 2000), além da exposição às transfusões sanguíneas serem mais frequentes em mulheres (KAPLAN, 1996).

A contaminação pelo HTLV-I não representa obrigatoriamente o surgimento de manifestações clínicas. A elevada frequência de indivíduos HTLV-I assintomáticos em áreas endêmicas sugere que a infecção pelo HTLV-I não seja o

único fator determinante para o desenvolvimento da TSP/HAM e que haja a participação de co-fatores tais como: linhagem viral (NIEWIESK *et al*, 1994), função imunológica (LEVIN *et al*, 1997), antígeno de histocompatibilidade (HLA) (USUKU *et al*, 1990) e carga viral (HASHIMOTO *et al*, 1998).

A prevalência da TSP/HAM está entre 0,1% e 2% de indivíduos HTLV-I infectados. O risco de desenvolver essa doença entre portadores está estimado ser de 0,23% no Japão (KAPLAN *et al*, 1990), sendo que aproximadamente 2/3 dos pacientes são mulheres (NAKAGAWA *et al*, 1995).

Segundo Nagai & Osame (2003), o fator de risco mais importante para o desenvolvimento de TSP/HAM é a alta carga proviral do HTLV-I, uma vez que, entre pacientes com TSP/HAM, a quantidade de DNA proviral de HTLV-I nas células mononucleares do sangue periférico é mais alta (aproximadamente 16 vezes), quando, comparada aos portadores HTLV-I assintomáticos. A carga proviral de HTLV-I, em indivíduos HTLV-I assintomáticos é mais elevada entre familiares de pacientes com TSP/HAM do que entre indivíduos HTLV-I assintomáticos sem TSP/HAM (NAGAI *et al*, 1998). Esses achados sugerem que fatores genéticos podem influenciar a carga proviral HTLV-I. Jeffery *et al* (1999, 2000) estudaram a relação entre HLA tipo I e o risco de desenvolvimento de TSP/HAM e mostraram que portadores do vírus HTLV-I que possuíam HLA*02 e/ou Cw*08 apresentavam menor carga viral e menor risco de desenvolver a TSP/HAM, enquanto que a presença do HLA-B*5401 estava associada com alta carga proviral e maior risco de desenvolver a TSP/HAM. Em relação ao HLA classe II, indivíduos HTLV-I assintomáticos com padrão HLA-DRB1*0101 também apresentavam maior risco de desenvolver TSP/HAM (USUKU *et al*, 1998; JEFFERY *et al*, 2000).

No Brasil, Borducchi (2000) observou que HLA-DR11, em mulatos, confere susceptibilidade à TSP/HAM. HLA-DR15 em mulatos confere susceptibilidade à infecção pelo HTLV-I, mas não ao desenvolvimento de doença.

Ao analisarmos a idade da população estudada, observamos que o grupo de pacientes com TSP/HAM apresentou uma idade média de 48,5 anos, superior a 41,5 anos dos indivíduos HTLV-I assintomáticos. Nossos achados são similares aos reportados por outros autores (De CASTRO-COSTA *et al*, 1989; ARAÚJO *et al*, 1993; MALONEY *et al*, 2000).

A idade média mais elevada nos pacientes com TSP/HAM pode ser explicada pelo tempo prolongado para o diagnóstico de TSP/HAM e o longo tempo em que os indivíduos HTLV-I assintomáticos evoluem até desenvolver a TSP/HAM. Estudos mostram que a TSP/HAM acomete indivíduos predominantemente na quarta e quinta décadas de vida e, raramente, antes dos 20 ou após os 70 anos (TAKAYANAGUI, 2000).

Menos frequentemente TSP/HAM podem iniciar antes da idade adulta, em 10-30% dos casos (ARAÚJO *et al*, 2002). Nakagawa *et al* (1996), registraram início dos sintomas antes dos 15 anos de idade em 10% dos 200 pacientes estudados com TSP/HAM. Na nossa casuística não encontramos pacientes com manifestação da doença antes da idade adulta.

Em nossa pesquisa, a média das concentrações de neopterin no soro de pacientes com TSP/HAM foi elevada (10,3 nmol/l) em relação aos indivíduos HTLV-I assintomáticos (4,6 nmol/l), o que foi também observado por outros autores, embora essa diferença não tenha sido confirmada por alguns estudos. Ali *et al*, (1992) não encontraram diferenças nas concentrações de neopterin no soro entre TSP/HAM (5,1 nmol/l) e indivíduos HTLV-I assintomáticos (4,9 nmol/l).

Observamos que, a média das concentrações de neopterinina no LCR de pacientes com TSP/HAM (30,8 nmol/l) foi elevada em relação aos indivíduos HTLV-I assintomáticos (3,4 nmol/l). Observações semelhantes à nossa foram reportadas por Nomoto *et al* (1991) no Japão, onde, todas as amostras de LCR de pacientes com TSP/HAM apresentavam concentrações elevadas de neopterinina, enquanto que as concentrações de neopterinina no LCR de 17 (100%) indivíduos HTLV-I assintomáticos apresentavam-se normais. Do mesmo modo, Lezin *et al* (2000), na França, observaram valores de concentrações de neopterinina no LCR elevados em 96,5% dos pacientes com TSP/HAM. Um dado interessante é que esses autores também encontraram valores levemente elevados de neopterinina no LCR entre 32% dos indivíduos HTLV-I assintomáticos.

Em contraste, Ali *et al* (1992), no Reino Unido, estudaram 22 amostras de LCR de pacientes com TSP/HAM. Entre estes, 12 (54,6%) amostras revelavam concentrações de neopterinina elevadas, 3 (13,6%) apresentavam valores normais, sendo indetectáveis em 7 (31,8%) pacientes. Em nosso estudo, não registramos concentrações de neopterinina indetectáveis no soro e LCR.

Entre pacientes HIV soropositivos sem manifestações clínicas, em contraste com os indivíduos HTLV-I assintomáticos, estudos tem mostrado concentrações elevadas de neopterinina no LCR quando comparados com indivíduos soronegativos, talvez em decorrência do HIV infectarem o SNC precocemente no curso da infecção. As concentrações de neopterinina no LCR em HIV assintomáticos se elevam ainda mais quando estes desenvolvem manifestações neurológicas (ANDERSSON *et al*, 2001).

Na nossa pesquisa, a média das concentrações de neopterinina no LCR elevadas (30,8nmol/l) em relação à média no soro (10,3nmol/l) em pacientes com

TSP/HAM, corroboram achados de literatura de que TSP/HAM é uma desordem inflamatória crônica que pode ser mediada por atividade contínua das células inflamatórias no sistema nervoso central (NAGAI, 1998).

Araújo *et al* (1995), ressaltaram que a evolução do comprometimento neurológico não é uniforme ao longo do tempo, ocorrendo predominantemente durante o primeiro ano da doença, tornando-se relativamente estável nos anos subseqüentes. Fato não verificado na mesma casuística

Na nossa casuística, a média e o desvio padrão para o tempo compreendido entre o início dos sintomas e o diagnóstico da doença nos pacientes com TSP/HAM foram de $8,0 \pm 5,0$ anos (intervalo de 1 a 16 anos). Uma média de tempo de doença semelhante ao nosso foram também descritas por outros autores (PUCCIONI-SOHLER *et al*, 1995; OLIVEIRA *et al*, 1998).

Um dos motivos para o prolongamento do diagnóstico da TSP/HAM, seria devido a este ser feito por um profissional de saúde envolvido na prática da neurologia clínica ou neuro-reabilitação. Alguns pacientes podem ser diagnosticados como tendo mielite transversa, doença do neurônio motor, ou esclerose múltipla primariamente progressiva por meses (algumas vezes até anos), antes do seu primeiro teste sorológico para HTLV-I serem realizados (MORA *et al*, 2003).

A apresentação insidiosa, pode ser um outro fator que leva o indivíduo a procurar atendimento médico somente após alguns meses ou anos de evolução da doença (MENA-BARRETO *et al*, 2000).

Em relação à forma de apresentação, observamos que em 10 (91%) pacientes com TSP/HAM o início foi gradual e lentamente progressivo, entretanto, em 1 (9%) paciente, o início foi gradual, porém, rapidamente progressivo.

Confirmando nossos achados, Nakagawa *et al* (1996) em um estudo de 200 pacientes com TSP/HAM no Japão, observaram início gradual e lentamente progressivo em 91,5% dos e, rapidamente progressivo, em 8,5% dos pacientes.

Achados semelhantes também foram relatados por Araújo *et al* (1993), que estudaram as características clínicas em 34 pacientes com TSP/HAM no Rio de Janeiro, Brasil e observaram que, em 29 pacientes (85,3%), o início da doença foi gradual e lentamente progressivo.

A forma de apresentação gradual e lentamente progressiva parece ser o habitualmente encontrado, é considerado como um dos critérios clínicos de diagnóstico da TSP/HAM (OSAME, 1990).

Na nossa casuística, as concentrações de neopterinina no soro e LCR, nos pacientes com TSP/HAM, não exibiram correlação com o tempo de doença (figuras 6 e 7), estando de acordo com os relatos de outros autores que também não encontraram correlação entre concentrações de neopterinina no soro e LCR, e o tempo de doença em 22 pacientes com TSP/HAM (ALI *et al*,1992).

Giusti *et al* (1996), estudaram 25 pacientes com TSP/HAM com uma média de tempo de doença de 4 anos (intervalo de 0,5 a 16 anos), e os níveis de neopterinina no soro foram inversamente correlacionados com a duração da doença. A média das concentrações de neopterinina em pacientes com TSP/HAM com duração da doença menor que 4 anos foram 13,8 nmol/l comparado com 9,3 nmol/l para pacientes com longa duração da doença ($p=0,009$). Esses autores não avaliaram as concentrações de neopterinina no LCR.

Em nossa casuística, duas pacientes, apresentado 14 e 16 anos de TSP/HAM foram as que apresentaram as maiores concentrações de neopterinina no soro e LCR.

Essas pacientes apresentaram em comum uma exacerbação do déficit motor nos meses que antecederam a coleta das amostras de soro e LCR.

Analisando os dados do nosso estudo, observamos que a média do grau de incapacidade motora (GIM) dos pacientes com TSP/HAM foi de 4,6 sendo considerada de grau moderado. A avaliação foi feita pela Escala de Incapacidade Motora Revisada de Osame (NAKAGAWA *et al*, 1996) com escala crescente de dificuldades de zero a dez. Entre os pacientes com TSP/HAM, observamos que 9 (81,9%) eram ambulatoriais (GIM \leq 6) e 2 (18,1%) eram impossibilitados de deambular (GIM \geq 7), estando restritos à cadeira de rodas.

Achados análogos aos nossos foram reportados por Nakagawa *et al* (1996), que estudaram 200 pacientes com TSP/HAM, sendo 58 homens e 142 mulheres e a média do grau de incapacidade motora foi de 4,7. Nesse mesmo estudo, 83% eram ambulatoriais e 17% eram incapazes de caminhar. Em adição, Araújo *et al* (1993) estudaram 34 pacientes com TSP/HAM, apresentando a média do grau de incapacidade motora 4,9. A maioria (91,2%) era ambulatorial e apenas 8,8% estava restrita à cadeira de rodas.

Apesar da TSP/HAM ser considerada uma doença crônica e progressiva, a incapacidade motora severa impossibilitando a realização das atividades diárias, não foi o quadro predominante no nosso estudo. Segundo Takayanagui (2000), dez anos após a instalação da doença, aproximadamente 30% dos pacientes estarão paraplégicos e confinados ao leito.

ALI *et al* (1992), não encontraram correlação entre os valores das concentrações de neopterina no soro e LCR e o grau de incapacidade motora. Na nossa pesquisa, observamos que as concentrações de neopterina no soro também não apresentaram correlação com o grau de incapacidade motora (figura 8), porém,

encontramos uma leve correlação entre as concentrações de neopterinina no LCR e o grau de incapacidade motora (figura 9). Esta correlação, provavelmente, foi influenciada pelo valor extremamente elevado da concentração da neopterinina verificado em uma amostra de LCR (166nmol/l).

Em relação à ressonância nuclear magnética (RNM) cerebral, o envolvimento encefálico é descrito como múltiplas áreas de hipersinal em T2 na substância branca com características de desmielinização. Entretanto, esses achados não são específicos (MELO *et al*, 1993; KURODA *et al*, 1995; LEVIN *et al*, 1997). A similaridade dessas lesões com as da esclerose múltipla (EM) pode, por vezes, dificultar o diagnóstico diferencial (GODOY *et al*, 1995).

A atrofia medular constitui a lesão mais freqüentemente vista na RNM (figura13). Esse método também facilita o diagnóstico diferencial com outras patologias que acometem a medula espinhal, tais como fraturas, hérnias de disco, neoplasias, mielorradiculopatias da esquistossomose (RIBAS *et al*,2002).

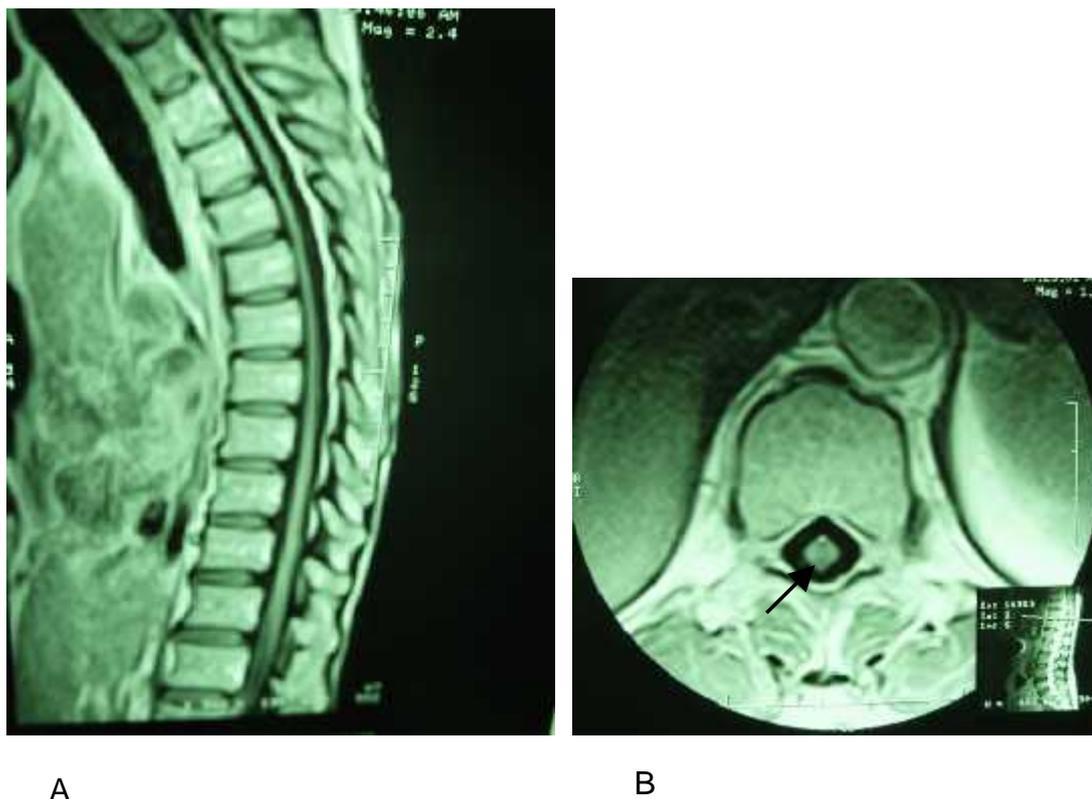


Figura 13 – Ressonância nuclear magnética da coluna vertebral. Nos cortes sagital (A) e axial (B) imagem ponderada em T1, observa-se a atrofia da medula espinhal (seta) que se encontra rodeada pelo líquido cefalorraquidiano (em escuro). Imagem referente à paciente com 56 anos de idade e 10 anos de TSP/HAM.

Vernant *et al* (1996) apresentaram propostas na tentativa de diferenciar as duas patologias, TSP/HAM e esclerose múltipla (EM). Citam o fato de predominarem em regiões distintas, acometendo diferentes grupos étnicos. A maioria das regiões endêmicas para HTLV-I tem apresentado uma baixa prevalência de EM. Entretanto, deve ser notado que a sorologia positiva para HTLV-I pode coexistir em um paciente com EM em uma zona endêmica para aquele vírus. Relatam que anormalidades comumente vistas na EM, como ataxia, distúrbios oculomotores, distúrbios sensitivos e remissões espontâneas inexistem na TSP/HAM.

Ferraz *et al* (1997) relataram presença de lesões na substância branca cerebral em 52% e sinais de atrofia em medula espinhal em 74% dos pacientes com

TSP/HAM. Em nosso estudo, apenas uma paciente de 56 anos de idade e 10 anos de doença apresentou, na RNM cerebral múltipla lesões sugestivas de processo desmielinizante localizada na substância branca fronto-parietal e periventricular, predominantemente subcortical (figura 14). Nessa paciente, os achados de RNM cerebral não estavam relacionados com severidade da incapacidade motora. Um dado observado é que a concentração de neopterina no soro estava dentro da normalidade e levemente aumentada no LCR.

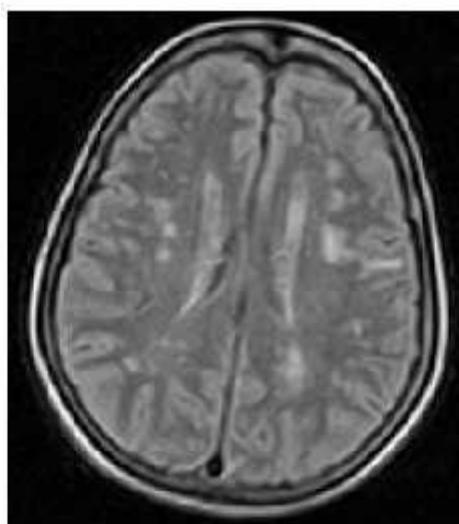


Figura 14 –RNM cerebral com áreas de alteração do sinal T2, sem realce após contraste, localizada na substância branca fronto-parietal e periventricular, predominantemente subcortical. Imagem referente à paciente com TSP/HAM de 56 anos de idade e 10 anos de doença.

Observamos no nosso estudo, que um paciente de 27 anos de idade, apresentou rápida progressão de sua paraparesia espástica em um intervalo de quatro anos, estando confinado à cadeira de rodas (GIM=7). Esta forma de apresentação clínica parece não ser o habitual quando a doença se manifesta em

jovem. Seria interessante avaliar neste paciente em estudo posterior a carga proviral e o HLA.

Segundo Nakagawa *et al* (1995), a idade de início dos sintomas pode influir na velocidade de progressão da doença. Os pacientes com início antes da idade adulta apresentam uma progressão mais lenta em contraposição àqueles com aqueles com início após os 60 anos, cuja evolução é mais rápida.

Existem poucos estudos de necropsias com avaliação neuropatológica de casos de TSP/HAM no mundo, aproximadamente 34 casos descritos (DE CASTRO-COSTA *et al*, 2002).

Iwasaki *et al* (1990), em um estudo de 10 casos necropsiados de TSP/HAM no Japão, delineou três estágios histopatológicos na evolução dos pacientes: 1) de 0 a 3 anos, com predomínio de células inflamatórias além do quadro degenerativo; 2) de 4 a 6 anos, com alterações degenerativas predominando e pequeno número de células inflamatórias; e 3) de 9 a 28 anos, com virtualmente ausência de células inflamatórias.

Wu *et al* (1993) descreveram os achados neuropatológicos de um caso de TSP/HAM de 25 anos de evolução que revelou um leve infiltrado linfocítico perivascular focal na substância branca do lobo temporal, oliva inferior e nas leptomeninges do cerebelo. Havia severa atrofia em toda medula espinhal, com desmielinização do funículo anterior e lateral, principalmente ao nível torácico onde axônios foram perdidos. Nas leptomeninges mostrou densa fibrose e infiltração vascular inflamatória crônica. No parênquima (substância branca), infiltrado inflamatório mononuclear parenquimal e perivascular estavam também presentes. Severa gliose foi visto na substância branca. Esta é uma forma incomum de apresentação de infiltrado inflamatório em paciente com 25 anos de TSP/HAM.

Recentemente, De Castro-Costa *et al* (2002) relataram a análise neuropatológica de dois casos de TSP/HAM de longa duração originários do Brasil. A necropsia do primeiro com 13 anos de evolução, macroscopicamente mostrou um cérebro, tronco cerebral e cerebelo normais; microscopicamente, havia uma leve gliose no cerebelo. A medula espinhal mostrou degeneração difusa da substância branca e cinzenta ao nível cervico-tóraco-lombar. Infiltrado de células mononucleares focais ou perivasculares foram raros, mas presentes, existindo preservação das células do corno anterior da medula espinhal. A necrópsia do segundo caso, com 40 anos de evolução, neuropatologicamente apresentou uma atrofia difusa do cérebro e afilamento da medula tóraco-lombar, infiltrado linfocítico discreto foi visto na meninge e ao redor do vaso parenquimal, além de endurecimento da arteríola do cérebro, cerebelo e medula espinhal, com preservação das células do corno anterior.

De acordo com as descrições acima, somos motivados a aventar a possibilidade de que mesmo com longo tempo de doença poderá ocorrer processo inflamatório no SNC, possibilitando o encontro de concentrações elevadas de neopterinina no LCR, fato verificado em duas pacientes (casos 5 e 11 de TSP/HAM) do nosso estudo com 14 e 16 anos de doença (Tabela 6). Assim, é possível conceber que as concentrações de neopterinina elevadas no LCR são úteis indicadores de atividade inflamatória no SNC (Nomoto *et al*, 1991; Ali *et al*, 1992) em pacientes com TSP/HAM, independentemente do tempo de evolução da doença.

A neopterinina é considerada um marcador indireto da ativação dos linfócitos T e direto da ativação dos macrófagos (HOFFMANN, 2003). É produzida, também, no sistema nervoso central (SNC) pelas células da microglia (BERDOWSKA & KORCZALA, 2001).

Na análise do LCR, encontramos em 40% dos pacientes com TSP/HAM uma leve pleiocitose de predomínio linfomonocitário. A discreta pleiocitose, de predomínio linfomonocitário, pode ser observada no LCR em pacientes com TSP/HAM (OSAMA, 1990). As concentrações de neopterinina no LCR em pacientes com TSP/HAM do nosso estudo não apresentaram correlação com o número de células, assim como com a quantidade de proteínas e glicose no LCR (figuras 10, 11 e 12).

Nossos resultados são semelhantes aos observados por Nomoto *et al* (1991). Esses autores observaram que algumas amostras apresentavam leve pleiocitose, contudo não havia correlação significativa entre contagem de células e os níveis de neopterinina.

Puccioni-Sohler *et al* (1995), que estudaram 20 amostras de LCR de pacientes com TSP/HAM, observaram leve pleiocitose em 30% das amostras. Esses autores não avaliaram as concentrações de neopterinina no LCR.

Oposto ao nosso trabalho, Yoshida *et al* (1999) registraram uma correlação entre concentrações de neopterinina e pleiocitose, assim como com níveis de glicose em 41 amostras de LCR de pacientes com TSP/HAM.

6 – CONCLUSÕES

Houve predominância do sexo feminino tanto no grupo de pacientes com TSP/HAM, quanto no grupo de indivíduos HTLV-I assintomáticos. Corroborando a dados da literatura.

Encontramos diferença nas médias das concentrações de neopterin no soro e LCR entre pacientes com TSP/HAM e indivíduos HTLV-I assintomáticos.

Em pacientes com TSP/HAM, as concentrações de neopterin estavam elevadas em 36% dos casos no soro e em 100% dos casos no LCR.

Em indivíduos HTLV-I assintomáticos, as concentrações de neopterin no soro e LCR apresentaram-se abaixo do limite superior da normalidade.

A média do tempo de doença nos pacientes com TSP/HAM foi de 8 anos e a média do grau de incapacidade motora foi de 4,6 anos. Semelhante aos descritos na literatura.

Em pacientes com TSP/HAM, concentrações de neopterin no soro e LCR não apresentaram correlação com o tempo de doença.

Em pacientes com TSP/HAM, a concentração de neopterin no soro não apresentou correlação com grau de incapacidade motora, porém, apresentou correlação entre concentração de neopterin no LCR e grau de incapacidade motora.

Não encontramos correlação entre concentrações de neopterin e pleiocitose, assim como concentrações de neopterin e quantidade de proteínas e glicose no LCR, em pacientes com TSP/HAM e indivíduos HTLV-I assintomáticos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, Amza; RUDGE, Peter; DALGLEISH, A G., Neopterin concentrations in serum and cerebrospinal fluid in HTLV-I infected individuals. **J Neurol**. London, v.239, p.270-272, 1992.

ANDERSSON, L.M; HAGBERG, D. FUCHS; et al. Increased blood-brain barrier permeability in neuro-asymptomatic HIV-1-infected individuals – correlation with cerebrospinal fluid HIV-1 RNA and neopterin levels. **J NeuroVirol**, Goteborg, v. 7, p 542-547, 2001.

ANDRADA-SERPA, M. J.; TOSWILL, J.; SCHOR, D.; et al. Seroepidemiology survey for antibodies to human retroviruses in human and non-human primates in Brazil. **Int. J. Cancer**, v. 44, p. 389-393, 1989.

ANDRADE FILHO, A. S.; BRITES, C.; SANTOS, S. R. S.; et al. HTLV-I/II as a common etiology of myelopathies in Bahia, Brazil. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 29, p. 757-761, 1996.

ARAUJO, A.Q.C.; AFONSO, C.R; SCHOR, D; et al. Clínical and demographic features of HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in Rio de Janeiro, Brasil, **Acta Neurol Scand** v. 88, p. 59-62, 1993

ARAUJO, A.Q.C; LEITE, A.C.C.B; ANDRADA-SERPRA, M.A. Progression of neurological disability in HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). **J Neurol Sci** v. 129, p.147-151, 1995.

ARAUJO, A.Q.C.; ANDRADA-SERPA, M. Tropical spastic paraparesis/HTLV-I associated myelopathy in Brazil. **J. Acquired Immune Def. Syndr. Hum. Retrovirol.** 13, S33-S37, 1996.

ARAUJO, A.P.C; LÚCIA, M. C. F; PÁDUA, P.A.B; et al. Juvenile Human T lymphotropic vírus Type I associated Myelopathy, **Clin Infect Dis.** v. 15 july, p. 201-204, 2002.

BANGHAM, Charles RM. The immune control and cell-to-cell spread of human T-lymphotropic virus type 1. **J Gen Virol**. London, 2003.

BARMAK, Kate; HARHAJ, Edward; GRANT, Christian; et al. Human T cell leukemia virus type I-induced disease: pathways to cancer and neurodegeneration. **Virology**. V.308, p.1-12, 2003.

BARTHOLOMEW, C; SAXINGER, W.C; CLARK, J. W. et al. Transmission of HTLV-I and HIV among homosexual men in Trinidad. **JAMA**, v. 111, p. 2604-8, 1997.

BERDOWSKA, A; Zwirska-Korczala, K. Neopterin measurement in clinical diagnosis. **J Clin Pharm Ther**. Zabrze, v. 26, p. 319-329, 2001.

BORDUCCHI, DAVIMAR MIRANDA. Antígenos de histocompatibilidade HLA-A, -B, -DR e -DQ em portadores assintomáticos do HTLV-I (vírus linfotrópicos de células T humanas), doentes com L/LTA (linfoma/leucemia de células T do adulto) e HAM/TSP (mielopatia associada ao HTLV-I)., 2000. 75p **Tese** (Doutorado em Medicina) – Curso de Pós-graduação em hematologia, Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, São Paulo.

BRITO-MELO, G. E.A, Perfil fenotípico e funcional dos leucócitos do sangue periférico de indivíduos infectados pelo HTLV-I. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2000.

CARNEIRO-PROIETTI, A. B.; LIMA-MARTINS, M. V.; PASSOS, V. M.; et al. Presence of human immunodeficiency virus (HIV) and T-lymphotropic virus type I and II (HTLV-I/II) in a haemophilic population in Belo Horizonte, Brazil, and correlation with additional serological results. **Haemophilia**, v. 4, n. 1, p. 47-50, 1998.

CARNEIRO-PROIETTI, A. B.; RIBAS, J.G.R; CATALAN-SOARES, B.C; et al. Infecção e doença pelos vírus linfotrópico humanos de células T (HTLV-I/II) no Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop** 35(5): set-out; p.499-508, 2002.

CASTRO, L.H.M; CHAVES, C.J; CALLEGARO, D; et al. HTLV-I associated myelopathy in Brazil: a preliminary report. **Arq Neuropsiquiatr**. V.47, p. 501-502, 1989.

COFFIN, J. M. Retroviridae: the viruses and their replication. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Eds.). **Fields virology**. 3th. ed. Philadelphia: Raven, 1996. v. 2, p. 1767-1847.

DE CASTRO-COSTA, C. M.; GOUBAU, O.; LIU, H. F.; et al. HTLV-negative and HTLV-positive tropical spastic paraparesis in Northeastern Brazil. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, v. 11, p. 315-318, 1995.

DE CASTRO-COSTA, C. M.; SALGUEIRO, M. R.; CARTON, H.; et al Tropical spastic paraparesis in Northeastern Brazil. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 47, p. 134-138, 1989.

DE CASTRO-COSTA, C. M.; VALE, O. C.; GOUBAU, P.; DESMYTER, J.; CARTON, H. HTLV-I and tropical spastic paraparesis in Fortaleza (Northeastern Brazil). **J. Trop. Geogr. Neurol.**, v. 1, p. 45-48, 1991.

DE CASTRO-COSTA, C.M.; DOM, R.; CARTON, H. et al, Neuropathology of two Brazilian autopsied cases of tropical spastic paraparesis/HTLV-I associated myelopathy (TSP/HAM) of long evolution. **Arq Neuropsiquiatr.** V.60(3-A), p. 531-536, 2002.

DELAMARRE, L.; ROSENBERG, A. R.; PIQUE, C.; PHAM, D.; CALLEBAUT, I.; DOKHÉLAR, M. The HTLV-I envelope glycoproteins: structure and functions. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.**, v. 13, p. S85-S91, 1996.

DOTEVALL, L; et al. Cerebrospinal fluid and serum neopterin levels in patients with Lyme Neuroborreliosis. **Infection.** Goteborg, v.18, p. 210-214,1990.

EDLICH, R. F.; ARNETTE, J. A.; WILLIAMS, F. M. Global epidemic of human T-cell lymphotropic virus type-I (HTLV-I). **J. Emerg. Med.**, v. 18, n. 1, p. 109-119, 2000.

FERRAZ, A. C; GABBAI, A. A; ABDALA, N; NOGUEIRA, R.G. Magnétic ressonance in HTLV-I associated myelopath. Leukoencephalopathy and spinal cord atrophy. **Arq Neuropsiquiatr**; 55; 728-736, 1997.

GALVÃO-CASTRO, B.; FERREIRA, O. C. Jr.; FRANCO, L. G. F.; et al. Distribution of HTLV-I among blood donors: a nationwide Brazilian study. **Transfusion**, v. 37, p. 242-243, 1997.

GESSAIN, A.; BARIN, F.; VERNANT, J. C.; et al. Antibodies to human T-lymphotropic virus type I in patients with tropical spastic paraparesis. **Lancet**, v. 2, p. 407-410, 1985.

GESSAIN, A.; GOUT, O. Chronic myelopathy associated with human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I). **Ann. Intern. Med.**, v. 117, p. 933-946, 1992.

GIUSTI, Ruthan M; et al. Differential patterns of serum biomarkers of immune activation in Human T-Cell Lymphotropic Virus Type I-associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis and Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma. **Cancer epidemiol Biomarkers Prev**, Bethesda, v. 5,September, p. 699-703, 1996.

GOON,P.K.C.; HANON,E.; IGAKURA,T.; et al High frequencies of Th1 type CD4+ T-cells specific to HTLV-I Env and Tax proteins in patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP).**Blood**. v.99,p.3335-3341,2002.

GOUT, O; GESSAIN, A; BOLGERT,F; et al. Chronic myelopathy associated with human T-lymphotropic virus type-I: a clinical, serologic, and immunovirologic study of ten patients in France, **Arch Neurol**, v. 46, p. 255-260, 1989.

GOUT,O; BAULAC,M; GESSAIN, A; et al. Rapid development of myelopathy after HTLV-I infection during cardiac transplantation. **N England J Med**, v. 322, p. 283-388, 1990.

GOUT,O; GESSAIN, A; IBA-ZIZEN, M; et al. The effect of zidovudine on chronic myelopathy associated with HTLV-I. **J Neurol** V. 238, P. 108-109, 1991.

HAGBERG, Lars; et al. Cerebrospinal Fluid Neopterin Concentrations in Central Nervous System Infection. **j of Infect Dis**. Goteborg, v.168, November, p.1285-8, 1993.

HANON,Emmanuel; et al. Fratricide among CD8+ T lymphocytes naturally infected with Human T cell Lymphotropic virus Type I. **Immunity**.London, v.13, p. 657-664, 2000.

HASHIMOTO, K; HIGUSHI,I; OSAME, M; et al. Quantitative in situ PCR assay of HTLV-I infected cells in peripheral blood lymphocytes of patients with ATL, HAM/TTSP and asymptomatic carriers. **J Neurol Sci**, v. 159, p. 67-72, 1998.

HINUMA, Y.; KOMODA, H.; CHOSA, T.; K et al. Antibodies to adult T-cell leukemia-virus associated antigen (ATLA) in sera from patients with ATL and controls in Japan: a nationwide seroepidemiologic study. **Int. J. Cancer**, v. 29, p. 631-635, 1982.

HJELLE, B.; APPENZELLER, O.; MILLS, R.; ALEXANDER, S.; TORREZ-MARTINEZ, N.; JAHNKE, R.; ROSS, G. Chronic neurodegenerative disease associated with HTLV-II infection. **Lancet**, v. 339, p. 645-646, 1992.

HOFFMANN,G; WIRLEITNER; FUCHS,D.; Potential role of immune system activation-associated production of neopterin derivatives in humans. **Infamm.res.** Bonn,v.52(8),Aug, p.313-321, 2003.

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

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

ISHAK, Ricardo; et al. HTLV-I associated myelopathy in the northern region of Brazil (Belém-Pará): serological and clinical features of three cases. **Rev Soc Bras Med Trop.** Belém, v. 35(3), mai-jun, p. 243-246, 2002. 18

ISHIDA, T.; YAMAMOTO, K.; OMOTO, K.; IWANAGA, M.; OSATO, T.; HINUMA, Y. Prevalence of a human retrovirus in a native Japanese: evidence for a possible ancient origin. **J. Infect.**, v. 11, p. 153-157, 1985.

IWASAKI, Y. Pathology of chronic myelopathy associated with HTLV-I infection (HAM/TSP), **J Neurol Sci** v.96, p. 103-123, 1990.

JACOBSON,Steven. Immunopathogenesis of human T cell lymphotropic virus type I associated neurologic disease. **J Infect Dis.** Bethesda, v.186,(suppl 2), Dec, p. 187-192, 2002.

JEFFERY, K. J. M.; USUKU, K.; HALL, S. E.; et al. HLA alleles determine human T-lymphotropic virus (HTLV-I) proviral load and the risk of HTLV-I-associated myelopathy. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 86, p. 3848-3853, 1999.

JEFFERY, K.J; SIDDIQUI, A.A; BUNCE, M; et al The influence of HLA class I alleles and heterozygosity on the outcome of human T cell lymphotropic virus type I infection. **J Immunol.** 165(12), p. 7278-84, 2000.

KAJIYAMA, W.; KASHIWAGI, S.; IKEMATSU, H.; et al. Intra-familial transmission of adult T-cell leukemia virus. **J. Infect. Dis.**, v. 154, p. 851-857, 1986.

KALYANARAMAN, V. S.; SARNGADHARAN, M. G.; ROBERT-GUROFF, M. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. **Science**, v. 218, p. 571-573, 1982.

KAPLAN, J. E.; KHABBAZ, R. F.; MURPHY, E. L.; et al. Male to female transmission of human T-cell lymphotropic virus types I and II: association with viral load. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.**, v. 12, p. 193-201, 1996.

KAPLAN, J. E.; OSAME, M.; KUBOTA, H.; et al. The risk of development of HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis among persons infected with HTLV-I. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.**, v. 3, p. 1096-1101, 1990.

KASHIWAGI, S; KAJIYAMA, W; HAYASHI, J; et al. Antibody to p40tax protein of human T-cell leukemia virus 1 and infectivity. **J. Infect. Dis.** V. 161, p. 426-9, 1990

KATAOKA,A; IMAI, H; INAYOSHI,S; et al. Intermittent high-dose vitamin C therapy in patients with HTLV-I associated myelopathy, **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 56, P. 1213-1216, 1993.

KLEINMAN,S; SWANSON, P; ALLAIN, J.P, Transfusion transmission of T-lymphotropic virus type I and II: serologic and polymerase chain reaction results in recipients identified through look-back investigations. **Transfusion**, 33(1): p. 14-18, 1993.

KONDO, Y.; KOMO, H.; NONAKA, H.; et al. Risk of adult T-cell leukemia/lymphoma in HTLV-I carriers. **Lancet**, v. 2, p. 159, 1987.

KURODA, Y; MATSUI, M; YUKITAKE, K.; et al. Assessment of MRI criteria for MS in Japanese MS and HAM/TSP. **Neurology**. V.45, p. 30-33, 1995.

KUBOTA, Ryuji; et al. HTLV-I specific IFN- γ + CD8 + lymphocytes correlate with the proviral load in peripheral blood of infected individuals. **J Neuroimmunol**. Bethesda, v.102, p.208-215, 2000.

KURODA, Y; TAKASHIMA, H; IKEDA, A; et al. Treatment of HTLV-I associated myelopathy with high-dose intravenous gammaglobulin. **J Neurol**, v.238, p. 309-314, 1991.

KUSUHARA, K; SONODA, S; TAKAHASHI, K; et al. Mother-to-child transmission of human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I): Fifteen-year follow-up study in Okinawa, Japan. **Int. J. Cancer**, v. 40, p. 755-7, 1987.

LAICH, A; NEURAUTER, B; WIRLEITNER, B; et al. Degradation of serum neopterin during daylight exposure. **Clin Chim Acta**. Innsbruck, v.322, p.175-178, 2002.

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

LEVINE, P.H; MANNS, A.; Transfusion transmission of human T lymphotropic virus I and II: lessons to be learned from look-back investigations and implications for patient counseling. **Transfusion**. V. 33, p. 4-6, 1993.

LEVY, J.A; HOFFMAN, A.D; KRAMER, S.M; et al. Isolation of lymphocytotropic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. **Science**, v. 225, p. 840-2, 1984.

LEZIN, A; BUART, S; SMADJA, D; et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase 3, matrix metalloproteinase 9, and neopterin in the cerebrospinal fluid: preferential presence in HTLV type I infected neurologic patients versus healthy virus carriers. **AIDS RES HUMAN RETROVIUSES**. Fort de France, v.16(10), p.965-972, 2000.

LANGHORN, F. R; Epidemiologia In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. (Eds.). **Retroviroses humanas - Doenças associadas ao HTLV**. São Paulo: Atheneu, 2000. p. 11-17

LÓPEZ, A. Panero; ESPERT, A. Nogales. Neopterin como marcador de la activación inmune en infecciones víricas y bacterianas. **An esp pediatr**. Madrid, v.45(6), p. 597-602, 1996. 25

MALONEY, E. M.; RAMIREZ, H.; LEVINE, A.; BLATTNER, W. A. A survey of the human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) in South-Western Colombia. *Int. J. Cancer*, v. 44, p. 419-423, 1989.

MALONEY, Elizabeth M; MORGAN, Owen St. Claire; WIDNER, Bernard; et al. Central nervous system activation of the indoleamine-2,3-dioxygenase pathway in human T cell lymphotropic virus type I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Infect Dis.* Bethesda, v.181,p.2037-40, 2000.

MANNS, A.; BLATTNER, W. A. The epidemiology of the human T-cell lymphotropic virus type I and type II: etiologic role in human disease. *Transfusion*, v. 31, p. 67-75, 1991.

MARTINS-CASTRO, L. H.; CHAVES, C. J.; CALLEGARO, D.; et al. HTLV-I associated myelopathy in Brazil: a preliminary report. *Arq. Neuropsiquiatr.*, v. 47, p. 501-502, 1989.

MATSUO,H; NAKAMURA,T; TSUJIHATA,M; et al. Plasmapheresis in treatment of human T-lymphotropic vírus type-I associated myelopathy. *Lancet*, v.2, p. 1109-1113, 1988.

MELO,A; MOURA, L; MEIRELES, A; et al. Danazol: a new perspective in the treatment of HTLV-I associated myelopathy (preliminary report), *Arq Neuropsiquiatr*, v. 50, p. 402-403, 1992.

MELO, A; MOURA, L; RIOS,S; et al. Magnétic resonance imaging in HTLV-I associated myelopathy. *Arq Neuropsiquiatr*. V.51, p. 329-332, 1993.

MELO, A.; GOMES, I.; MATTOS, K. Mielopatias por HTLV-I: uma doença sistêmica. *Arq. Neuropsiquiatr.*, v. 52, p. 443-444, 1994.

MENNA-BARRETO,M;et al. Paraparesia Espástica Tropical (HAM). In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R (Eds.). **Retrovíroses humanas – Doenças associadas ao HTLV**. São Paulo: Atheneu, 2000. p. 71-88.

MILLNER,Michael M.; FRANTHAL, Wolfgang; THALHAMMER, Gabriela H.; et al. Neopterin concentrations in cerebrospinal fluid and serum as an aid in differentiating central nervous

system and peripheral infections in children. **Clinical Chemistry**, Graz, v.44(1), p.161-167, 1998.

MORA, C.A; OSAME, M; JACOBSON,S; Human T-lymphotropic virus Type-I associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis: Therapeutic Approach. **Curr Treat Options Infect Dis**. V.5, p.443-455, 2003

MOREIRA, E. D.; RIBEIRO, T. P.; SWANSON, P.; et al. Seroepidemiology of human T-cell lymphotropic virus type I/II in Northeastern Brazil. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.**, v. 6, p. 959-963, 1993.

MURPHY, E. L.; ENGSTROM, J. W.; MILLER, K.; SACHER, R. A.; BUSCH, M. P.; HOLLINGSWORTH, C. G.; INVESTIGATORS R. HTLV-II associated myelopathy in 43-years-old woman. **Lancet**, v. 341, p. 757-758, 1993.

MURR,C.; WIDNER,B.; WIRLEITNER, B.; FUCHS, D.; Neopterin as a Marker for immune system activation. **Curr Drug Metab**. Innsbruck, v.3, p.175-187, 2002. 30

MURPHY, E. L.; GLYNN, S. A.; FRIDEY, J.; et al, Increased prevalence of infectious diseases and other types T- and II-infected blood donors. Retrovirus Epidemiology Donor Study (REDS) Study Group. **J. Infect. Dis.**, v. 176, p. 1468-1475, 1997.

NAGAI, Masahiro; USUKU,Koichiro; MATSUMOTO, Wataru: et al. Analysis of HTLV-I proviral load in 202 HAM/TSP patients and 243 asymptomatic HTLV-I carriers: high proviral load strongly predisposes to HAM/TSP. **J NeuroViro**. Kagoshima, v.4, p.586-593, 1998.

NAGAI, M.; JACOBSON, Steven; Immunopathogenesis of human T cell lymphotropic virus type I associated myelopathy. **Curr Opinion Neurol**. Bethesda, v.14, p.381-386, 2001.

NAGAI, Masahiro; OSAME, Mitsuhiro. Human T-cell lymphotropic virus type I and neurological diseases. **J NeuroViro**, Kagoshima, v 9 p. 228-235, 2003

NAKAGAWA, M; IZUMO,S; IJISHI,S. et al. HTLV-I associated myelopathy: Analysis of 213 patients based on clinical features and laboratory findings. **NeuroVirology** v.1 p. 50-61, 1995.

NAKAGAWA,M; NAKAHARA KEIICHI; MARUYAMA, Y; et al. Therapeutic trial in 200 patients with HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **J NeuroVirol.** v.2, p.345-355, 1996.

NIEWIESK, S; DAENKE, S; PARKER, C.E; et al. The trnsactivator gene of human T-cell leukemia virus type I is more variable within and between healthy carriers than patients with tropical spastic paraparesis. **J Virol** v. 68, p. 6778-6781, 1994.

NIKKILA, Heikki V.; AHOKAS, Antti; WAHLBECK, Kristian; et al. Neopterin and Macrophage inflammatory protein 1 α in the cerebrospinal fluid of schizophrenic patients: No evidence of intrathecal inflammation. **Neuropsychobiology.** Lahti, v.46,p.169-172,2002.

NOMOTO, Masahiro; UTATSU, Yasuhiko; SOEJIMA, Yasuko; et al. Neopterin in cerebrospinal fluid: A useful marker for diagnosis of HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Neurology.** Kagoshima, v.41, march, p.457, 1991.

OKOCHI, K.; SATO, H.; HINUMA, Y. A retrospective study on transmission of adult T-cell leukemia virus by blood transfusion: seroconversion in recipients. **Vox Sang.**, v. 46, p. 245-253, 1984.

OLIVEIRA, Hélio Araujo; MELO, Hyder Aragão. Mielopatia associada ao HTLV-I/paraparesia espástica tropical. **Arq Neuropsiquiatr.** Sergipe,v.56(1),p. 116-119, 1998.

OSAME, M.; IZUMA, S.; IGATA, A.; MATSUMOTO, M.; MATSUMOTO, T.; SONODA, S.; TARA, M.; SHIBATA, Y. Blood transfusion and HTLV-I associated myelopathy. **Lancet**, v. 2, n. 104-105, 1986.

OSAME, M; Review of WHO Kagoshima Meeting and Diagnostic Guidelines for HAM/TSP. In: Blattner W (ed). **Human Retrovirol: HTLV.** Raven Press. New York, p. 191-197, 1990 a.

OSAME, M; JANSSEN, R; KUBOTA,H; et al. Nationwide survey of HTLV-I associated myelopathy in Japan: association with blood transfusion. **Ann Neurol.** V. 28, p. 50-56, 1990b.

OSAME, M; IGARA,A; MATSUMOTO,M; et al. HTLV-I associated myelopathy (HAM); treatment trials, retrospective survey and clinical and laboratory findings . **Hematol Ver.** V. 3, p. 271-284, 1990 c

OSAME, M; NAKAGAWA,M; UMEHARA, F et al. Recent studies on the epidemiology, clinical features and pathogenic mechanisms of HTLV-I associated myelopathy (HAM/TSP) and other disease associated to HTLV. **J Neurovirol** v. 3(Suppl 1) p. S50-S51, 1997.

PETERS, A. A.; OGER, J. J. F.; COULTHART, M. B.; WATERS, D. J.; CUMMINGE, H. F.; DEKABAN, G. A. An apparent case of human T-cell lymphotropic virus type II (HTLV-II) associated neurological disease: a clinical, molecular, and phylogenetic characterization. **J. Clin. Virol.**, v. 14, p. 37-50, 1999.

POIESZ, B.; RUSCETTI, F.; GAZDAR, A.; BUNN, P.; MINNA, J.; GALLO, R. C. Detection and isolation of type C retroviruses from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 77, p. 7415-7419, 1980.

POMBO DE OLIVEIRA, M. S.; HAMMERSCHLACK, N.; CHIATTONE, C. S.; LOUREIRO, P. HTLV-I infection and adult T-cell leukemia in Brazil: an overview. **São Paulo Med. J.**, v. 114, p. 1177-1185, 1996.

POPOVIC, M; REITZ, M. S; SARNAGADHARAN, M.G; et al. The virus of Japanese adult T-cell leukaemia is a member of the human T cell leukaemia virus group. **Nature** v 300, p. 63-66, 1982.

PUCCIONI-SOHLER, M; KITZE, B; FELGENHAUER, K. HTLV-I associated myelopathy in patients from Brazil and Iran. **Arq Neuropsiquiatr.** 53 (2), p.213-217, 1995.

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

SARIM, S. G.; FANG, C.; WILLIAMS, A. Retroviral infections transmitted by blood transfusion. **Yale J. Biol. Med.**, v. 82, p. 1100-1106, 1990.

SATO,H; OKOCHI, K; Transmission of human T-cell leukemia virus (HTLV-I) by blood transfusion: demonstration of proviral DNA in recipients blood lymphocytes. **Int J Cancer**, v. 37, p. 395-400, 1986

SCHNACH,Harald; MURR, Christian; GACHTER, Elmar; et al. Factors influencing serum neopterin concentrations in a population of blood donors. **Clin Chem**, v.48(4), p. 643-645, 2002.

SEGURADO, A. A. C. HTLV-I: Aspectos virológicos e caracterização de subtipos virais. In: VERONESI, E.; FOCCACIA, R. (Eds.). **Retrovíroses humanas – Doenças associadas ao HTLV**. São Paulo: Atheneu, 2000. p. 3-9.

SHEREMATA,W.A; BENEDICT, D; SQUILACOTE, D. C; et al. High-dose zidovudine induction in HTLV-I associated myelopathy: safety and possible efficacy. **Neurology**, v.43, p .2125-2129, 1993.

SHIRABE, S; NAKAMURA,T; TSUJINO,A; Successful application of pentoxifyline in the treatment of HTLV-I associated myelopathy, **J Neurol Sci**, v. 151, p. 97-101, 1997.

SILVA, E.A, OTSUKI, K; LEITE,A.C et al HTLV-II infection associated with a chronic neurodegenerative disease: clinical and molecular analysis. **J Med Virol** v.66, p.253-257, 2002.

SOARES, B. C. C.; DE CASTRO, M. S. M.; PROIETTI, F. A. Epidemiologia do HTLV-I/II. In: PROIETTI, A. B. F. C. et al (Eds.). **Caderno Hemominas – HTLV-I/HTLV-II**. 3. ed. Belo Horizonte: Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais, 2000. v. 11, p. 53-75.

SPINA-FRANÇA, A; LIVRAMENTO, J.A; MACHADO, L.R; et al. HTLV-I antibodies in serum and cerebrospinal fluid in tropical spastic paraparesis in Brazil. **Arq Neuropsiquiatr**. V. 48, p. 441- 447, 1990.

TAKAHASHI, K; TAKEZARI, T; OKI, T; et al. Inhibitory effect of maternal antibody on mother-to-children transmission of human T-lymphotropic type I, **Int. J. Cancer**, v. 49, p. 673-7, 1991.

TAKAYANAGUI, O.M. Mielopatia Associada ao HTLV-I/ Paraparesia Espástica Tropical (HAM/TSP) In: PROIETTI, A. B. F. C. et al (Eds.). **Caderno Hemominas – HTLV-I/HTLV-II**. 3. ed. Belo Horizonte: Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais, 2000. v. 11, p. 109-129..

TANGY, F. Molecular biology of HTLV-I. In: ZANINOVIC', V. (Ed). **HTLV – Truths and questions**. Cali: Colciencias/Fundación MAR, 1996. p. 1-13.

TUKE, P.W; LUTON,P; GARSON, J.A; Differential diagnosis of HTLV-I and HTLV-II infections by restriction enzyme analysis of nested PCR products. **J Virol Methods**, v.40, p.163-174, 1992.

UCHIYAMA, T; YODOI, Y; SAGAWA, K. Adult T-cell leucemia: clinical and hematological features of cases. **Blood**, 50: 481-92,1977.

USUKU, K; NISHIZAWA,M; MATSUKI, K; et al Association of a particular amino acid sequence of the HLA-DRB1 chain with HTLV-I associated myelopathy. **Eur J Immunol**, v.20, p. 1603-1606, 1990.

USUKU, K; SONODA,S; OSAME,M; et al. HLA haplotype-linked high immune responsiveness against HTLV-I in HTLV-I associated myelopathy: comparison with adult T cell leukemia/lymphoma. **Ann Neurol suppl** v. 23, S143-S150, 1998.

VERNANT, J.C. HTLV-I in: SHAKIR R.A; NEWMAN, P.K; POSER, C.M. Tropical neurology. Saunder. London. UK, p. 19-35, 1996.

VERONESI, R. HTLV no Brasil. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. (Eds.). **Retroviroses humanas - Doenças associadas ao HTLV**. São Paulo: Atheneu, 2000. p. 01-02.

WIKTOR, S.Z; PATE, E.J; MURPHY, E,L; et al. Mother-to-child transmission of human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) in Jamaica: Association with antibodies to envelope glycoprotein (gp46) epitopes. **J. AIDS**. v. 6, p. 1162-7, 1993.

WU, E; DICKSON, D. W; JACOBSON, S; et al. Neuroaxonal dystrophy in HTLV-I associated myelopathy/ tropical spastic paraparesis: neuropathologic and neuroimmunologic correlations. **Acta Neuropathol** v. 86, p. 224-235, 1993.

YAMASAKI,K; KIRA,J; KOYANAGI, Y; et al. Long term, high dose interferon-alfa treatment in HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: a combined clinical, virological and immunological study. **J Neurol Sci** v. 147, p. 135-144, 1997.

YANAGIHARA, R.; JENKINS, C. L.; ALEXANDER, S. S.; et al. Human T-lymphotropic virus type I infection in Papua New Guinea: high prevalence among the Hagahai confirmed by Western analysis. **J. Infect. Dis.**, v. 162, p. 649-654, 1990.

YOSHIDA, M; MIYOSHI,I; HINUMA, Y; Isolation and characterizatin of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. **Proc Nat Acad Sciences USA**, v. 79, p. 2031-2035, 1982.

YOSHIDA,Yoshihiro; UNE,Fumiho; UTATSU,Yasuhiko; et al. Adenosine and Neopterin levels in cerebrospinal fluid of patients with neurological disorders **.Intern Med.** Kagoshima,v.38(2),February, p. 133-139,1999.

ANEXOS

Anexo 1 - Critérios Diagnósticos para TSP/HAM - OMS – 1988 (OSAME, 1990)

I - Critérios clínicos.

Pelo fato de o quadro clínico de paraparesia espástica crônica ser muito florido, quando do primeiro contato com o paciente deve ser lembrado que um único sintoma ou sinal possa ser já uma evidência de uma TSP/HAM em fase inicial.

A. Idade e sexo:

Predomina em adultos, embora existam casos descritos em crianças; pode ser familiar e há um maior número de mulheres acometidas.

B. Início:

Usualmente insidioso, embora possa ser súbito.

C. Principais manifestações neurológicas:

1-Paraparesia espástica crônica, com progressão mais freqüentemente lenta, podendo manter-se estável após uma deterioração inicial.

2-Fraqueza dos membros inferiores, com predomínio proximal.

3-Disfunção vesical (bexiga neurogênica), de precoce aparecimento; constipação, surgindo lentamente; disfunção erétil (impotência) e diminuição de libido comumente observada.

4-Distúrbios sensitivos caracterizados por dormência, formigamento, sensação de queimação e dores (parestesias e disestesias), sendo desproporcionais em relação ao achado físico.

5-Lombalgia isolada ou com irradiação para as pernas.

6-Sensibilidade vibratória (palestesia) mais freqüentemente afetada que a proprioceptiva.

7-Reflexos tendinosos profundos exaltados nos membros inferiores, usualmente com clônus e sinal de Babinski.

8-Hiperreflexia dos membros superiores: sinais de Hoffmann e Troemner freqüentemente positivos; fraqueza pode estar ausente.

9-Reflexo mandibular exaltado em alguns pacientes.

D. Achados neurológicos infreqüentes:

Sinais de disfunção cerebelar, atrofia de nervo óptico, surdez, nistagmo, deficiência em outros nervos cranianos, tremor de extremidades, diminuição ou abolição de reflexo aquileu.

Raramente, convulsões, distúrbios cognitivos, demência, ou distúrbios do nível de consciência.

E. Outros possíveis achados neurológicos:

Atrofia muscular, fasciculações (raro), polimiosite, neuropatia periférica, polirradiculopatia, neuropatia de nervos cranianos, meningite, encefalopatia.

F. Manifestações sistêmicas:

Alveolite linfocitária pulmonar, uveíte, síndrome de Sjögren, artropatia, vasculite, ictiose, crioglobulinemia, gamopatia monoclonal, leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL).

II - Diagnóstico laboratorial:

A. Presença de anticorpos anti-HTLV ou antígenos no sangue e no líquido cefalorraquidiano (LCR)

B. Discreta pleiocitose, de predomínio linfomonocitário, pode ser constatada no LCR.

C. Linfócitos lobulados (*flower cells*) podem ocorrer no sangue e/ou LCR.

D. Aumento de proteínas no LCR, de leve a moderada intensidade.

D. Isolamento viral no sangue e/ou LCR, quando possível.

Observação: Os casos que satisfaçam os critérios clínicos e incompletamente o diagnóstico laboratorial devem ser tratados como problemáticos, necessitando seguimento e estudos complementares.

Anexo 2a -FICHA DE EXAME CLÍNICO

Projeto: “Concentrações de neopterinina no soro e líquido cefalorraquidiano em pacientes com Paraparesia Espástica Tropical/Mielopatia Associada ao HTLV-I (TSP/HAM) e indivíduos HTLV-I assintomáticos em Manaus – Amazonas”.

Data:/...../.....

Número:.....

Nome:..... Sexo: F () M ()

Data de nascimento:/...../.....

Idade:

Local de nascimento:

.UF

Locais onde já residiu: UF.....

Há quanto tempo mora em Manaus ?.....

1. cor: a) branco () b) negro () c) pardo () d) amarelo () e) índio ()

2. Foi amamentado? sim () não ()

3. Atualmente você é?

a) - solteiro

b) - casado

c) - união consensual (vive junto, amigado, amasiado)

d) - separado

e) - divorciado

f) - viúvo

4. Qual é/era a sua ocupação ?

5. Já trabalhou na área de saúde? sim () não ()

6. Alguma vez recebeu transfusão de sangue? sim () não () quando?

7. Usa/usou droga? Sim () não () injetável: sim () não ()

8. Possui tatuagem? sim () não () quanto tempo ?

9. Utiliza ou utilizou acupuntura? sim () não ()

10. Múltiplos parceiros? sim () não () quantos? (em 1 ano)

11. Usa preservativo? sim () não ()

12. Tem comportamento homossexual? sim () não ()

13. Medicamentos em uso:

14. Medicamentos usados:

Anexo 2b - MANIFESTAÇÃO NEUROLÓGICA (TSP/HAM)

15. Idade de início da manifestação neurológica (TSP/HAM).....
16. Tempo de evolução da TSP/HAM em anos: () anos.
17. Modo de início da TSP/HAM. a) súbito () b) insidioso ()
18. Modo de evolução da TSP/HAM a) lentamente () b) rapidamente ()
19. Disfunção vesical: sim () não () precoce () tardio ()
20. Disfunção erétil: sim () não () precoce () tardio ()
21. Distúrbio sensitivo: a) dormência () b) formigamento () c) queimação ()
c) dores () d) câimbra () topografia
22. Lombalgia: sim () não () com irradiação para MID () MIE ()

EXAME NEUROLÓGICO.

23. Fraqueza em MMSS: sim () não () Lado D () E ()
24. Força muscular: 0/5 () 1/5 () 2/5 () 3/5 () 4/5 () 5/5 ()
25. Fraqueza em MMII: sim () não () Lado D () E ()
26. Força muscular: 0/5 () 1/5 () 2/5 () 3/5 () 4/5 () 5/5 ()
27. Grau de Incapacidade Motora.*
Grau: 0 – 1 – 2 – 3 – 4 – 5 – 6 – 7 – 8 – 9 – 10
28. Sensibilidade dolorosa alterada? sim () não () topografia
29. Sensibilidade vibratória alterada? sim () não () topografia
30. Sensibilidade cinético-postural alterada? sim () não () topografia
31. Reflexos profundos : (0, +, ++, +++, +++++)
MSD() MSE () MID () MIE ()
32. Sinal de Babinski: MID () MIE ()
33. Sinal de Hoffmann: MSD () MSE ()
33. Sinal de Tröemmer: MSD () MSE ()
34. Achados neurológicos infrequentes:
a) disfunção cerebelar () b) deficiência de outros nervos cranianos ()
c) tremor de extremidades () d) diminuição ou abolição dos reflexos ()
e) distúrbio cognitivo () f) atrofia muscular ()
g) polirradiculopatia ()

Anexo 3 - *Grau de Incapacidade Motora Revisada de OSAME (NAKAGAWA et al, 1996).

GRAU	INCAPACIDADE
0	Deambula e corre normalmente
1	Marcha normal mas corre lentamente
2	Marcha anormal (vacilante ou espástica)
3	Marcha anormal e incapacidade para correr
4	Necessita de apoio para usar escadas mas deambula sem auxílio
5	Necessita de apoio em uma das mãos para deambular
6	Necessita de apoio nas duas mãos para deambular
7	Incapaz para deambular embora engatinhe
8	Incapaz de engatinhar embora mude de posição no leito
9	Incapaz de mudar a posição no leito embora mova os dedos
10	Completamente restrito ao leito.

Anexo 4a

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
(AMBULATÓRIO ARAÚJO LIMA E HOSPITAL UNIVERSITÁRIO GETÚLIO VARGAS)
E
FUNDAÇÃO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO ESTADO DO AMAZONAS-
HEMOAM

INFORMAÇÕES E CONSENTIMENTOS PÓS-INFORMAÇÃO PARA PESQUISA CIENTÍFICA.

As informações contidas neste prontuário foram fornecidas pelo Dr. Massanobu Takatani, objetivando firmar acordo escrito mediante o qual o voluntário da pesquisa autoriza sua participação, com pleno conhecimento da natureza dos procedimentos e riscos a que se submeterá, com a capacidade de livre arbítrio e sem qualquer coação.

TÍTULO:

“Concentrações de neopterinina no soro e no líquido cefalorraquidiano em indivíduos infectados com vírus linfotrópico humano de células T do tipo I (HTLV-I)”

OBJETIVO:

O estudo tem como objetivo avaliar as concentrações de Neopterinina no soro (sangue) e no líquido cefalorraquidiano (líquido da espinha) em pessoas infectadas pelo vírus HTLV-I com doença neurológica e sem a doença neurológica. A Neopterinina é uma substância que existe normalmente no organismo humano em baixas concentrações, seus valores se elevam no sangue e principalmente no líquido da espinha em pessoas com doença neurológica (inflamação crônica da medula espinhal) causada pelo vírus HTLV-I.

JUSTIFICATIVA:

O HTLV-I é endêmico no Brasil, havendo relato de sua presença em praticamente todas as regiões do país. A pessoa infectada pelo HTLV-I poderá desenvolver doença neurológica crônica e progressiva, com fraqueza muscular em membros inferiores e incapacidade física, conhecida pelo nome de Paraparesia Espástica Tropical / Mielopatia Associada ao HTLV-I (TSP/HAM). A investigação e o estudo desta doença são ainda restritos a poucos centros de pesquisa em nosso país. A ausência de um tratamento comprovadamente eficaz na sua forma instalada de doença neurológica, torna fundamental o estudo e a implantação imediata de prevenção de doença neurológica em nossa Região, pois se trata de um relevante problema de saúde pública. O diagnóstico precoce do processo inflamatório no Sistema Nervoso Central através da análise do líquido do líquidocefalorraquidiano (LCR), permitirá fazer um acompanhamento adequado dos pacientes na sua fase precoce da doença neurológica, melhorando a sua qualidade de vida.

DESCONFORTO ASSOCIADO AO ESTUDO:

Praticamente é inexistente, com exceção dos procedimentos padrões para coleta de sangue e punção lombar. A coleta das amostras não implicará em risco para saúde uma vez que o material utilizado é descartável.

BENEFÍCIOS:

Participando desta pesquisa, o voluntário obterá o benefício de atendimento neurológico especializado, exames complementares laboratoriais: hematológicos, bioquímicos, sorológicos, detecção dos anticorpos anti HTLV-I e a dosagem da concentração de neopterinina no soro e no LCR todos gratuito. Além de estar contribuindo para elucidação do diagnóstico e manejo terapêutico, estará contribuindo ainda para o

Anexo 4b

enriquecimento do conhecimento acerca dos aspectos epidemiológicos e clínicos-patológicos das manifestações neurológicas das pessoas infectadas pelo HTLV-I na nossa Região.

CONFIDENCIALIDADE E AVALIAÇÃO DOS REGISTROS:

A participação do voluntário nesta pesquisa será confidencial, os registros ou resultados dos testes relacionados ao estudo serão mostrados na Universidade Federal do Amazonas bem como às autoridades normativas nacionais e internacionais, com o objetivo de garantir informações de pesquisa clínica ou para fins normativos. A identidade do paciente permanecerá sempre confidencial.

DIREITO À RETIRADA DO ESTUDO:

O voluntário terá direito de fazer qualquer pergunta referente à sua participação neste estudo e será notificado sobre qualquer nova informação relacionada ao estudo e será capaz de contatar Dr. Massanobu Takatani. O número de telefone para contato é

.....
O paciente terá o direito de retirar sua participação neste estudo a qualquer momento, se assim o desejar.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA:

A participação é voluntária. Caso não participe deste estudo, não haverá qualquer perda de benefícios a que tenha direito (por exemplo, informações do trabalho que está sendo realizado). O participante terá direito de manter uma cópia assinada deste documento.

ASPECTO LEGAL:

Elaborado de acordo com as diretrizes e normas que regulamentam pesquisas envolvendo seres humanos, atendendo à Resolução nº 196, de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde / Ministério da Saúde Brasília-DF.

LOCAL DA PESQUISA:

A pesquisa será realizada no Ambulatório Araújo Lima / Hospital Universitário Getúlio Vargas (HUGV) da Universidade Federal do Amazonas e na Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Estado do Amazonas – FHMOAM.

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO:

E, por estar devidamente informado e esclarecido sobre o conteúdo deste termo, livremente expresse meu consentimento para minha inclusão, como sujeito, neste estudo. Manaus-AM,dede 200.....

Nome do participante (por extenso)

Assinatura do participante

(Dr. Massanobu Takatani CRM 2334 - responsável pelo estudo)

Anexo 4c

Termo de consentimento livre e esclarecido (Conforme CNS, Resolução 196 de 10/10/96) (PUCCIONI-SOHLER *et al*, 2002).

Nome do Paciente:

RG:

Declaro que o Dr Massanobu Takatani CRM 2334-AM

Explicou-me claramente o que se segue

1. O exame do líquido da espinha (líquido cefalorraquidiano) é importante método auxiliar para o diagnóstico de doença do sistema nervoso.
1. Sei que o líquido cefalorraquidiano é colhido habitualmente nas costas, através de punção lombar ou, excepcionalmente, no pescoço, através de punção suboccipital, dependendo da suspeita clínica ou da indicação médica.
2. A dor que acompanha a punção lombar ou a punção suboccipital é semelhante àquela da coleta do exame de sangue.
3. Após submeter-se a punção lombar deverei permanecer em REPOUSO por alguma hora e beber muito líquido. Aproximadamente 10% das pessoas, mesmo com esse cuidado, poderão sentir dor de cabeça. Essa dor pode ser forte, acontece ao levantar e melhora ao deitar. Se eu tiver essa dor de cabeça, e somente se tiver essa dor, deverei ficar em repouso absoluto por 48 horas seguidas, deitado (a), de preferência na posição de barriga para baixo, tomando muita água e outras bebidas hidratantes. Não deverei tentar levantar antes de completa às 48 horas, caso contrário a dor de cabeça poderá voltar. Se a dor de cabeça voltar, é necessário ficar novamente em repouso nas 48 horas que se seguem, como se a punção tivesse sido feita naquele momento. Em casos muitos raros, a dor de cabeça pode prolongar-se por um período maior, de 04 a 07 dias após a punção, impossibilitando a realização das atividades habituais, pessoais e profissionais.
4. Após a coleta do líquido cefalorraquidiano na região lombar, podem ocorrer, além da dor de cabeça, dormência passageira nas pernas, dor local da punção e, excepcionalmente, infecção. São descritas, raramente, nos casos de punção no pescoço, complicações com dano neurológico tais como: lesão do centro respiratório, cardíaco, hemorragia no espaço subaracnóide.
5. Entretanto, a incidência dessas complicações é muito pequena, ocorrendo em raríssimas ocasiões.
6. Havendo qualquer dúvidas, receberei dos médicos esclarecimentos ou outras informações sobre os benefícios e riscos que podem surgir no decorrer do exame.

Localidade,.....

Autorizo o Dr. Massnobu Takatani CRM 2334 a realizar em mim a coleta do líquido da espinha.....

Assinatura do () paciente ou () seu responsável.

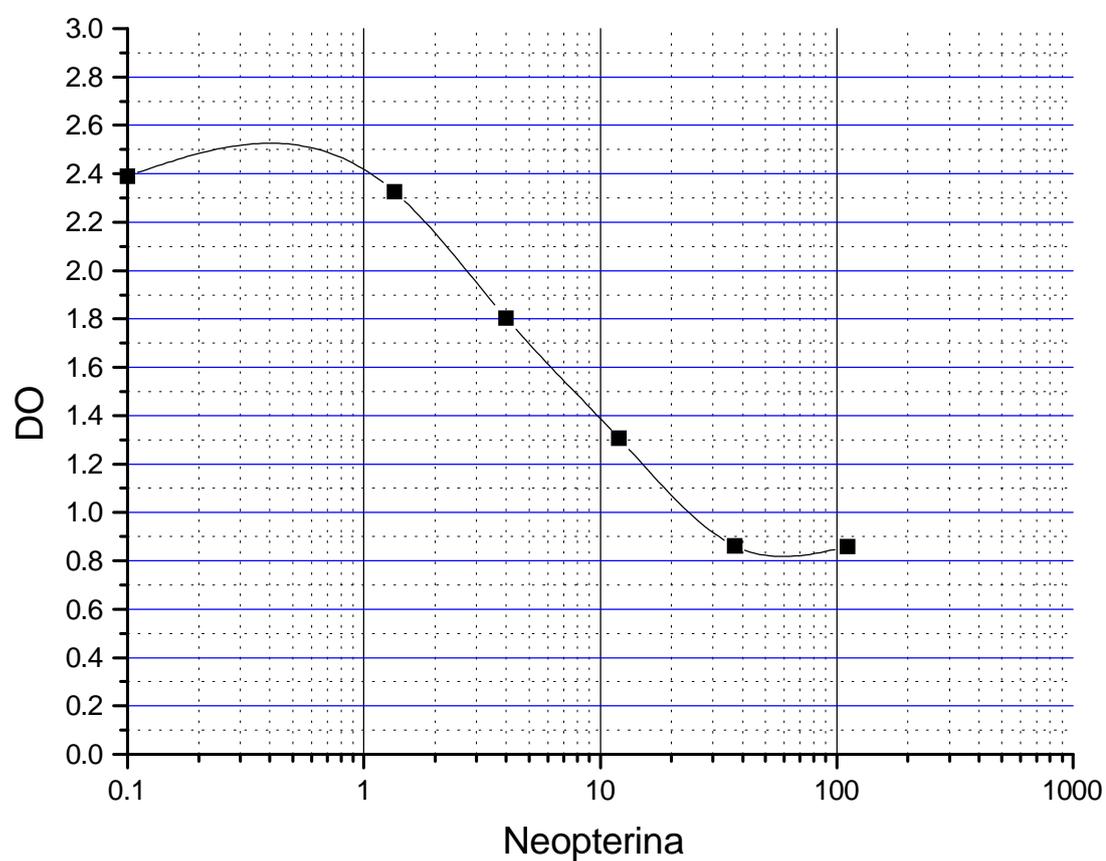
Anexo 4d

Recomendações aos pacientes que se submetem à punção lombar.

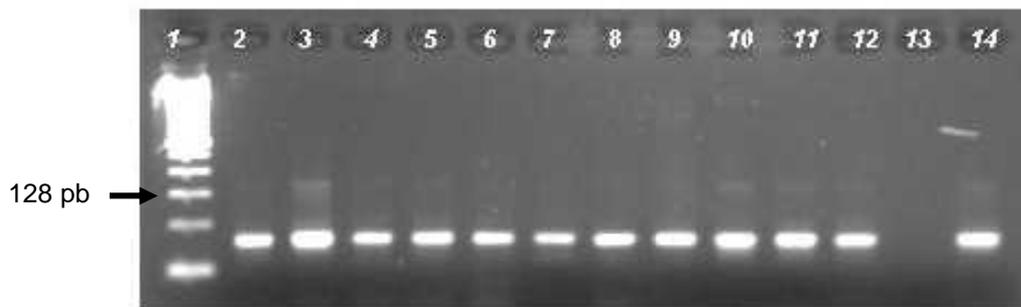
1. permanecer em REPOUSO relativo por algumas horas após a punção, de preferência deitado, e beber muito líquido;
2. mais de 90% dos pacientes não apresentam qualquer problema após a punção. Estes pacientes podem e devem levar vida normal após o repouso de algumas horas;
3. entretanto, até 10% das pessoas poderão sentir dor de cabeça ao ficar em pé, após o repouso inicial de algumas horas. É difícil prever quais os pacientes que vão sentir essa dor de cabeça, com exceção das crianças até 12 anos e das pessoas com mais de 60 anos, que dificilmente apresentam esse tipo de dor.
4. o paciente que tiver essa dor de cabeça, e somente o paciente que tiver essa dor:
 - (a) deverá ficar em repouso absoluto por 48 horas seguidas, deitado (a) de preferência na posição de barriga para baixo, tomando muita água e outras bebidas hidratantes, em especial aquelas com cafeína (café, coca-cola, etc.);
 - (b) não deverá tentar levantar antes de completar as 48 horas, caso contrário a dor poderá voltar;
 - (c) é recomendável o uso de cinta abdominal, especialmente em mulheres magras;
 - (d) as refeições devem ser tomadas na posição deitada, de lado ou de bruços;
 - (e) poderá ir ao banheiro rapidamente para as necessidades fisiológicas. Para isso deve haver o cuidado de levantar lentamente, permanecer sentado por alguns minutos e, somente depois disso, levantar, também lentamente. O tempo gasto deve ser o mínimo possível;
 - (f) se a dor de cabeça voltar, é necessário ficar novamente em repouso durante 48 horas que se seguem, como se a punção tivesse sido feita naquele momento;
 - (g) em casos muito raros, a dor de cabeça pode prolongar-se por um período maior, de 04 a 07 dias após a punção, impossibilitando a realização das atividades, pessoais e profissionais;
 - (h) especialmente nesses casos, mas também sempre que sentir necessidade de qualquer esclarecimento, o (a) paciente deverá entrar em contato com um dos médicos deste Laboratório.

Anexo 5

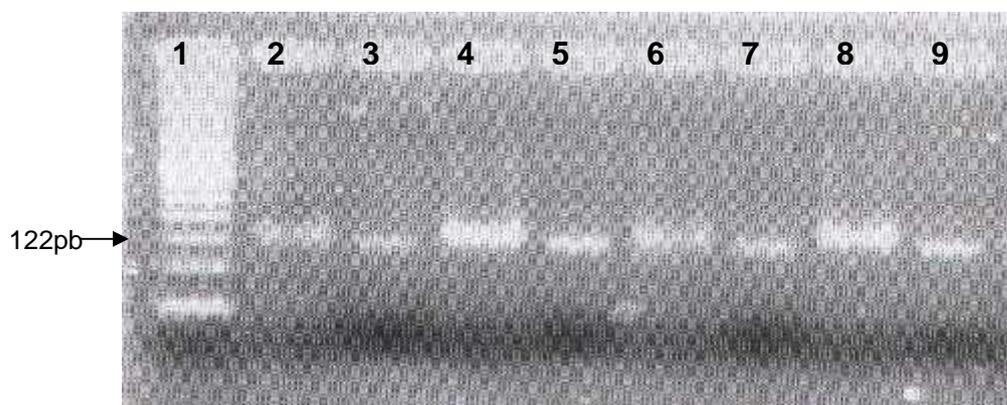
Modelo de uma curva obtida com os padrões das concentrações de neopterina em um dos testes realizados. (*IBL neopterin enzyme immunoassay kit, IBL-Hamburg, Germany*). Neste gráfico foram plotados os valores de densidade óptica (DO) encontrados nas nossas amostras.



ANEXO 6



Produtos de amplificação do DNA dos pacientes com TSP/HAM em eletroforese de gel de agarose a 2,0%, corado com brometo de etídeo. O número 1 representa o marcador de peso molecular (*Ladder* 100pb), os números de 2 a 12 as amostras positivas para o DNA viral a partir dos *primers* SK-44A e SK-44B, e os números 13 e 14 os controles negativo e positivo respectivamente



Produtos obtidos após a digestão pela enzima de restrição *TAQ 1* e analisados através de eletroforese em gel de agarose a 2,0% corado com brometo de etídeo. O número 1 representa o marcador de peso molecular (*Ladder* 50 pb), os números 2,4,6,8 as amostras não digeridas (128pb) e os números 3,5,7e9 as amostras digeridas (HTLV-I com 122pb).