DANIELA ASSIS DO VALE

**Detecção de proteínas e partículas virais do HTLV-1 em glândulas salivares de
pacientes com Síndrome de Sjögren e de infectados pelo HTLV-1**

São Paulo

2017

DANIELA ASSIS DO VALE

**Detecção de proteínas e partículas virais do HTLV-1 em glândulas salivares de
pacientes com Síndrome de Sjögren e de infectados pelo HTLV-1**

Versão Original

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas.

Área de Concentração: Patologia Oral e Maxilofacial e Pacientes Especiais

Orientador: Profa. Dra. Karem López Ortega

São Paulo

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Vale, Daniela Assis do.

Detecção de proteínas e partículas virais do HTLV-1 em glândulas salivares de pacientes com Síndrome de Sjögren e de infectados pelo HTLV-1 / Daniela Assis do Vale ; orientador Karem López Ortega. -- São Paulo, 2017.

108 p. : fig., tab.; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Patologia Oral e Maxilofacial e Pacientes Especiais. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão original

1. Síndrome de Sjögren. 2. Xerostomia. 3. Síndrome seca. I. Ortega, Karem López. II. Título.

Vale DA. Detecção de proteínas e partículas virais do HTLV-1 em glândulas salivares de pacientes com Síndrome de Sjögren e de infectados pelo HTLV-. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: / /2017

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Jorge e Ester, pela dedicação, pelo amor incondicional e por me fazerem quem sou.

Ao meu pai, pelo apoio em todos os meus melhores e piores momentos.

À minha mãe (*in memoriam*) por me ensinar que não há impedimentos para a realização dos nossos sonhos, perseverança, dedicação e o constante aprendizado são os que nos levam longe.

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Karem López Ortega, por estar do meu lado desde o início desta estrada que decidi trilhar, me ensinar os primeiros passos e mesmo quando chegou a hora de começar a caminhar sozinha estar lá para me amparar. Muito obrigada por toda a orientação, na tese e na vida!

A Profa. Dra. Marília Trierveiler Martins, por todos os ensinamentos, por estar disposta a desenvolver novas ideias e me ajudar nas divagações sobre este projeto e consequentemente desenvolvê-lo. Muito obrigada pela ajuda e pela paciência.

Ao Prof. Dr. Jorge Casseb que sempre me recebeu de braços abertos, seja no ambulatório de HTLV ou no IMT. Todos os “obrigadas” foram poucos pelo imenso aprendizado e apoio que obtive.

Aos demais professores da disciplina de Patologia Oral e Maxilofacial por toda a ajuda e todo o aprendizado.

À equipe do departamento de Otorrinolaringologia da Santa Casa de São Paulo, em especial Prof. Dr. Ivo Bussoloti Filho, Profa. Dra. Bianca Liquidato, Profa. Dra. Ana Cristina Kfoury Camargo, Profa. Dra. Rita Soler. Obrigada por terem me acolhido tão bem, este trabalho teve início aí e espero que esta parceria se mantenha, como todo o aprendizado que tive com vocês, para a vida.

A todos os colegas e funcionários do CAPE, pela companhia e torcida. Meus dias sempre são mais alegres quando estou por aí!

Aos colegas de pós-graduação, funcionários e técnicos da disciplina de Patologia Oral e Maxilofacial, obrigada a todos pelo auxílio!

Aos pacientes que tão gentilmente contribuíram para a realização deste estudo.

“E assim, depois de muito esperar, num dia como outro qualquer, decidi triunfar...

Decidi não esperar as oportunidades e sim, eu mesmo buscá-las.
Decidi ver cada problema como uma oportunidade de encontrar uma solução.
Decidi ver cada deserto como uma possibilidade de encontrar um oásis.
Decidi ver cada noite como um mistério a resolver.
Decidi ver cada dia como uma nova oportunidade de ser feliz.

Naquele dia,
descobri que meu único rival não era mais que minhas próprias limitações
e que enfrentá-las era a única e melhor forma de as superar.

Naquele dia,
descobri que eu não era o melhor e que talvez eu nunca tenha sido.

Deixei de me importar com quem ganha ou perde,
agora, me importa simplesmente saber melhor o que fazer.
Aprendi que o difícil não é chegar lá em cima, e sim deixar de subir.

Aprendi que o melhor triunfo que posso ter,
é ter o direito de chamar a alguém de “Amigo”.
Descobri que o amor é mais que um simples estado de enamoramento,
“o amor é uma filosofia de vida”.

Naquele dia,
deixei de ser um reflexo dos meus escassos triunfos passados
e passei a ser a minha própria tênue luz deste presente.
Aprendi que de nada serve ser luz se não vai iluminar o caminho dos demais.

Naquele dia,
decidi trocar tantas coisas...

Naquele dia,
aprendi que os sonhos são somente para fazer-se realidade.

E desde aquele dia já não durmo para descansar...
Agora simplesmente durmo para sonhar.”

Walt Disney

RESUMO

Vale DA. Detecção de proteínas e partículas virais do HTLV-1 em glândulas salivares de pacientes com Síndrome de Sjögren e de infectados pelo HTLV-1 [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2017. Versão original.

O HTLV-1 (human T-cell lymphotropic virus type 1) foi o primeiro retrovírus humano a ser identificado. O HTLV-1 tem a capacidade de ativar e gerar uma intensa resposta inflamatória, podendo levar a alterações em diversos tecidos que mimetizam uma doença autoimune. Do complexo de doenças associadas ao HTLV-1, a Síndrome de Sjögren (SS) figura entre as mais estudadas. No entanto, nenhuma relação definitiva foi ainda estabelecida. Este trabalho propõe-se a investigar indícios da presença do HTLV-1 em glândulas salivares menores de pacientes infectados por esse retrovírus e comparar as alterações morfológicas em glândulas salivares menores de pacientes com HTLV-1 e de pacientes com SS não infectados. Amostras de glândula salivar menor foram coletadas de 14 pacientes HTLV+ que apresentavam síndrome seca (grupo de estudo) e 5 pacientes diagnosticados com SS e negativos para o HTLV (grupo controle). No grupo de estudo, o infiltrado inflamatório visto era composto principalmente por linfócitos T CD4+, no grupo controle a população majoritária foi de linfócitos B CD20+. Alterações morfológicas como fibrose e infiltração gordurosa foram mais comumente vistas nas amostras do grupo de estudo, sendo a diferença estatisticamente significativa ($p=0,038$ e $0,033$ respectivamente). Na análise por PCR 11 (78,57%) dos casos do grupo de estudo foi detectado o gene *tax* e/ou *rex* do HTLV-1, no entanto 4 (80%) das amostras do grupo controle também foram positivas. O HTLV-1 mostra indícios de estar presente nas glândulas salivares de indivíduos com síndrome seca, no entanto pacientes HTLV-1+ apresentam alterações morfológicas em padrões diferentes dos vistos em pacientes com SS, denotando uma provável diferença no processo de ativação imunológica.

Palavras-chave: HTLV. HAM/TSP. Síndrome de Sjögren. Xerostomia. Síndrome seca.

ABSTRACT

Vale DA. Detection of HTLV-1 viral proteins and particles in the salivary glands of patients with Sjögren's Syndrome and patients infected with HTLV-1 [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2017. Versão original.

Human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-1) was the first human retrovirus to be discovered. HTLV-1 has the ability to activate and generate an intense inflammatory response, which can lead to changes in several tissues that mimic an autoimmune disease. Of the complex of diseases associated with HTLV-1, Sjögren's Syndrome (SS) is among the most studied. The aim of this study is to investigate the presence of HTLV-1 in the minor salivary glands of patients infected with this retrovirus and to compare the morphological alterations in the salivary glands of patients with HTLV-1 and patients with SS uninfected. Minor salivary gland samples were obtained from 14 HTLV + patients with dry syndrome (study group) and 5 patients diagnosed with SS and HTLV negative (control group). In the study group, the inflammatory infiltrate was mainly composed of CD4+ T lymphocytes, in the control group the majority population was of CD20+ B lymphocytes. Morphological changes such as fibrosis and adipose tissue infiltration were more common in the study group, the difference was statistically significant ($p = 0.038$ and 0.033 , respectively). The HTLV-1 *tax* and/or *rex* genes were detected by PCR in 11 (78.57%) patients of the study group, but 4 (80%) samples from the control group were also positive. HTLV-1 shows signs of being present in the salivary glands of individuals with dry syndrome however, HTLV-1+ patients present morphological alterations in different patterns from those observed in SS patients, denoting a probable difference in the immunological activation process.

Keywords: HTLV. HAM/TSP. Sjogren's Syndrome. Xerostomia. Sicca syndrome

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Estimativa mundial do número de infectados pelo HTLV-1	26
Figura 2.2 – Prevalência do HTLV-1/2 em doadores de sangue no Brasil	27
Figura 2.3 – Esquematização do genoma viral do HTLV-1	28
Figura 2.4 – Sequência hipotética de eventos da patogênese das doenças inflamatórias associadas ao HTLV-1	33
Figura 5.1 – Positividade para linfócitos T CD4+ (400X).....	67
Figura 5.2 – Positividade para linfócitos T CD8+ (400X).....	69
Figura 5.3 – Positividade para linfócitos B CD20+ (400X).....	71
Figura 5.4 – Positividade para a Tax do HTLV-1 (400X).....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 – Sinais e sintomas característicos da SS em pacientes diagnosticados com a doença.....	53
Tabela 5.2 – Contagem das células positivas para os anticorpos pesquisados de amostras de glândulas salivares menores de pacientes com SS e HTLV-1 negativos.....	54
Tabela 5.3 – Alterações morfológicas evidenciadas nas glândulas salivares de pacientes com SS e HTLV-1 negativos.....	54
Tabela 5.4 – Resultado da carga pró-viral (n=12)	55
Tabela 5.5 – Fluxo salivar medido através da técnica da sialometria de pacientes HTLV-1 positivos e com queixas relacionadas à SS (n=14)	56
Tabela 5.6 – Contagem das células positivas para os anticorpos pesquisados de amostras de glândulas salivares menores de pacientes HTLV-1 positivos (n=14).....	56
Tabela 5.7 – Alterações morfológicas evidenciadas nas glândulas salivares de pacientes HTLV-1 positivos (n=14)	56
Tabela 5.8 – Análise correlacional entre a expressão de marcadores linfocitários e da proteína Tax com as alterações inflamatórias e morfológicas vistas em glândula salivar menor (n=14).....	59
Tabela 5.9 – Correlação dos valores de linfoproliferação com os parâmetros imuno-histoquímicos (n=14).....	61
Tabela 5.10 – Correlação dos valores de linfoproliferação com as alterações histológicas (n=14).....	61

Tabela 5.11 – Correlação entre os padrões imuno-histoquímicos e a presença da sequencia tax e/ou rex nas amostras de glândula salivar menor (n=14)	62
Tabela 5.12 – Sinais e sintomas característicos da SS apresentados por pacientes dos dois grupos (n=19)	63
Tabela 5.13 – Análise correlacional entre os dois grupos a respeito da quantificação de diferentes subtipos de células linfocitárias (n=19)	63
Tabela 5.14 – Comparação do padrão inflamatório e das alterações morfológicas entre os grupos (n=19)	64
Tabela 5.15 – Distribuição do Qui-quadrado para a prevalência das diferenças histológicas entre os grupos (n=19).....	65
Tabela 5.16 – Relação das diferenças dos padrões imunológicos entre os grupos (n=19)	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HTLV	vírus T linfotrópico humano do inglês human T-cell lymphotropic virus
ATLL	leucemia/linfoma de células T
HAM/TSP	paraparesia espástica tropical ou mielopatia associada ao HTLV
DNA	ácido desoxirribonucleico
SS	síndrome de Sjogren
HBZ	HTLV-1 basic leucine zipper factor
EBV	Epstein Barr vírus
HCV	vírus da hepatite C
HIV	vírus da imunodeficiência humana
PCR	reação em cadeia de polimerase
GC	grupo controle
GE	grupo estudo
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
IIER	Instituto de Infectologia Emílio Ribas
ISCMSP	Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo
LIM-56	Laboratório de Investigação Médica em Dermatologia e Imunodeficiências
SICCA	Sjogren's International Collaborative Clinical Alliance
OD	odds ratio
LTR	long terminal repeat
HERV	retrovírus humano endógeno
HRES	sequencia endógena relacionada ao HTLV

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO DA LITERATURA	25
2.1 HTLV-1	25
2.1.1 Aspectos gerais	25
2.1.2 Organização genômica	28
2.1.3 Doenças associadas	29
2.1.4 Patogênese da HAM/TSP	31
2.2 Síndrome de Sjögren	34
2.2.1 Aspectos gerais	34
2.2.2 Etiopatogênese	35
2.3 HTLV-1 e SS	36
3 PROPOSIÇÃO	41
4 CASUÍSTICA – MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 Desenho da pesquisa	43
4.2 Casuística	43
4.2.1 Detalhamento dos grupos	44
4.2.1.1 Grupo controle (GC)	44
4.2.1.2 Grupo de estudo (GE)	45
4.2.2 Cálculo amostral	46
4.3 Material e métodos	46
4.3.1 Análise morfológica	46
4.3.2 Técnica da imuno-histoquímica	48
4.3.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	49
4.4 Análise estatística	51
5 RESULTADOS	53
5.1 Avaliação descritiva dos grupos estudados	53
5.1.1 Grupo controle (GC) – SS	53
5.1.2 Grupo de estudo (GE) – HTLV-1+	55
5.2 Análise correlacional do GE	57
5.3 Comparação entre GC e GE	62
6 DISCUSSÃO	75

7 CONCLUSÕES	85
REFERÊNCIAS	87
ANEXOS.....	99

1 INTRODUÇÃO

Isolado em 1980, o HTLV-1 (human T-cell lymphotropic virus type 1) foi o primeiro retrovírus humano a ser identificado (Poiesz et al., 1980). Comprovadamente o HTLV-1 é o agente etiológico da leucemia/linfoma de células T no adulto (ATLL) e de uma doença neurológica degenerativa conhecida como paraparesia espástica tropical ou mielopatia associada ao HTLV (HAM/TSP) (Poiesz et al., 1980; Popovic et al., 1982). Tendo seu potencial patogênico já comprovado e sendo o mais prevalente, o tipo 1 tem sido alvo de diversos estudos para se determinar a associação deste a diversas alterações inflamatórias e degenerativas que acometem os indivíduos infectados.

Embora o HTLV-1 possa permanecer latente no organismo durante vários anos, de fato a maioria dos infectados se mantêm assintomáticos, somente entre 1 a 5% desenvolverão alguma manifestação (Kaplan et al., 1990). O HTLV-1 é capaz de se integrar ao DNA (ácido desoxirribonucleico) das células do hospedeiro, mais especificamente de linfócitos T CD4+, que infectados ocasionarão a ativação de linfócitos T CD8+ liberando assim diversas citocinas responsáveis pela destruição das células infectadas e consequentemente do tecido adjacente. Essa resposta imunológica causa o dano tecidual observado predominantemente na medula espinhal, responsável pela HAM/TSP (Bangham; Osame, 2005). Porém, à medida que mais estudos são realizados nesse campo, mais se acredita que essa ativação imunológica possa ser apontada como a responsável pela série de manifestações inflamatórias descritas em indivíduos infectados por essa retrovirose como a uveíte, polimiosite, artropatias, pneumopatias e a síndrome de Sjögren (SS). Contudo, a comunidade científica ainda carece de provas definitivas da associação dessas doenças com o HTLV-1.

A SS é uma exocrinopatia de origem autoimune que afeta particularmente as glândulas salivares e lacrimais causando variados graus de xerostomia, hipossalivação e queratoconjuntivite seca (Liquidato et al., 2002; Vitali et al., 2002). Embora grades avanços tenham sido feitos para se explicar a patogênese dessa doença sua etiologia continua incerta, de provável caráter multifatorial diversos vírus,

sendo endógenos ou exógenos, têm sido levantados como possíveis fatores contribuintes ou mesmo desencadeadores dessa condição (Mavragani; Moutsopoulos, 2010; Vitali, 2011).

Dentre as doenças de caráter inflamatório possivelmente associadas ao HTLV-1, a SS talvez figure entre as mais controversas. Essa relação foi primeiramente sugerida graças a estudos que evidenciaram maior prevalência da SS em infectados pelo HTLV-1 e acometidos pela HAM/TSP (Vernant et al., 1988; Eguchi et al., 1992; Terada et al., 1994). À medida que mais pesquisadores objetivavam um aprofundamento sobre o papel do vírus na resposta inflamatória vista nas glândulas salivares mais resultados conflitantes eram publicados na literatura. Em último trabalho publicado, viu-se que apesar da xerostomia ser uma queixa constante nos pacientes infectados pelo HTLV-1, independente do uso de medicamentos ou hábitos nocivos, outras características necessárias para o diagnóstico da SS, como a presença de auto anticorpos, não estavam presentes nesses pacientes (Vale et al., 2017).

Mesmo com resultados conflitantes acerca das alterações exócrinas vistas nos pacientes com HTLV-1 representar ou não um quadro de SS verdadeiro parece não haver dúvidas de que de fato existe um comprometimento glandular de natureza inflamatória acometendo esses indivíduos. A questão se esse comprometimento mimetiza, nos seus aspectos morfológicos e imunológicos, o observado em glândulas salivares de pacientes com SS e soronegativos para o HTLV-1 ainda está para ser respondida.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 HTLV

2.1.1 Aspectos gerais

Descrito em 1980, o HTLV-1 (human T-cell lymphotropic virus type 1) foi o primeiro retrovírus humano a ser identificado (Poiesz et al., 1980). Sua denominação deve-se ao fato desse vírus ter sido isolado a partir de uma linhagem de linfócitos T CD4+ provenientes de um paciente com linfoma de células T cutâneo (Poiesz et al., 1980). A partir dessa descoberta o potencial oncogênico do HTLV-1 foi rapidamente comprovado e a neoplasia maligna hematopoiética causada pelo vírus recebeu o nome de linfoma ou leucemia de células T do adulto (ATLL). Poucos anos depois, durante um estudo epidemiológico conduzido na região caribenha notou-se a presença desse retrovírus em pacientes que apresentavam uma neuromielopatia crônica denominada paraparesia espástica tropical (Gessain et al., 1985; Gessain; Gout, 1992). Paralelamente no Japão, uma doença neurológica similar vista em infectados pelo HTLV-1 foi descrita e denominada mielopatia associada ao HTLV-1 (Osame et al., 1986). Logo verificou-se tratar da mesma doença, hoje designada como mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP) (Roman; Osame, 1988).

Logo após a descoberta do HTLV-1 um segundo retrovírus contendo uma estrutura genômica 70% homóloga foi descrito e denominado de HTLV-2 (Kalyanaraman et al., 1982). Ao longo dos anos outros subtipos, como o HTLV-3 e o HTLV-4, foram identificados em regiões remotas (Wolfe et al., 2005). No entanto, até hoje, somente o potencial patogênico do HTLV do tipo 1 foi comprovado e sendo também o tipo mais prevalente, o HTLV-1 tem sido alvo da maior parte das investigações desenvolvidas sobre esse tema (Araujo; Hall, 2004; Feuer; Green, 2005).

O HTLV-1 encontra-se disseminado ao longo do globo exibindo picos de incidência em certas regiões como Japão, Caribe, América do Sul, África subsaariana e oriente médio, marcadamente o Irã (Figura 2.1) (Gessain; Cassar, 2012). No entanto, a verdadeira proporção da epidemia ainda é desconhecida. A última publicação abordando o assunto, realizada em 2012 levantando os mais diversos estudos epidemiológicos regionais, estimou que aproximadamente 5 a 10 milhões de pessoas estejam infectadas pelo HTLV-1, embora os próprios autores reconheçam que o número real de infectados deva ser muito maior (Gessain; Cassar, 2012).

Figura 2.1 – Estimativa mundial do número de infectados pelo HTLV-1 (Gessain; Cassar, 2012)

No Brasil, estudos epidemiológicos conduzidos principalmente em bancos de sangue detectaram a presença do vírus em todos os estados da federação, ocorrendo em maior ou menor escala, com uma variação de 0,04 à 1%, dependendo da região geográfica. Segundo último estudo realizado em bancos de sangue das capitais brasileiras, a cidade de São Paulo conta com uma prevalência de 0,32% de infectados entre a sua população (Figura 2.2) (Catalan-Soares et al., 2005).

Figura 2.2 – Prevalência do HTLV-1/2 em doadores de sangue no Brasil (Catalan-Soares et al., 2005)

A propagação do HTLV pode ocorrer através das três vias clássicas: vertical, parenteral e sexual. Atualmente, o aleitamento materno prolongado representa a principal via de disseminação, porém a transmissão durante a gestação ou durante o parto também podem ocorrer. O contágio sexual ocorre principalmente, mas não exclusivamente do homem para a mulher. A transmissão pelo uso compartilhado de agulhas e seringas também é possível, já a transmissão sanguínea ou de hemoderivados, embora seja a via de contaminação mais efetiva, teve seu risco reduzido graças a testes de triagem para o HTLV, obrigatórios desde 1993 para todo sangue doado em território brasileiro (Lopes; Proietti, 2008).

2.1.2 Organização genômica

Em sua estrutura genômica, composta por duas fitas simples de RNA (ácido ribonucleico), o HTLV-1, da família Retroviridae, subfamília Orthoretrovirinae, possui em comum com outros retrovírus os genes *gag*, *pol* e *env*, responsáveis pela codificação de proteínas estruturais e enzimáticas (Seiki et al., 1983; Delamarre et al., 1996).

Adicionalmente, o genoma do HTLV-1 compreende uma região chamada de “região X” onde se encontram genes regulatórios denominados *tax*, *rex* e *HBZ* (Figura 2.3).

Figura 2.3 – Esquematização do genoma viral do HTLV-1 (adaptado de: (Curren et al., 2012))

A proteína codificada pelo gene *rex*, chamada p27^{rex} (Rex), atua na fase pós-transcricional regulando a expressão dos genes virais. Essa proteína realiza o transporte do RNA viral, facilitando a saída do núcleo para o citoplasma de genes que codificam as proteínas Gag, Pol e Env e ocasionando assim o aumento da expressão das proteínas virais.

Já a regulação da transcrição do genoma viral fica a cargo da proteína p40^{tax} (Tax), também envolvida na transformação celular. Foi demonstrado *in vivo* o potencial oncogênico da proteína Tax e *in vitro* sua capacidade de imortalizar linfócitos, o que a tem tornado alvo de diversos estudos envolvendo a patogênese do HTLV-1.

Outro gene recentemente descoberto o *HTLV-1 basic leucine zipper factor* (HBZ) parece desempenhar importante papel na manutenção da transformação celular e na proliferação de células T, sua transcrição têm sido correlacionada ao aumento da carga proviral e à severidade da HAM/TSP (Curren et al., 2012; Gessain; Cassar, 2012; Miyazato et al., 2016; Baratella et al., 2017).

Ao contrário de outros retrovírus partículas virais livres do HTLV não são detectadas com facilidade no sangue ou em outros fluidos biológicos de indivíduos infectados, sendo assim o material genético do HTLV encontra-se exclusivamente associado ao genoma do hospedeiro em linfócitos infectados (Miyazato et al., 2016). Desse modo, a chamada carga proviral é detectada através da quantidade de células mononucleares do sangue periférico que possuem o genoma do vírus integrado ao seu.

2.1.3 Doenças associadas

O HTLV-1 apresenta um caráter de persistência viral e pode permanecer no hospedeiro de forma silenciosa durante várias décadas, de fato a maioria se mantém assintomática ao longo da vida. Entre os infectados o risco de se ter HAM/TSP oscila entre 0,3% a 4%, já para o desenvolvimento da ATLL o risco é de 1% a 5% (Murphy et al., 1989; Kaplan et al., 1990).

A primeira doença associada ao HTLV-1, a ATLL é uma neoplasia maligna de origem hematopoiética caracterizada pela intensa linfoproliferação monoclonal de linfócitos infectados. Caracteristicamente manifesta-se após longo período de latência cursando com linfadenopatia generalizada, hepatoesplenomegalia, imunossupressão, hipercalcemia e lesões osteolíticas. O envolvimento cutâneo ocorre em 43-75% dos casos com o aparecimento de nódulos, placas ou pápulas eritematosas, ocasionalmente ulceradas, dispersas pelo corpo (Shimoyama, 1991; Yamaguchi et al., 2005). O prognóstico é variável, dependendo da extensão do acometimento, em casos indolentes costuma ser bom quando comparado à forma

mais agressiva em que a sobrevida fica em torno de 6 a 10 meses (Bittencourt et al., 2007).

Já a HAM/TSP é uma desordem neurológica, crônica e progressiva que acomete a medula espinhal, usualmente de início insidioso. Os primeiros sintomas se manifestam, geralmente, entre a quarta e quinta décadas de vida sendo relatados como lombalgia e fraqueza muscular, embora em alguns casos as queixas iniciais sejam sensoriais, como formigamento e queimação nos membros inferiores, ou disfunção vesical. Com a evolução do quadro, a fraqueza muscular torna-se nítida pelo comprometimento da marcha, marcadamente espástica e hiper-reflexiva. Distúrbios esfinterianos como disfunção urinária e constipação intestinal são queixas frequentes. Prejuízo sensorial sutil pode ser observado, porém a dor neuropática é comum especialmente em estágios avançados. A doença possui graus variáveis de progressão, mas tende a estabilizar-se com graus severos de deficiência motora e sensitiva (Gessain et al., 1985; Shibasaki et al., 1988; Orland et al., 2003).

A terapia da HAM/TSP consiste na manutenção da qualidade de vida através do manejo da sintomatologia. Diversos medicamentos como corticosteroides, administrados por via oral ou através da pulsoterapia, outras medicações imunossupressoras, altas doses de vitamina C e interferon podem ser utilizados na tentativa de conter a progressão da doença, entretanto nenhuma dessas terapias apresentou resultados satisfatórios na interrupção da progressão da doença (Proietti et al., 2005; Martin et al., 2014).

Embora comprovadamente apenas a ATLL e a HAM/TSP tenham como agente etiológico o HTLV-1 ao longo de mais de três décadas de estudo diversas outras doenças foram vistas acometendo com maior frequência pacientes infectados por esse vírus. Dentre o complexo de afecções possivelmente vinculadas ao HTLV-1 estão outras alterações de origem neurológica como a neuropatia periférica, a ataxia cerebelar, a depressão e a disfunção cognitiva. Doenças infecciosas como escabiose, pneumonia broncoalveolar, estrogiloidíase e dermatites infecciosas também têm sido relatadas (Hirata et al., 2006; Okajima et al., 2013; Gascon et al., 2017). Alterações inflamatórias, entre elas, uveíte, artropatias, polimiosite, dermatite, alveolite e a síndrome de Sjögren têm recebido especial interesse pelo fato da

resposta imunológica desencadeada pelo HTLV-1 apresentar um caráter lifoproliferativo que predisporia ao desenvolvimento de doenças de origem autoimune (Murphy et al., 1989; Kaplan et al., 1990; Verdonck et al., 2007; Ferraz-Chaoui et al., 2010; Goncalves et al., 2010). Porém a comunidade científica ainda carece de provas definitivas da associação dessas doenças com o vírus.

2.1.4 Patogênese da HAM/TSP

Ainda não se conhece com exatidão os mecanismos que levam à degeneração neural vista na HAM/TSP. Sabe-se, no entanto, que a infecção pelo HTLV-1 possui um caráter latente até o momento em que a ativação celular promovida pelo vírus gera uma resposta imunológica que dá início a um processo de natureza inflamatória que culmina na atrofia medular. Portanto, a interação vírus/hospedeiro é crucial para o desenvolvimento dessa patologia. Fatores como carga pró-viral e a eficiência da resposta imune celular contra o vírus, determinada pela constituição genética do hospedeiro, parecem estar envolvidos na transição do quadro assintomático para o desenvolvimento da doença (Verdonck et al., 2007).

Embora se saiba que o HTLV-1 tenha um marcado tropismo por linfócitos T CD4+, outras células como linfócitos T CD8+, linfócitos B e células dendríticas apresentam-se também como reservatórios desse retrovírus (Goon et al., 2004). Não há evidências de que o HTLV-1 infecte diretamente células do sistema nervoso central (SNC), apesar da hipótese de citotoxicidade direta, onde células da glia estariam infectadas gerando uma ação direta dos linfócitos T CD8+, ter sido considerada no passado (Bangham; Osame, 2005).

Um cenário onde antígenos do hospedeiro, por exemplo, alguma proteína neural, seria confundida com um antígeno do HTLV-1, provavelmente a Tax, gerando um processo inflamatório autoimune levando à lesão neural já foi considerado. No entanto, esse princípio do mimetismo molecular ainda carece de evidências (Bangham; Osame, 2005; Garcia-Vallejo et al., 2005).

A teoria mais aceita hoje para explicar o mecanismo patogênico da HAM/TSP cita como evento inicial a invasão do SNC por células inflamatórias, predominantemente linfócitos T CD4+, infectadas pelo vírus. Essa invasão por células infectadas levaria conseqüentemente a uma maior expressão da Tax na região medular o que acarretaria na migração de células T CD8+ ativadas específicas para o HTLV-1 que liberariam diversas citocinas responsáveis pela destruição das células infectadas e secundariamente pelo dano ao tecido adjacente (Figura 2.4). Assim, o início da patogênese seria representado por uma fase de intensa inflamação, inicialmente com predominância de linfócitos T CD4+ que gradualmente dariam lugar a linfócitos T CD8+ iniciando o processo de desmielinização, uma vez controlada a expressão da Tax, pela destruição das células infectadas, os linfócitos citotóxicos seriam removidos da porção medular findando o processo inflamatório e deixando a região atrófica (Bangham; Osame, 2005; Goncalves et al., 2010).

Figura 2.4 – Sequência hipotética de eventos da patogênese das doenças inflamatórias associadas ao HTLV-1 (Bangham; Osame, 2005)

De fato, diversos parâmetros imunológicos encontram-se elevados em pacientes com HAM/TSP como a concentração de linfócitos T CD8+ específicos para o vírus, a expressão de citocinas e quimiocinas e também altas titulações de anticorpos contra antígenos do HTLV-1. A peculiaridade imunológica mais notável nos pacientes infectados, no entanto é a capacidade de proliferação espontânea das células mononucleares, notadamente de linfócitos T CD8+, do sangue *in vitro* sem a necessidade de indução por antígenos exógenos ou outros estimulantes. Ademais, a magnitude da linfoproliferação é mais expressiva em pacientes com HAM/TSP do que em assintomáticos (Sakai et al., 2001; Ureta-Vidal et al., 2001; Pinto et al., 2011).

Do ponto de vista histopatológico o que se observa é o comprometimento da medula espinhal torácica com espessamento leptomeníngeo e atrofia medular em diferentes graus. Infiltração linfocitária perivascular, desmielinização, degeneração axonal e das células gliais estão também entre os achados histopatológicos (Gessain; Gout, 1992; Garcia-Vallejo et al., 2005).

2.2 Síndrome de Sjögren

2.2.1 Aspectos gerais

A Síndrome de Sjögren (SS) é uma doença autoimune, de caráter crônico, que acarreta na disfunção das glândulas exócrinas, afetando particularmente as glândulas salivares e lacrimais. Sendo mais comum em mulheres entre a quinta e sétima décadas de vida, a SS pode ocorrer de forma isolada, quando é chamada de SS primária, ou associada a outras doenças autoimunes, como a artrite reumatoide, o lúpus eritematoso sistêmico ou a esclerose, recebendo nesses casos a denominação de SS secundária (Vitali et al., 2002).

Dentre as doenças reumáticas autoimunes é a segunda mais comum, atrás apenas da artrite reumatoide (Fox et al., 2000), apesar disso estudos sobre a prevalência da SS ainda são esparsos na literatura, os até hoje realizados mostram uma ampla variação de 0,1 a 4,8% em sua incidência (Mavragani; Moutsopoulos, 2010). De acordo com pesquisas realizadas em território brasileiro, onde a incidência da SS aparenta estar entre 0,17 a 0,55%, é possível presumir que o Brasil esteja entre as regiões com menor incidência da síndrome (Valim et al., 2013; Vale et al., 2017).

Embora a SS afete particularmente as glândulas exócrinas, levando aos sintomas clássicos de xerostomia e xeroftalmia, outras manifestações extra glandulares podem ocorrer como fadiga, dores articulares e musculares, fenômeno

de Raynaud, vasculite, serosite, neuropatia e alterações pulmonares ou renais (Hernandez-Molina et al., 2011; Jonsson et al., 2011).

Ainda existe ampla discussão na literatura quanto à provável etiologia da SS, embora o conhecimento atual aponte para uma causa multifatorial. Alterações hormonais já foram relatadas e comprovadas nesses pacientes, fatores genéticos e alta carga emocional também parecem exercer influencia no desenvolvimento da síndrome (Laine et al., 2007; Mostafa et al., 2012). Porém, são os vírus que têm sido o alvo dos mais diversos estudos sobre a etiopatogênese da SS. O Epstein-Barr vírus (EBV), o HTLV-1, o vírus da hepatite C (HCV), o vírus da imunodeficiência humana (HIV) assim como alguns retrovírus endôgenos já foram apontados como possíveis desencadeadores da SS apesar de nenhuma relação definitiva ter sido estabelecida (Mavragani; Moutsopoulos, 2010; Vitali, 2011; Konsta et al., 2014).

2.2.2 Etiopatogênese

O infiltrado inflamatório visto nas glândulas salivares de pacientes com SS consiste basicamente em agregados de linfócitos T e B, o que corresponde a aproximadamente 90% de todo o infiltrado, células apresentadoras de antígeno como macrófagos e células dendríticas também são vistas, porém em menor quantidade (Christodoulou et al., 2010; Hamza et al., 2012; Konsta et al., 2014).

Embora a ocorrência e a distribuição das populações de células mononucleares inflamatórias vistas no infiltrado das glândulas salivares, assim como suas repercussões clínicas, não estejam completamente esclarecidas alguns pontos já foram demonstrados, como a relação que a intensidade do infiltrado inflamatório possui na razão entre as células T e B. Em lesões iniciais, com apenas um foco inflamatório em uma região de 4mm² de glândula salivar, observa-se a predominância de células T, o decréscimo quantitativo dessas células acompanha a progressão da infiltração inflamatória, até que em lesões severas o agregado é composto majoritariamente por linfócitos B (Christodoulou et al., 2010; Maehara et al., 2012). A proporção entre os linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ também sofre marcada

redução conforme o infiltrado inflamatório vai se tornando mais severo, deixando claro que a queda numérica dos linfócitos T ocorre à custa das células T CD4+ (Christodoulou et al., 2010). Em relação às células T regulatórias, estas se encontram presentes no decorrer de todo o processo inflamatório, no entanto há um aumento do seu número em lesões intermediárias e severas (Christodoulou et al., 2010; Sarigul et al., 2010).

A destruição do tecido glandular é a sequela natural da intensa infiltração inflamatória vista nos pacientes com SS, levando a consequente piora dos sinais clínicos apresentados e também a mudanças expressivas na arquitetura glandular, alterações com dilatação ductal, atrofia acinar, e substituição do parênquima glandular por tecido fibroso e gorduroso são as alterações mais comumente vistas (Dalavanga et al., 1986; Llamas-Gutierrez et al., 2014; Costa et al., 2015). A organização das células mononucleares em estruturas semelhantes a centros germinativos é ocorrência relativamente habitual, tendo sido visto em 18% a 59% dos pacientes com SS primária e associada a maior severidade e níveis mais elevados de auto anticorpos circulantes, especialmente anti-SSa e anti-SSb (Daniels et al., 2011; Risselada et al., 2013; Carubbi et al., 2015).

2.3 HTLV-1 e SS

Os primeiros relatos da associação do HTLV com a SS ocorreram na década de 80, época em que o HTLV começava a ser vinculado a um quadro de paraplegia. Realizados pela mesma equipe, o primeiro trabalho partiu da observação na literatura de que pessoas acometidas pela paraplegia apresentavam também outras alterações sistêmicas, entre elas a vasculite de caráter autoimune, sendo assim os pesquisadores decidiram verificar se pessoas infectadas pelo HTLV-1 poderiam desenvolver doenças de natureza imunológica, e encontraram dois casos de vasculite necrosante, um de dermatomiosite, um de lúpus eritematoso sistêmico e um caso de esclerodemia acompanhado de SS. Já nesse primeiro estudo foi levantada a hipótese do HTLV-1 poder levar à uma resposta imune muito mais

importante ao organismo do que a própria toxicidade do vírus e citaram fatores genéticos, como o complexo HLA, como possíveis determinantes da intensidade dessa resposta (Vernant et al., 1987). O segundo trabalho, tendo em vista os achados anteriores, investigou 5 pacientes com HTLV-1 e HAM/TSP e diagnosticou nos 5 a SS através de confirmação por análise histológica das glândulas salivares menores (Vernant et al., 1988).

Desse momento em diante pesquisadores de diversas regiões procuraram compreender o possível impacto da infecção pelo HTLV-1 na estrutura e função dos tecidos epiteliais das glândulas salivares. Baseados em estudos epidemiológicos prévios que apontavam altas incidências de SS em infectados pelo HTLV principalmente em áreas endêmicas, essas pesquisas foram focadas em identificar indícios de que o vírus estaria presente nas células do parênquima glandular ou infectando os linfócitos infiltrados nas glândulas.

O primeiro estudo realizado nesses moldes foi publicado por Green et al. em 1989 que, analisando ratos transgênicos que expressavam o gene *tax* do HTLV-1 encontrou, através da técnica da imuno-histoquímica, marcação positiva para a proteína sintetizada por esse gene, predominantemente nas células epiteliais das glândulas salivares, mesmo antes do processo de invasão linfocitária sofrido nessas glândulas começar (Green et al., 1989). Utilizando um anticorpo monoclonal responsivo à proteína p19^{gag} do HTLV-1, outro trabalho procurou compreender a etiologia das alterações autoimunes vistas em glândulas salivares e encontrou positividade para esse anticorpo nas células epiteliais que estavam em proximidade com o infiltrado inflamatório, outros anticorpos para a p24 do HTLV-1 e para as proteínas p17 e p24 do HIV também foram testadas nessas mesmas amostras e não mostraram marcação (Shattles et al., 1992).

Outros estudos ainda utilizando a imuno-histoquímica demonstraram um infiltrado inflamatório com predomínio de células T CD4+ e T CD8+, além da marcação positiva para a proteína Tax e proteínas do core do HTLV-1 como p19, p24 e p28 (Nakamura et al., 1997; Cartier et al., 2005; Lee et al., 2012; Nakamura et al., 2013). No entanto, mesmo em trabalhos que demonstraram a positividade para proteínas do HTLV-1 esses resultados não foram expressivos tendo sido observada a marcação de apenas algumas proteínas e em apenas alguns pacientes.

Ao longo dos anos outros trabalhos foram publicados utilizando diferentes técnicas além da imuno-histoquímica, como a reação em cadeia de polimerase (PCR) e a hibridização *in situ*, com o mesmo objetivo de identificar partículas do HTLV no tecido glandular.

Pesquisadores que utilizaram a técnica da hibridização *in situ* encontraram resultados positivos para a pesquisa do gene *tax*, porém sua localização no parênquima glandular ainda é questionável tendo sido encontrada tanto em células epiteliais quanto em linfócitos (Mariette et al., 1993; Ohyama et al., 1998).

Outras partículas como as que codificam proteínas do core (*gag*, *env* e *pol*), também foram pesquisadas através da técnica de PCR, em grupos de pacientes soropositivos e soronegativos para o HTLV-1. Embora essas sequências tenham sido amplificadas apenas nos pacientes positivos para o vírus, a amplificação do gene *tax* foi evidenciada tanto nos pacientes positivos quanto nos negativos, levantando hipóteses de que essa sequência específica poderia pertencer a algum retrovírus endógeno ou ser resultado de uma infecção falha pelo HTLV-1, a hipótese de contaminações durante o processo de amplificação também teve que ser levantada (Mizokami et al., 1998; Tangy et al., 1999).

A respeito das possíveis alterações estomatológicas em indivíduos infectados pelo HTLV um estudo desenvolvido no Brasil, avaliou 139 pacientes soropositivos para o HTLV. As alterações bucais mais comumente encontradas foram: xerostomia (26,5%), candidíase (25,4%) e língua fissurada (22,1%). Modelos estatísticos confirmaram que a HAM/TSP pode ser considerada um fator de risco independente para a xerostomia, apresentando, pacientes com HAM/TSP, três vezes mais chances de desenvolver xerostomia quando comparados com pacientes sem HAM/TSP (Martins et al., 2010).

Em outro estudo realizado também em território nacional, 129 pacientes soropositivos somente para o HTLV foram investigados quanto à presença de sinais secos e consequente diagnóstico da SS. Quarenta e seis (35,7%) e 18 (13,95%) relataram xerostomia e xeroftalmia respectivamente, apenas 8 (6,2%) apresentaram hipossalivação e 2 (1,55%) fluxo lacrimal alterado. Somente um (0,77%) teve positividade para a pesquisa de autoanticorpos específicos (SSa ou SSb). Biópsias

de glândulas salivares menores foram realizadas em 6 pacientes com hipossalivação, em todas foi observado infiltrado inflamatório mononuclear compatível com a SS, ou seja havia ao menos um foco (aglomerado de 50 ou mais células inflamatórias) por 4mm² de tecido glandular. Apenas 2 pacientes (1,55%) foram de fato diagnosticados com SS, seguindo os princípios preconizados pelo Grupo de Estudo da Comunidade Europeia sobre Critérios para Diagnóstico da SS (Vitali et al., 2002). Embora nesse trabalho não tenha sido possível verificar uma prevalência maior da SS nos pacientes com HTLV, quando comparado ao grupo controle utilizado, os diversos relatos de xerostomia e xeroftalmia por parte dos pacientes HTLV+ e o intenso infiltrado inflamatório encontrado no parênquima glandular desses pacientes permite que seja levantada a hipótese de que o próprio vírus ou a forte resposta imunológica contra ele possam estar envolvidos no comprometimento funcional das glândulas salivares (Vale et al., 2017).

3 PROPOSIÇÃO

A partir da hipótese que vem sendo levantada na literatura, sobre a capacidade do HTLV-1 desencadear alterações inflamatórias mimetizando alterações de origem autoimune, este trabalho teve como objetivo investigar indícios da presença do HTLV-1 em glândulas salivares menores de pacientes infectados por esse retrovírus que apresentavam sinais e/ou sintomas relacionados à síndrome seca.

Objetivos secundários

a) Verificar a presença de linfócitos T CD4+, TCD8+ e B CD20+ no infiltrado inflamatório das glândulas salivares menores de pacientes HTLV-1 negativos com SS e de pacientes HTLV-1 positivos.

b) Verificar a presença de proteínas virais nas glândulas salivares de pacientes HTLV-1 negativos com SS e de pacientes HTLV-1 positivos.

c) Verificar a presença e a quantidade de material genético do HTLV-1 nas glândulas salivares de pacientes HTLV-1 negativos com SS e de pacientes HTLV-1 positivos.

d) Verificar as características histopatológicas diferenciais entre as glândulas salivares de pacientes HTLV-1 negativos com SS e de pacientes HTLV-1 positivos.

4 CASUÍSTICA – MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa que deu origem a esse projeto foi aprovada pelos Comitês de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP), protocolo 69/11 (Anexo A); do Instituto de Infectologia Emílio Ribas (IIER), protocolo 039/2012 (Anexo B) e da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (ISCMSP), projeto 119/12 (Anexo C). Esta nova fase obteve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP), CAAE: 66230317.0.0000.0075, número do parecer: 2.006.186 (Anexo D).

4.1 Desenho da pesquisa

A pesquisa é um estudo retrospectivo de caso controle, que avaliou as glândulas salivares menores de pacientes infectados pelo HTLV-1 que apresentavam algum sinal e/ou sintoma relacionado à síndrome seca e de pacientes sabidamente com SS e sorologia negativa para o HTLV-1.

4.2 Casuística

Dois grupos foram estudados:

O grupo controle (GC), constituído por amostras de glândulas salivares menores obtidas de pacientes com SS primária ou secundária que buscaram o serviço do Ambulatório de Estomatologia do Departamento de Otorrinolaringologia da ISCMSP ou o Centro de Atendimento a Pacientes com Necessidades Especiais da FOUSP, para diagnóstico e acompanhamento da síndrome.

O grupo de estudo (GE), composto por amostras de glândulas salivares menores de pacientes soropositivos para o HTLV-1 do IIER, diagnosticados previamente com SS ou síndrome seca.

Em todas as amostras o laudo histopatológico liberado foi de sialodenite, ou seja, considerando como tal a presença de pelo menos um foco, mínimo de 50 células mononucleares, em 4mm² de tecido glandular.

Em ambos os grupos dados demográficos, da situação clínica e as amostras de glândula salivar menor foram coletados em estudo realizado previamente (Vale et al., 2017), porém para um n amostral mais significativo o referido trabalho foi mantido em andamento, focado principalmente na obtenção de novas peças.

4.2.1 Detalhamento dos grupos

4.2.1.1 Grupo controle (GC)

Foram levantados os casos confirmados de SS de acordo com os critérios estabelecidos pelo consenso Americano-Europeu para diagnóstico da SS (Vitali et al., 2002). Esses pacientes eram provenientes do ambulatório de Estomatologia do Departamento de Otorrinolaringologia da ISCMSP ou do Centro de Atendimento a Pacientes com Necessidades Especiais da FOUSP. Todos os pacientes fizeram parte da pesquisa já mencionada e, sendo assim, haviam realizado testes sorológicos de triagem, sendo todos soronegativos para o HTLV.

Nenhum paciente apresentava infecções sistêmicas pelo HIV ou HCV e todos eram maiores de 18 anos.

As biópsias de glândula salivar menor realizadas nesses pacientes foram encaminhadas para o Laboratório de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia

Oral e Maxilofacial da FOUSP, tendo sido emblocadas e armazenadas no arquivo da instituição.

4.2.1.2 Grupo de estudo (GE)

As biópsias de glândula salivar menor desse grupo foram obtidas de pacientes provenientes do ambulatório de HTLV do IIER, com diagnóstico confirmado de infecção pelo HTLV-1 e que apresentavam sintomas e/ou sintomas secos. Todas as biópsias realizadas foram encaminhadas para o Laboratório de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Oral e Maxilofacial da FOUSP onde foram analisadas, emblocadas e armazenadas.

Nenhum paciente apresentava-se coinfetado pelo HIV ou HCV e todos eram maiores de 18 anos.

Informações referentes à condição clínica desses pacientes também foram levantados e utilizados nas análises correlacionais na tentativa de se estabelecer um padrão para as alterações morfológicas e imuno-histoquímicas vistas nas glândulas salivares menores. Dados como tempo de conhecimento da positividade para o HTLV, situação clínica (assintomático ou HAM/TSP), tempo de evolução da HAM/TSP, tratamento utilizado para controle da doença, carga pró-viral e exame de linfoproliferação foram obtidos através de consulta aos prontuários desses pacientes.

O exame de linfoproliferação consiste na avaliação da taxa de expansão de células mononucleadas obtidas do sangue periférico. As células mononucleares são mantidas em cultura sem estímulo externo e quantificadas, para fins comparativos células mononucleares de controles são cultivadas conjuntamente, assim cada resultado de linfoproliferação é analisado levando-se em consideração a taxa de proliferação vista nos controles. Neste estudo utilizamos resultados obtidos após três dias de cultura e para comparação entre os pacientes deste grupo utilizamos a razão da taxa de linfoproliferação paciente/controle.

4.2.2 Cálculo amostral

Com o objetivo de verificar se as amostras obtidas para o GE seriam representativas da população infectada pelo HTLV-1 foi realizado o cálculo amostral com o auxílio do software Epi-info 7.0, no módulo STATCALC.

Para a execução do cálculo estatístico foi considerado que a população da cidade de São Paulo seja de 12.380.000, segundo estimativa do Instituto Brasileiro de Tecnologia e Estatística (IBGE) (<http://cod.ibge.gov.br/493>). Considerando 0,32% como a prevalência do HTLV na cidade de São Paulo (Catalan-Soares et al., 2005) teremos 39.616 pessoas infectadas pelo vírus. O estudo que precedeu este projeto analisou 129 pacientes HTLV+ e encontrou 8 (6,2%) pacientes com síndrome seca, ou seja, sintomas de xerostomia e hipossalivação. Utilizando um fator de correção de 1,0 para efeito do desenho do estudo, um intervalo de confiança de 99,9% e erro padrão de 5% a amostra de 14 casos foi considerada significativa da população de interesse.

4.3 Material e métodos

As amostras de glândulas salivares menores separadas para este estudo foram previamente fixadas em formol 10%, emblocadas em parafina, coradas com hematoxilina e eosina e analisadas sob microscopia de luz.

4.3.1 Análise morfológica

Com o objetivo de observar e comparar as possíveis alterações morfológicas presentes nas glândulas salivares menores provenientes dos dois grupos de pacientes estudados, as lâminas coradas por hematoxilina e eosina foram avaliadas

com o auxílio da microscopia de luz. Para esta avaliação morfológica o corte histológico obtido dos espécimes foi examinado na sua integridade.

As peculiaridades do infiltrado inflamatório foram categorizadas de acordo com os seguintes parâmetros definidos pela Sjogren's International Collaborative Clinical Alliance (SICCA) (SICA, 2005; Daniels et al., 2011):

- Sialodenite linfocitária focal: compreendida como a presença de um ou mais agregados densos de 50 ou mais linfócitos usualmente localizados na região periductal ou perivascular. Os focos devem estar adjacentes à ácinos de aparência normal ou em lóbulos que não contenham dilatação ductal ou fibrose intersticial e tenham não mais do que uma pequena proporção de plasmócitos.

- Sialodenite crônica não especificada: descrita quando há infiltrados focais ou dispersos de linfócitos, macrófagos e plasmócitos que não estejam adjacentes à ácinos de aparência normal mas localizados em lóbulos que exibam atrofia acinar, fibrose intersticial e dilatação ductal.

Alterações estruturais nas glândulas também foram verificadas avaliando a presença ou ausência dos seguintes fatores (Costa et al., 2015):

- Fibrose: deposição de colágeno em torno de ductos ou formando traves que dissociam os lóbulos e envolvem os ácinos.

- Dilatação ductal: aumento do lúmen associado ao achatamento das células luminiais.

- Atrofia acinar: desdiferenciação do epitélio acinar e/ou perda do parênquima glandular com substituição por fibrose ou tecido adiposo.

- Infiltração gordurosa: substituição do parênquima glandular por adipócitos.

- Centro germinativo: infiltrado de células inflamatórias mononucleares bem circunscrito exibindo uma zona escura densa e uma zona clara mais frouxa, que esteja próximo a tecido glandular de aspecto normal.

4.3.2 Técnica da imuno-histoquímica

Após a confirmação do diagnóstico de sialoadenite crônica, pela coloração com hematoxilina e eosina, os casos foram submetidos à reação de imuno-histoquímica para identificação da proteína tax do HTLV-1 utilizando como marcador o anticorpo anti-tax (clone 1A3, Abcam, Cambridge, Reino Unido), e da população linfocitária, através dos anticorpos anti-CD4 (clone 4B12, Dako, Glostrup, Dinamarca), anti-CD8 (clone 144B, Dako, Glostrup, Dinamarca) e anti-CD20 (clone L26, Cell Marque, Sigma-Aldrich Co, Darmstadt, Alemanha).

Cortes seriados de 3µm foram obtidos das biópsias de glândulas salivares menores emblocadas em parafina, esses cortes foram dispostos em lâminas de vidro previamente silanizadas, submetidos à desparafinização em banhos de xilol e reidratadas em concentrações decrescentes de etanol. Seguida da remoção do pigmento formólico através da incubação com hidróxido de amônia, os cortes foram lavados em água destilada e receberam tratamento para recuperação antigênica e exposição dos epítomos, com imersão em banho de EDTA (anti-CD4, anti-CD8, anti-tax) ou ácido cítrico (anti-CD20) a 95°C durante 30 minutos. Ao final do tratamento de recuperação os cortes foram novamente lavados em água destilada.

Em sequencia, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena tecidual pela imersão em peróxido de hidrogênio a 6% e metanol por 30 minutos, nova lavagem em água destilada e posterior imersão em solução tampão. A partir desse momento foi realizada a incubação dos anticorpos anti-CD4, anti-CD8, anti-CD20, em diluições de 1:100, e anti-tax, em diluição de 1:300, todos foram incubados por 16 horas à 4°C. Ao fim desse processo, após lavagem com solução tampão e incubação do anticorpo de ligação e do complexo terciário pelo sistema EnVision (Dako, Glostrup, Dinamarca) as lâminas passaram pela etapa de revelação através da diaminobenzidina, nova lavagem com água destilada e foram contracoradas com hematoxilina de Mayer. Após desidratação em etanóis, diafanização em xilol e montagem das lâminas os cortes seguiram para análise em microscopia de luz.

Cortes de linfonodos reativos foram utilizados como controles positivos para as marcações dos anticorpos anti-CD4, anti-CD8 e anti-CD20, para o anticorpo anti-tax foram utilizados cortes de células MT2 infectadas pelo HTLV-1 e para controle negativo cortes de mucoccele.

A análise foi quantitativa, pela contagem de células positivas expressas por áreas em mm² em campos significativos e representativos do corte em relação à positividade no parênquima glandular, tal contagem foi feita com o auxílio de um microscópio de luz e o sistema de aquisição de imagem Axio Imager A1 (Carl Zeiss, Thornwood, NY, EUA). Para cada corte analisado foram realizados 5 capturas em regiões diferentes em um aumento de 400X, cada região teve suas células marcadas contadas e o resultado final deu-se pela média dessas 5 contagens.

4.3.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Todas as amostras parafinizadas foram cortadas e submetidas à extração de DNA utilizando o Ambion™ MagMAX™ FFPE Total Nucleic Acid Isolation Kit. Quatro à 5 cortes de 5 µm cada foram obtidos, armazenados em microtubos e seguiram imediatamente para tratamento e digestão através da enzima protease. Após a lise do tecido e inativação da protease foram adicionadas esferas magnéticas que capturaram o DNA e com o auxílio de um suporte magnético o separaram do sobrenadante que foi descartado. Após as lavagens e a dissociação do DNA das esferas magnéticas a pureza do DNA obtido foi verificada através da leitura em espectrofotômetro.

Para a amplificação dos seguimentos do HTLV foi utilizada a nested-PCR. Para a primeira amplificação 5 µL do DNA extraído foram adicionados à 23µL do mix contendo água ultrapura, master mix, 1 µL do primer SK-44A e 1 µL do primer SK-44B, a seguir as amostras foram levadas ao termociclador para amplificação em 35 ciclos. Na segunda amplificação 5 µL do produto obtido foram adicionados à 23 µL do segundo mix contendo também água ultrapura, master mix e 1µL de cada um dos

primers SK-43A e SK-43B e novamente as amostras foram submetidas a 35 ciclos no termociclador, produzindo fragmentos de DNA correspondentes às sequências tax e rex do HTLV. Ao final da amplificação foram adicionados 2 µL do corante BlueJuice Gel Loading Buffer (Invitrogen – Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) à 5 µL do material obtido de cada amostra para finalmente ser realizada a corrida de eletroforese em voltagem de 90V por 1 hora em gel de agarose a 3%.

Para a revelação do gel de agarose foi utilizado o programa Launch Doc-ItLS (Analytik Jena AG, Jena, Alemanha) no transiluminador. As amostras positivas para os seguimentos do HTLV foram identificados pela presença de uma banda de 128 pb.

Nas amostras positivas foi realizada a diferenciação entre os subtipos 1 e 2 do HTLV através da adição de 15 µL do mix da restrição contendo água ultrapura, buffer, BSA e Taq 1 à 5 µL do produto obtido de cada amostra após a segunda amplificação. Após passagem no termociclador as amostras foram submetidas à corrida em gel de agarose seguindo os mesmos procedimentos de coloração e revelação sendo que amostras positivas para o tipo 1 mostraram a presença de uma banda de 128 pb e para o tipo 2 de duas bandas de 69 pb e 53 pb.

Na realização da PCR em tempo real para verificação da carga pró-viral das amostras de glândulas salivares, foram adicionados 20 µL do mix para a pol contendo água ultrapura, master mix, probe e os primers SK-110 e SK-111 em meia placa de PCR juntamente com 5 µL do DNA extraído referente à cada amostra. A placa foi levada ao termociclador. A quantidade de DNA proviral do HTLV foi calculada seguindo a fórmula:

$$\frac{\text{Média } C_T \text{ POL}}{\text{Média } C_T \text{ Albumina}} \times 2 \times 10000 = \text{N}^\circ \text{ cópias em 10.000 células}$$

Os resultados são relatados como cópias/10.000 células sendo o limite de detecção de 5 cópias. O gene da albumina serviu como controle interno genômico, e células MT2 foram utilizadas como controle positivo. Além disso, algumas amostras tiveram todos os ensaios repetidos a fim de confirmar os resultados obtidos e garantir sua confiabilidade. Esses testes foram realizados no Laboratório de

Investigação Médica em Dermatologia e Imunodeficiências (LIM-56) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

4.4 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o pacote estatístico BioEstat versão 5.3.

A análise descritiva dos dados foi realizada com números absolutos, percentuais, médias, medianas e desvio-padrão. Através destas estatísticas descritivas e após realização do teste de normalidade, para saber se seriam utilizados testes paramétricos ou não-paramétricos, foram feitas as análises exploratórias dos dados. O teste de normalidade utilizado neste trabalho foi o de Shapiro-Wilk. Como a hipótese de normalidade foi rejeitada em todos os casos o coeficiente de correlação de Spearman e o teste não paramétrico de Mann-Whitney foram utilizados, quando foi feita a divisão dos indivíduos estudados em mais de dois grupos o teste de Kruskal Wallis foi empregado.

Para o cruzamento entre variáveis categóricas a técnica estatística aplicada foi a tabela cruzada com teste qui-quadrado.

Devido ao tamanho reduzido da amostra o teste exato de Fisher foi aplicado, pela mesma razão o modelo de regressão não foi considerado adequado tendo sido preferido o cálculo da medida de razão de risco univariada, obtendo-se a odds ratio (OR).

Assim a medida de associação calculada a partir do modelo logístico foi a odds ratio (OR), o intervalo de confiança estipulado foi de 95% e o nível de significância $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação descritiva dos grupos estudados

5.1.1 Grupo controle (GC) – SS

Com o intuito de agregar informações que auxiliassem na compreensão das alterações estruturais e imunológicas vistas nas glândulas salivares de pacientes HTLV-1 positivos um grupo controle foi formado a partir das amostras de glândula salivar menor de cinco pacientes com SS e sorologia negativa para o HTLV-1, todos eram do sexo feminino com média de idade de 46,8 anos (mínimo = 27; máximo = 62; desvio padrão = 12,26). Apenas uma relatava ser fumante e nenhuma tinha como hábito o etilismo. Duas pacientes exibiam concomitância de doenças autoimunes, juntamente com a SS, uma apresentava artrite reumatoide e a outra paciente estava diagnosticada com lúpus eritematoso sistêmico e esclerose sistêmica, sendo estas duas, portanto classificadas com SS secundária.

Tabela 5.1 – Sinais e sintomas característicos da SS em pacientes diagnosticados com a doença

Nº do caso	SS	Xerostomia	Xeroftalmia	Sialometria ¹	Schirmer ²	Anit-SSa	Anti-SSb
1	Secundária	Sim	Sim	0,05	Sim	Sim	Sim
2	Primária	Sim	Sim	0,33	Sim	Não	Não
3	Primária	Sim	Sim	0,043	Não	Sim	Sim
4	Primária	Sim	Sim	0,178	Sim	Não	Não
5	Secundária	Sim	Sim	0,435	Sim	Sim	Não

¹resultado em ml/min dos testes de sialometria; ²resultado dos testes de Schirmer

As queixas de xerostomia e xeroftalmia eram unânimes, duas pacientes apresentavam hipossalivação, averiguado através da técnica da sialometria. A média de fluxo salivar do grupo foi de 0,207ml/min (desvio padrão = 0,173ml/min). A hipossalivação foi constatada quando o paciente apresentava um fluxo menor que 0,1 ml/min. O teste de Schirmer, realizado para verificar o grau de lacrimejamento comprovou que 4 pacientes apresentavam comprometimento na lubrificação ocular. Pesquisa de auto anticorpos como anti-SSa e anti-SSb também eram realizados de

maneira rotineira para compor o diagnóstico da SS, assim 3 pacientes mostraram positividade para algum dos dois auto anticorpos (Tabela 5.1).

A quantidade de células marcadas para os anticorpos anti-T CD4+, anti-T CD8+, anti-B CD20+ e anti-Tax está expressa na tabela 5.2. A proporção média entre a contagem de linfócitos T CD4 e CD8 foi de 0,23 (desvio padrão = 0,24), entre a contagem de linfócitos T e linfócitos B foi de 1,91 (desvio padrão = 2,70) e entre a quantidade de linfócitos T e células marcadas pelo anti-Tax de 12,60 (desvio padrão = 11,46).

Tabela 5.2 – Contagem das células positivas por mm², para os anticorpos pesquisados em amostras de glândulas salivares menores de pacientes com SS e HTLV-1 negativos

Nº do caso	CD4	CD8	CD20	Tax
1	1	86,2	285	7,4
2	1,4	24,8	4	13,4
3	1,4	8,4	216,8	9,2
4	10,2	37	23,8	2,2
5	8,2	13,2	31,2	0,8
Média	4,44	33,92	112,16	6,6
Desvio padrão	4,40	31,25	129,31	5,16

O infiltrado inflamatório de quatro (80%) amostras foi caracterizado como sialodenite linfocitária focal, outras alterações morfológicas comprovadas pela análise histopatológica das lâminas está listada na tabela 5.3, em nenhuma amostra foi evidenciada a formação de estruturas semelhantes à centros germinativos.

Tabela 5.3 – Alterações morfológicas evidenciadas nas glândulas salivares de pacientes com SS e HTLV-1 negativos

Nº do caso	Sialodenite linfocitária focal	Sialodenite crônica não especificada	Atrofia acinar	Dilatação ductal	Fibrose	Infiltração gordurosa
1	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Não
2	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Não
3	Sim	Não	Não	Não	Não	Não
4	Sim	Não	Não	Sim	Não	Não
5	Sim	Não	Não	Não	Não	Não

Todos os espécimes foram submetidas à análise da presença das sequências *tax* e *rex* do HTLV através da técnica da PCR, 4 (80%) foram positivas porém em nenhuma foi possível obter a quantificação das sequências do vírus.

5.1.2 Grupo de estudo (GE) – HTLV-1+

Este estudo reuniu 14 pacientes sabidamente soropositivos para o HTLV-1 que apresentavam algum sinal ou sintoma compatível com SS e que realizaram biópsia de glândula salivar menor para investigação desse quadro. Todos os pacientes eram do sexo feminino com idade média de 51,71 anos (mínimo = 30; máximo = 68; desvio padrão = 10,56), 3 eram fumantes e 2 relatavam etilismo social.

Os pacientes deste grupo tinham conhecimento da infecção pelo HTLV-1 em média há 8,36 anos (desvio padrão = 5,51), 3 (21,43%) eram assintomáticos, 1 (7,14%) apesar de apresentar-se sintomático ainda não possuía o diagnóstico da HAM/TSP e 10 (71,43%) estavam com diagnóstico fechado de HAM/TSP. O tempo médio de evolução da HAM/TSP nesses pacientes era de 4,5 anos (desvio padrão = 4,32), 8 (57%) realizavam pulsoterapia, administração de succinato sódico de metilprednisolona intravenoso, para controle dos sintomas e da progressão da doença em esquemas mensais ou trimestrais. A carga pró-viral pode ser verificada em 12 pacientes (Tabela 5.4).

Tabela 5.4 – Resultado da carga pró-viral (n=12)

Carga pró-viral (/10mil céls)	
<100	6 (50%)
100-500	5 (41,66%)
>500	1 (8,33%)

Em relação aos sintomas característicos da SS, 12 (85,71%) relatavam xerostomia, 10 (71,42%) xeroftalmia, 8 (57%) apresentavam hipossalivação (Tabela 5.5) e 3 (21,43%) fluxo lacrimal alterado evidenciado pelo teste de Schirmer, apenas uma paciente apresentava soropositividade para o anti-SSb e nenhuma para o anti-SSa.

Tabela 5.5 – Fluxo salivar medido através da técnica da sialometria de pacientes HTLV-1 positivos e com queixas relacionadas à SS (n=14)

Sialometria (ml/min)					
	Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão
Normal (n=6)	0,148	0,132	0,103	0,225	0,052
Alterado (n=8)	0,070	0,072	0,032	0,095	0,020

A quantificação de células que expressavam anticorpos anti-CD4, anti-CD8, anti-CD20 e anti-Tax está exposta na tabela 5.6. A proporção média da expressão entre linfócitos T CD4+ e T CD8+ foi de 0,47 (desvio padrão = 0,69), entre linfócitos T e B foi de 5,3 (desvio padrão = 4,49) e de células T e células marcadas pelo anti-Tax de 13,21 (desvio padrão = 21,13).

Tabela 5.6 – Contagem das células positivas por mm², para os anticorpos pesquisados em amostras de glândulas salivares menores de pacientes HTLV-1 positivos (n=14)

	Média	Mínimo	Máximo	Desvio-padrão
CD4	13,75	0,2	78	21,73
CD8	49,64	7,8	223,8	54,11
CD20	27,9	2,6	108,8	34,79
Tax	8,53	2,8	16,6	4,95

A sialodente crônica não especificada foi constatada na maioria dos casos (85,71%), apenas 2 (14,29%) amostras foram caracterizadas como tendo sialodente linfocitária focal (Tabela 5.7). Em nenhuma amostra foi visto estruturas semelhantes à centros germinativos.

Tabela 5.7 – Alterações morfológicas evidenciadas nas glândulas salivares de pacientes HTLV-1 positivos (n=14)

	Atrofia acinar	Dilatação ductal	Fibrose	Infiltração gordurosa
Sialodente crônica não especificada (n=12)	11 (91,66%)	11 (91,66%)	9 (75%)	8 (66,66%)
Sialodente linfocitária focal (n=2)	0	0	2 (100%)	1 (50%)

A pesquisa de sequências genômicas do HTLV (*tax* e *rex*) foi realizada e mostrou-se positiva para 11 (78,57%) casos, a PCR quantitativa foi realizada em

todos os casos positivos, porém em somente um a carga pró-viral pode ser quantificada e em baixa quantidade, 8 cópias por 10 mil células.

5.2 Análise correlacional do GE

Os aspectos imunológicos juntamente com a expressão da proteína Tax foram correlacionados com as alterações morfológicas vistas no tecido glandular. Através do teste de Mann-Whitney observou-se que amostras que apresentavam infiltrado linfocitário focal tinham maior expressão de CD20, portanto, de maneira contrária, amostras em que o infiltrado inflamatório caracterizava-se como crônico não especificado tinham menor expressão de CD20 (Tabela 5.8).

Tabela 5.8 – Análise correlacional entre a expressão de marcadores linfocitários e da proteína Tax com as alterações inflamatórias e morfológicas vistas em glândula salivar menor (n=14)

	CD4			CD8			CD20			Tax		
	Média	DP	<i>p</i>	Média	DP	<i>p</i>	Média	DP	<i>p</i>	Média	DP	<i>p</i>
Sialodenite linfocitária focal												
Sim	2,00	1,41	0,352	27,40	27,71	0,352	103,30	7,77	0,022	14,30	0,14	0,088
Não	15,72	22,99		53,35	57,32		15,33	14,79		7,56	4,64	
Sialodenite crônica não especificada												
Sim	15,71	22,99	0,352	53,35	57,32	0,352	15,33	14,79	0,022	7,56	4,68	0,088
Não	2,00	1,41		27,40	27,71		103,30	7,78		14,30	0,14	
Atrofia acinar												
Sim	16,69	23,85	0,555	52,51	60,04	0,885	15,72	15,45	0,126	7,91	4,75	0,368
Não	3,00	2,00		39,13	28,23		72,53	53,57		10,80	6,06	
Dilatação ductal												
Sim	17,11	23,81	0,088	55,00	59,81	0,368	16,49	14,94	0,456	7,80	4,84	0,225
Não	1,46	1,36		30,00	20,11		69,73	58,39		11,20	5,37	
Fibrose												
Sim	16,91	23,70	0,291	47,94	61,03	0,170	31,02	38,26	0,555	8,96	5,20	0,769
Não	2,20	2,45		55,86	18,25		16,46	17,26		6,93	4,42	
Infiltração gordurosa												
Sim	14,02	25,58	0,699	61,86	63,58	0,240	28,55	34,19	0,518	9,75	4,98	0,364
Não	13,28	15,01		27,64	22,14		26,72	39,91		6,32	4,55	

A taxa de linfoproliferação foi correlacionada com a quantidade de células CD4+, CD8+, CD20+, linfócitos T (CD4+; CD8+), linfócitos mononucleares (CD4+; CD8+; CD20+) e células que expressavam a proteína Tax, porém não houve associação estatisticamente significativa com nenhuma das variáveis (Tabela 5.9), assim como não houve relação entre a linfoproliferação e o padrão do infiltrado inflamatório e as alterações morfológicas vistas nas glândulas salivares (Tabela 5.10).

Tabela 5.9 – Correlação dos valores de linfoproliferação com os parâmetros imuno-histoquímicos (n=14)

Variáveis	r	p
CD4	-0,449	0,107
CD8	0,327	0,253
CD20	-0,297	0,303
Linfócitos T	0,103	0,725
Linfócitos mononucleares	-0,130	0,659
Tax	-0,284	0,326

Tabela 5.10 – Correlação dos valores de linfoproliferação com as alterações histológicas (n=14)

Linfoproliferação			
	Média	Desvio-padrão	<i>p</i>
Sialodenite linfocitária focal			
Sim	4,43	0,94	0,549
Não	14,42	15,34	
Sialodenite crônica não especificada			
Sim	14,42	15,34	0,549
Não	4,43	0,94	
Atrofia acinar			
Sim	15,53	15,58	0,225
Não	3,71	1,41	
Dilatação ductal			
Sim	14,75	16,05	0,659
Não	6,57	3,77	

Fibrose			
Sim	13,43	16,05	1,00
Não	11,39	9,38	
Infiltração gordurosa			
Sim	16,70	16,94	0,240
Não	6,32	5,47	

A presença dos seguimentos genômicos do HTLV, *tax* e *rex*, também não obteve significância na sua correlação com a expressão de diferentes populações linfocitárias nem com a expressão da Tax (Tabela 5.11).

Tabela 5.11 – Correlação entre os padrões imuno-histoquímicos e a presença da sequência *tax* e/ou *rex* nas amostras de glândula salivar menor (n=14)

Variáveis		PCR	
		Positivo	Negativo
CD4	Média	12,71	17,60
	DP	23,78	14,62
	<i>p</i>	0,659	
CD8	Média	56,14	25,80
	DP	59,33	18,57
	<i>p</i>	0,291	
CD20	Média	23,58	43,73
	DP	29,02	56,36
	<i>p</i>	0,555	
Tax	Média	8,45	8,80
	DP	5,01	5,81
	<i>p</i>	1,00	

5.3 Comparação entre o GC e o GE

A presença de sinais e sintomas associados à SS foi relacionada entre os pacientes dos dois grupos (Tabela 5.12). A correlação entre o fluxo salivar de

pacientes HTLV-1 negativos com SS e HTLV-1 positivos não apresentou significância ($p= 0,559$). Evidenciando que não houve diferenças estatisticamente significantes da presença de sintomas secos nem das alterações de fluxo salivar e lacrimal entre os grupos.

Tabela 5.12 – Sinais e sintomas característicos da SS apresentados por pacientes dos dois grupos (n=19)

	GC	GE	Total	p	OR bruta (IC95%)
Xerostomia					
Sim	5 (100%)	12 (85,7%)	17 (89,5%)	1,000	1,41 (1,04-1,92)
Não	0	2 (14,3%)	2 (10,5%)		
Xeroftalmia					
Sim	5 (100%)	10 (71,4%)	15 (78,9%)	0,530	1,50 (1,05-2,14)
Não	0	4 (28,6%)	4 (21,1%)		
Hipossalivação					
Sim	2 (40%)	7 (50%)	9 (47,4%)	1,000	1,50 (0,19-11,92)
Não	3 (60%)	7 (50%)	10 (52,6%)		
Teste de Schirmer					
Sim	3 (60%)	3 (21,4%)	6 (31,6%)	0,202	0,18 (0,02-1,64)
Não	2 (40%)	11 (78,6%)	13 (68,4%)		

A sorologia para o HTLV-1 não afetou os parâmetros imuno-histoquímicos evidenciados nas amostras de glândulas salivares menores (Tabela 5.13).

Tabela 5.13 – Análise correlacional entre os dois grupos a respeito da quantificação de diferentes subtipos de células linfocitárias (n=19)

Variáveis	GC		GE		P
	Média	Desvio-padrão	Média	Desvio-padrão	
CD4	4,44	4,40	13,75	21,73	0,754
CD8	33,92	31,25	49,64	54,11	0,622
CD20	112,16	129,31	27,90	34,79	0,219
Linfócitos T	38,36	30,47	63,40	70,98	0,266
Linfócitos mononucleares	150,52	146,04	91,30	83,23	0,643
Tax	6,60	5,16	8,53	4,95	0,391

O padrão do infiltrado inflamatório assim como as alterações morfológicas constatadas nos fragmentos de glândula salivar menor foram correlacionados com o status sorológico para o HTLV-1 (Tabela 5.14). Os casos referentes a pacientes HTLV-1 positivos apresentaram em sua maioria uma sialodenite crônica não especificada ao contrário de pacientes HTLV-1 negativos com SS, diferença essa que foi estatisticamente significativa ($p=0,017$). Fibrose e infiltração gordurosa foram as duas alterações que se associaram a sorologia positiva para o HTLV-1 com relevância estatística (respectivamente, $p= 0,038$ e $p= 0,033$).

Tabela 5.14 – Comparação do padrão inflamatório e das alterações morfológicas entre os grupos (n=19)

	GC	GE	Total	p	OR bruta (IC95%)
Sialodenite linfocitária focal					
Sim	4 (80%)	2 (14,3%)	6 (31,6%)	0,017	0,04 (0,01-0,59)
Não	1 (20%)	12 (85,7%)	13 (68,4%)		
Sialodenite crônica não especificada					
Sim	1 (20%)	12 (85,7%)	13 (68,4%)	0,017	8,66 (1,21-61,91)
Não	4 (80%)	2 (14,3%)	6 (31,6%)		
Atrofia acinar					
Sim	2 (40%)	11 (78,6%)	13 (68,4%)	0,262	5,50 (0,61-49,53)
Não	3 (60%)	3 (21,4%)	6 (31,6%)		
Dilatação ductal					
Sim	3 (60%)	11 (78,6%)	14 (73,7%)	0,570	2,44 (0,27-22,01)
Não	2 (40%)	3 (21,4%)	5 (26,3%)		
Fibrose					
Sim	1 (20%)	11 (78,6%)	12 (63,2%)	0,038	14,66 (1,16-49,82)
Não	4 (80%)	3 (21,4%)	7 (36,8%)		
Infiltração gordurosa					
Sim	0	9 (64,3%)	9 (47,4%)	0,033	0,50 (0,27-0,93)
Não	5 (100%)	5 (35,7%)	10 (52,6%)		

A presença de partículas virais como *tax* e *rex* nas amostras de glândula salivar menor foi evidenciada em 4 (80%) pacientes soronegativos para o HTLV-1 e em 11 (78,6%) positivos, esses resultados não mostraram relação estatisticamente significativa ($p=1,000$).

Entre os pacientes positivos para o HTLV-1, dois preencheram os critérios para SS, apresentando sintomas secos, hipossalivação e achados histológicos em glândula salivar menor compatíveis com o estabelecido pelo consenso Americano-Europeu para diagnóstico da SS (Vitali et al., 2002). Sendo assim, para as análises finais optou-se por dividir o total de pacientes em três grupos: com SS; HTLV-1 positivos; e HTLV-1 positivos com SS. Por conseguinte, as alterações histológicas foram correlacionadas com esses três grupos (Tabela 5.15).

Tabela 5.15 – Distribuição do Qui-quadrado para a prevalência das diferenças histológicas entre os grupos (n=19)

	SS (n=5)	HTLV-1 (n=12)	HTLV-1+SS (n=2)	p
Sialodenite linfocitária focal				
Sim	4 (80%)	1 (8,3%)	1 (50%)	0,013
Não	1 (20%)	11 (91,7%)	1 (50%)	
Sialodenite crônica não especificada				
Sim	1 (20%)	11 (91,7%)	1 (50%)	0,013
Não	4 (80%)	1 (8,3%)	1 (50%)	
Atrofia acinar				
Sim	2 (40%)	10 (83,3%)	1 (50%)	0,181
Não	3 (60%)	2 (16,7%)	1 (50%)	
Dilatação ductal				
Sim	3 (60%)	10 (83,3%)	1 (50%)	0,441
Não	2 (40%)	2 (16,7%)	1 (50%)	
Fibrose				
Sim	1 (20%)	10 (83,3%)	1 (50%)	0,044
Não	4 (80%)	2 (16,7%)	1 (50%)	
Infiltração gordurosa				
Sim	0	8 (66,7%)	1 (50%)	0,043
Não	5 (100%)	4 (33,3%)	1 (50%)	

A correlação entre os grupos e parâmetros imuno-histoquímicos também foi verificada, no entanto nenhuma das variáveis apresentou associação estatisticamente significativa (Tabela 5.16). As figuras 5.1, 5.2, 5.3 e 5.4 representam a expressão de CD4+, CD8+, CD20+ e Tax, respectivamente.

Tabela 5.16 – Relação das diferenças dos padrões imunológicos entre os grupos (n=19)

Variáveis	SS (n=5)		HTLV-1 (n=12)		HTLV-1+SS (n=2)		<i>p</i>
	Média	Desvio-padrão	Média	Desvio-padrão	Média	Desvio-padrão	
CD4	4,40	4,40	15,70	23,00	2,10	1,27	0,680
CD8	33,92	31,25	51,45	57,10	38,80	43,84	0,795
CD20	112,16	129,16	21,41	30,57	66,80	43,84	0,115
Linfócitos T	38,36	30,47	67,15	75,38	40,90	42,56	0,504
Linfócitos mononucleares	150,52	146,04	88,56	90,16	107,70	1,27	0,377
Tax	6,60	5,16	7,76	4,93	13,10	1,55	0,288

Os dois pacientes que possuíam concomitância da infecção retroviral e da doença autoimune possuíam nas glândulas salivares menores fragmentos dos genes *tax* e/ou *rex*, no entanto quando comparado com os outros dois grupos esse achado não obteve relevância estatística ($p=0,723$).

Figura 5.1 – Positividade para linfócitos T CD4+ (400X). A e B) em amostras de pacientes HTLV-1+. C) positividade em amostra de paciente com SS e HTLV-1+. D) positividade em amostra de paciente com SS negativo para o HTLV-1

Figura 5.2 – Positividade para linfócitos T CD8+ (400X). A e B) positividade em amostras de pacientes HTLV-1+. C) positividade em amostra de paciente com SS e HTLV-1+. D) positividade em amostra de paciente com SS negativo para o HTLV-1

Figura 5.3 – Positividade para linfócitos B CD20+ (400X). A e B) positividade em amostras de pacientes HTLV-1+. C) positividade em amostra de paciente com SS e HTLV-1+. D) positividade em amostra de paciente com SS negativo para o HTLV-1

Figura 5.4 – Positividade para a proteína Tax do HTLV-1 (400X). A e B) positividade em amostras de pacientes HTLV-1+. C) positividade em amostra de paciente com SS e HTLV-1+. D) positividade em amostra de paciente com SS negativo para o HTLV-1

6 DISCUSSÃO

A capacidade do HTLV-1 de causar uma intensa resposta inflamatória é amplamente relatada na literatura (Sakai et al., 2001; Goon et al., 2004; Bangham; Osame, 2005; Verdonck et al., 2007). Esse fato aliado a dados epidemiológicos que mostram maior frequência de alterações autoimunes em pacientes infectados pelo HTLV-1 (Nishioka et al., 1996; Watanabe, 1997; Verdonck et al., 2007), permitem levantar a hipótese de que esse retrovírus possa funcionar como um patógeno imunoativador para alterações de caráter autoimune.

A SS é uma dessas manifestações autoimunes cada vez mais associadas ao HTLV-1, muitas publicações apontam para uma maior prevalência desse vírus em pessoas acometidas pela SS (Vernant et al., 1987; Vernant et al., 1988; Eguchi et al., 1992; Terada et al., 1994), esses achados contudo, não foram unânimes (Talal et al., 1990; Cartier et al., 1992; Cevallos et al., 1993; Leon-Monzon et al., 1993; Mariette et al., 1995; Rigby et al., 1996; Yamano et al., 1997; Vale et al., 2017). Não obstante, um conceito corriqueiro na literatura que trata desse tema é a alteração secretória relatada por pacientes soropositivos para o HTLV-1, mesmo que por vezes, possa não ser classificada como SS, de acordo com o padronizado pelo Grupo de Estudo da Comunidade Europeia sobre Critérios para Diagnóstico da SS (Vitali et al., 2002), certamente constitui uma síndrome seca importante no manejo desse paciente (Martins et al., 2010; Poetker et al., 2011; Lima et al., 2016; Vale et al., 2017).

No intuito de esclarecer o efeito que a infecção pelo HTLV-1 possa ter nas glândulas exócrinas, análises têm sido feitas em amostras de glândula salivar menor de pacientes infectados e comparadas com amostras teciduais de não infectados, seguindo diversos parâmetros e utilizando variadas técnicas como a imuno-histoquímica, a PCR e a hibridização *in situ* (Shattles et al., 1992; Mariette et al., 1993; Sumida et al., 1994; Rigby et al., 1996; Yamano et al., 1997; Mizokami et al., 1998; Ohyama et al., 1998; Tangy et al., 1999; Cartier et al., 2005; Lee et al., 2012; Nakamura et al., 2013).

Embora o estabelecido para se concluir o diagnóstico da SS determina que, para o preenchimento do critério histopatológico, o mínimo de um foco (aglomerado de 50 ou mais células inflamatórias) deva estar presente em 4mm² de glândula salivar (Vitali et al., 2002), outros grupos propuseram classificações para o padrão disposto pelo infiltrado inflamatório no parênquima glandular. O grupo internacional SICCA descreveu a sialodenite linfocitária focal como a mais específica para o diagnóstico da SS (SICA, 2005; Daniels et al., 2011). De fato, 80% das amostras de glândula salivar menor do GC demonstravam esse padrão.

Das alterações morfológicas, a dilatação ductal foi a mais comumente vista (60%) em biópsias provenientes de pacientes com SS e HTLV-1 negativos. Alterações como, atrofia acinar e fibrose foram menos comuns, 40% e 20% respectivamente. Em nenhuma amostra observou-se infiltração por adipócitos ou centros germinativos, concordando com estudos que confirmaram essas como as alterações estruturais menos frequentes em amostras de glândula salivar menor de pacientes com SS (Llamas-Gutierrez et al., 2014; Costa et al., 2015).

A população linfocitária evidenciada no GE era composta majoritariamente por células B CD20+ (112,16 células em média, por campo), apesar do conhecimento de que a SS tem início com um infiltrado inflamatório predominante de células T e somente com a progressão há uma mudança do fenótipo para células B (Christodoulou et al., 2010; Konsta et al., 2014). Esse resultado, portanto, sugere que todos os pacientes avaliados neste estudo estavam em fases mais tardias, logo mais severas da doença, o que pode indicar a demora desses pacientes em procurarem o diagnóstico, devido aos sintomas serem insidiosos ou a dificuldade de se encontrar profissionais familiarizados com o processo diagnóstico.

Na análise do GE, a maioria (85,71%) das amostras de glândula salivar menor apresentava um infiltrado inflamatório caracterizado como sialodenite crônica não especificada, designação dada na presença de células inflamatórias agrupadas ou dispersas no parênquima e que não estejam adjacentes à ácinos de aparência normal. A presença desse perfil inflamatório tem sido associada à menor produção de citocinas inflamatórias e com sintomas mais brandos (Daniels et al., 2011; Carubbi et al., 2015).

Vários sistemas de graduação da intensidade do infiltrado inflamatório também foram sugeridos como forma de avaliar a progressão e gravidade da doença e consequentemente comparar diferentes populações (Chisholm; Mason, 1968; Greenspan et al., 1974). Em único estudo, encontrado nas principais bases de dados, que se propôs a quantificar os focos inflamatórios observados nas glândulas salivares menores, 60 biópsias de pacientes com SS de uma área altamente endêmica para o HTLV-1 foram analisadas e não foram evidenciadas diferenças estatisticamente significantes na contagem de focos inflamatórios entre pacientes com SS e positivos para o HTLV-1+ e pacientes com SS e negativos para o HTLV-1 (Nakamura et al., 2008) . Embora, a real importância da contagem de focos inflamatórios ainda seja discutida na literatura essa quantificação parece refletir a intensidade da resposta inflamatória e consequente piora dos sinais clínicos. No entanto, como o presente estudo teve por objetivo analisar retrospectivamente amostras de glândula salivar e pela dificuldade durante as biópsias de encontrar tecido glandular em pacientes HTLV-1 positivos, parte dos nossos espécimes não tinham as dimensões mínimas para realização do cálculo de contagem do foco inflamatório estabelecidos pelo grupo SICCA (SICA, 2005).

Um fato que não pode ser desconsiderado é o uso da pulsoterapia como método de controle da dor e progressão da doença pela maioria dos pacientes positivos para o HTLV-1. As altas doses de corticoides administradas de maneira contínua a esses pacientes poderiam alterar não só a severidade e distribuição do infiltrado inflamatório como consequentemente impedir a produção de autoanticorpos. Esse pensamento, aparentemente lógico, encontra discordância na literatura, embora alguns trabalhos já tenham encontrado evidências da influência dos corticoesteróides no infiltrado inflamatório visto na SS outros encontraram dados que refutaram essa ideia (Zandbelt et al., 2001; Pijpe et al., 2007; Alunno et al., 2013). Da amostra estudada, 8 (57,14%) realizavam a pulsoterapia em esquemas mensais ou trimestrais, no entanto o momento escolhido para a biópsia foi sempre antes do início da pulsoterapia, na tentativa de minimizar a interferência dessa medicação nos achados histológicos.

As amostras do GE que exibiram uma inflamação caracterizada como sialodente linfocitária focal mostraram maior predominância de linfócitos B CD20+,

sendo esse dado estatisticamente significativo ($p = 0,022$), de maneira semelhante, portanto, as amostras que apresentaram sialodenite crônica não especificada a maior expressão foi de linfócitos T CD4+ e T CD8+. Padrão visto também em amostras do GC ($p = 0,045$). Evidenciando que a caracterização do infiltrado inflamatório parece ter relação com o fenótipo exibido pelas células inflamatórias.

Alterações morfológicas como atrofia acinar, dilatação ductal fibrose e infiltração gordurosa não mostraram relações estatisticamente significantes com nenhum dos imunofenótipos seja para pacientes do GC ou do GE. A presença da proteína Tax também não pode ser associada a nenhuma das variáveis morfológicas em nenhum dos grupos. Taxas de linfoproliferação, e a presença de partículas virais do HTLV-1 foram analisadas conjuntamente a padrões imuno-histoquímicos e alterações morfológicas, porém nenhuma relação pode ser estabelecida.

Assim como no GC, em nenhuma amostra do GE foi evidenciada a formação de estruturas semelhantes à centros germinativos. No GC isso pode ser justificado pela pequena amostra, já que a literatura aponta para uma frequência de 18 a 59% de centros germinativos (Risselada et al., 2013). Já no GE, a presença de centros germinativos já foi relatada como ocorrência rara em pacientes infectados pelo HTLV-1 (Nakamura et al., 2009), a explicação para isso pode estar no simples fato dos centros germinativos tenderem a se formar quando o infiltrado inflamatório exibem um padrão dominante de linfócitos B (Johnsen et al., 2014) o que não parece ocorrer no infiltrado de glândulas salivares menores de pacientes com HTLV-1. A baixa expressão de linfócitos B quando comparada à expressão de linfócitos T, embora não tenha sido estatisticamente significativa, pode também justificar a falta de autoanticorpos circulantes como anti-SSa e anti-SSb, já que se acredita que sejam essas células as responsáveis pela produção de anticorpos (Candon et al., 2009).

Sendo pacientes acometidos pela síndrome seca, diagnosticados ou não com SS, os pacientes que compunham o GC e o GE possuíam sinais e sintomas secos em proporções equivalentes, denotando a similaridade dos grupos no que diz respeito às características clínicas.

Na análise histológica, no entanto amostras provenientes de pacientes do GE apresentaram com mais frequência sialodenite crônica não especificada, ao contrário das amostras do GC, sendo essa diferença estatisticamente significativa ($p = 0,017$). Outras alterações morfológicas como fibrose e infiltração gordurosa também foram mais comuns no GE (respectivamente, $p = 0,038$ e $p = 0,033$).

Como alguns pacientes do GE foram efetivamente diagnosticados com SS decidimos verificar esses padrões dividindo a amostra total em três grupos: com SS e negativos para o HTLV-1, com SS e positivos para o HTLV-1 e sem SS e positivos para o HTLV-1. Mesmo com um cenário diferente as relações de todos os parâmetros se mantiveram, a sialodenite crônica não especificada foi mais frequente em positivos para o HTLV-1 ($p = 0,013$) e a presença de fibrose e infiltração gordurosa também (respectivamente, $p = 0,044$ e $p = 0,043$).

Na quantificação dos subtipos de linfócitos, amostras de pacientes HTLV-1 positivos com e sem SS apresentaram maior expressão de linfócitos T (respectivamente, 67,15 e 40,90 células marcadas por campo, em média) se comparada à expressão em amostras de pacientes com SS e negativos para o HTLV-1 (38,36 células por campo, em média). Quanto à expressão de linfócitos B CD20+, 21,41 e 66,80 células foram marcadas em média, por campo, nas amostras de pacientes positivos para o HTLV-1 com SS e sem SS, respectivamente e 112,16 em pacientes com SS negativos para o HTLV-1, no entanto essas diferenças não obtiveram significância estatística ($p = 0,377$ para linfócitos T e $p = 0,115$ para linfócitos B CD20+).

A literatura mostra-se escassa quanto à fenotipagem do infiltrado inflamatório visto nas glândulas salivares de infectados pelo HTLV-1, uma predominância de células T em comparação com as células B parece ser o padrão nesses casos (Nakamura et al., 1997; Ohya et al., 1998; Cartier et al., 2005). No entanto, há divergências na predominância dos subtipos de linfócitos T, com alguns estudos mostrando uma população majoritária de linfócitos T CD4+ (Nakamura et al., 1997; Ohya et al., 1998) e outros, como o presente estudo, evidenciando uma maior expressão de linfócitos T CD8+ (Cartier et al., 2005).

De maneira geral, o infiltrado inflamatório das amostras do GE era composto em sua maioria por linfócitos T CD8+ (média de 49,64 células marcadas por campo). Mesmo o papel das células B na infecção pelo HTLV-1 ainda não estar bem elucidado, tendo conhecimento sobre o tropismo exibido por esse vírus por linfócitos T CD4+ (Gessain; Cassar, 2012), juntamente com sua capacidade de causar uma linfoproliferação espontânea de células T (Sakai et al., 2001; Ureta-Vidal et al., 2001; Pinto et al., 2011), um infiltrado inflamatório exibindo esse fenótipo era uma descoberta esperada. O início da patogênese da HAM/TSP é marcado pela fase inflamatória, a princípio representada principalmente por linfócitos T CD4+, essa população tende a diminuir à medida que mais linfócitos citotóxicos (CD8+) chegam ao local da inflamação (Bangham; Osame, 2005; Goncalves et al., 2010). Embora a linfoproliferação desencadeada pelo HTLV-1 afete linfócitos T, células T CD8+ parecem estar mais propensas a se proliferarem (Sakai et al., 2001). Extrapolando esses fatos para a inflamação encontrada nas glândulas salivares de pacientes com HTLV-1, a predominância de linfócitos T CD8+ no infiltrado pode ser explicada ou pela expansão sofrida mais facilmente pelas células T CD8+ ou pelo fato de que, sendo os pacientes selecionados de maneira randômica não houve uniformidade no momento da biópsia em relação ao tempo de infecção pelo HTLV-1 ou ao tempo de progressão da HAM/TSP assim, poderia ser possível que a maioria dos pacientes do GE estivesse em um estado mais avançado da doença, o que causaria uma expressão maior de CD8+ no infiltrado inflamatório.

A expressão da proteína Tax foi levemente menor em amostras do GC (média de 6,60 células por campo) quando comparada a vista no GE (média de 8,53 células por campo) ($p = 0,391$). Na análise por PCR os genes *tax* e/ou *rex* foram amplificados em 80% das amostras do GC e em 78,6% das amostras do GE ($p = 1,000$). Não sendo essas diferenças, portanto, estatisticamente significantes. Diversos estudos têm evidenciado a presença de indícios do HTLV-1, especialmente o gene *tax*, ou sua proteína, nas glândulas salivares de pacientes com SS e soronegativos (Shattles et al., 1992; Mariette et al., 1993; Mariette et al., 1995; Mizokami et al., 1998; Tangy et al., 1999; Mariette et al., 2000). A reatividade nesses pacientes para outras proteínas virais como p19, p 24, p28, transcritas pelo gene *gag*, é variável na literatura. Dois estudos reportaram expressão da p19 (Shattles et al., 1992; Lee et al., 2012), já outro trabalho que utilizou um anticorpo reativo para a

p19 e p28 não obteve marcação. A p24 não teve expressão no único trabalho que a estudou (Shattles et al., 1992). Outras partículas virais do HTLV-1, como *gag*, *pol*, *env*, *LTR* (long terminal repeat), foram pesquisadas por meio da PCR, nenhuma obteve amplificação em glândulas salivares de pacientes com SS e negativos para o HTLV-1 (Mariette et al., 1993; Sumida et al., 1994; Mariette et al., 1995; Yamano et al., 1997; Mizokami et al., 1998; Ohyama et al., 1998; Tangy et al., 1999). Já em amostras de pacientes soropositivos para o HTLV-1 essas sequências foram identificadas, (Mizokami et al., 1998; Ohyama et al., 1998; Tangy et al., 1999), com exceção de um único trabalho que apesar de ter encontrado positividade para o gene *tax* não encontrou para os genes *gag*, *env* e *pol* (Mariette et al., 2000).

Diversas hipóteses têm sido levantadas na tentativa de compreender a presença do gene *tax* nas glândulas salivares de pacientes soronegativos para o HTLV-1. A possibilidade de essa sequência pertencer a um retrovírus endógeno tem sido extensivamente relatada (Sumida et al., 1994; Mariette et al., 1995; Mizokami et al., 1998; Tangy et al., 1999). No entanto, um dos estudos publicados verificou que a sequência encontrada nas glândulas salivares era 98 a 99% homóloga à *pX* e que as sequências endógenas até então descritas possuíam não mais do que 80% de homogeneidade com seu retrovírus exógeno correspondente (Mariette et al., 2000). A segunda hipótese considerada sugere a infecção por um HTLV-1 defeituoso ou uma infecção imperfeita incapaz de induzir uma resposta sorológica. Há relatos na literatura sobre a pesquisa por PCR de fragmentos do HTLV-1 em pacientes soronegativos para o vírus, embora em pacientes que apresentem anticorpos para o HTLV-1 todas as sequências genômicas terem sido amplificadas, para aqueles soronegativos apenas a *tax* foi identificada em 42,5% de pacientes com alterações neurológicas semelhantes à HAM/TSP (Ramirez et al., 2003). Resultados semelhantes foram encontrados em outros estudos similares (d'Auriol et al., 1990; van der Ryst et al., 1996). No entanto, trabalhos pesquisando sequências genômicas do HTLV-1 em soronegativos sem doenças neurológicas não encontraram discrepância entre os resultados obtidos por PCR e por exames de pesquisa de anticorpo (Nakashima et al., 1990; Kinoshita et al., 1993). Embora a literatura não seja unânime, a infecção falha pelo HTLV-1 onde não há produção de anticorpos, porém sequências como a *tax* estão presentes parece ser uma possibilidade e uma

interessante alternativa para a presença desse gene nas glândulas salivares de pessoas com SS e HTLV-1 negativas.

Em trabalhos que encontraram o genoma do HTLV-1 nas glândulas salivares menores de pacientes infectados apenas um realizou a quantificação do DNA pró-viral, encontrando uma quantidade de 8,32 a 8,68 X 10³ maior no tecido glandular do que nas células mononucleares do sangue periférico, através da quantificação da região *pX* (Ohyama et al., 1998). Achado contrário ao presente estudo onde foi visto que, apesar da sequência do HTLV-1 ter sido encontrada nas amostras analisadas o vírus só pode ser quantificado em uma amostra e em valor reduzido.

A utilização dos fragmentos *tax* e *rex* para a realização da PCR qualitativa e do segmento *pol* para a quantificação, poderia explicar essa divergência caso a reação inflamatória vista nas glândulas salivares fosse devido a uma reação cruzada com alguma outra sequência semelhante à *tax*. Partículas virais em quantidades menores que o limite de detecção, porém presentes no parênquima glandular dando início a resposta inflamatória é uma hipótese que também não pode ser descartada.

Já em 1992, Shattles observando a expressão da p19 e a falta de expressão para a p14 do HTLV-1 nas glândulas salivares de indivíduos não infectados pelo vírus pesquisou possíveis reações cruzadas com citoqueratinas teciduais e outros vírus como EBV, citomegalovírus, herpesvírus humano tipo 6 e um retrovírus denominado sequência endógena relacionada ao HTLV (HRES-1), embora a hipótese da reação cruzada com tais proteínas não tenha sido confirmada a possibilidade de que um retrovírus endógeno com uma sequência similar à p19, mas diferente do HRES-1, possa ter sido o responsável pela expressão da p19 não foi afastada pelos autores (Shattles et al., 1992).

Os retrovírus endógenos humanos (HERVs) constituem 8% do genoma humano e embora a maioria seja defectiva sua expressão tem sido reportada em tecidos humanos e especialmente associado a doenças autoimunes e neurodegenerativas (Perzova et al., 2013; Barbeau et al., 2014). As glândulas salivares têm sido reconhecidas como locais de alta expressão dos HERVs (Tanaka et al., 2003; Singh, 2007; Fei et al., 2014). Ainda que, o possível papel dessas sequências não ter sido investigado no âmbito da patogênese da SS, o fato de

agentes externos diversos, entre eles a *tax* do HTLV-1, poder causar a ativação de *LTRs* dos HERVs aumentando assim sua expressão e levando a respostas inflamatórias nesses tecidos (Toufaily et al., 2011; Perzova et al., 2013) pode ser usada para explicar a reação linfocitária vista nas glândulas salivares menores de pacientes soropositivos para o HTLV-1 e talvez explicar também a diferença na população celular vista entre os GC e o GE.

A investigação do papel que o HTLV-1 possa exercer nas exocrinopatias observadas nos pacientes infectados ainda precisa ser mais bem elucidada, o fato do infiltrado inflamatório visto nas glândulas salivares menores exibir um padrão diferente do observado em glândulas de pacientes com SS negativos para o HTLV-1 e em consequência um fenótipo distinto ratifica as evidências de que se trata de alterações com patogêneses diferentes.

7 CONCLUSÕES

Baseado nos dados obtidos neste trabalho, podemos concluir que:

Pacientes soropositivos para o HTLV-1 e com síndrome seca mostraram diferentes alterações morfológicas e padrões de infiltração inflamatória distintos dos apresentados por pacientes com SS e soronegativos para o HTLV-1.

Diferenças no parâmetros imuno-histoquímicos não foram estatisticamente significantes entre os grupos estudados.

A presença de proteína Tax e seu gene foram verificados em grandes proporções em ambos os grupos, no entanto pelo fato de apenas uma proteína e uma sequência genômica do HTLV-1 terem sido pesquisadas não é possível afastar hipóteses relacionadas a reações cruzadas e mimetismos moleculares com proteínas e/ou genes que possam possuir sequências semelhantes ao HTLV-1.

REFERÊNCIAS¹

Alunno A, Petrillo MG, Nocentini G, Bistoni O, Bartoloni E, Caterbi S, et al. Characterization of a new regulatory CD4+ T cell subset in primary Sjogren's syndrome. *Rheumatology (Oxford)*. 2013;52(8):1387-96.

Araujo A, Hall WW. Human T-lymphotropic virus type II and neurological disease. *Ann Neurol*. 2004;56(1):10-9.

Bangham CR, Osame M. Cellular immune response to HTLV-1. *Oncogene*. 2005;24(39):6035-46.

Baratella M, Forlani G, Raval GU, Tedeschi A, Gout O, Gessain A, et al. Cytoplasmic Localization of HTLV-1 HBZ Protein: A Biomarker of HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP). *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(1):e0005285.

Barbeau B, Hiscott J, Bazarbachi A, Carvalho E, Jones K, Martin F, et al. Conference highlights of the 16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and related retroviruses, 26-30 June 2013, Montreal, Canada. *Retrovirology*. 2014;11:19.

Bittencourt AL, da Gracas Vieira M, Brites CR, Farre L, Barbosa HS. Adult T-cell leukemia/lymphoma in Bahia, Brazil: analysis of prognostic factors in a group of 70 patients. *Am J Clin Pathol*. 2007;128(5):875-82.

Candon S, Gottenberg JE, Bengoufa D, Chatenoud L, Mariette X. Quantitative assessment of antibodies to ribonucleoproteins in primary Sjogren syndrome: correlation with B-cell biomarkers and disease activity. *Ann Rheum Dis*. 2009;68(7):1208-12.

Cartier L, Araya F, Castillo JL, Ruiz F, Gormaz A, Tajima K. Progressive spastic paraparesis associated with human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I). *Intern Med*. 1992;31(11):1257-61.

Cartier L, Vergara C, Ramirez E. [Viral Tax protein expression in salivary glands of patients infected with human t-cell lymphotropic virus type I and Sicca Syndrome]. *Rev Med Chil*. 2005;133(10):1183-90.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Carubbi F, Alunno A, Cipriani P, Bartoloni E, Baldini C, Quartuccio L, et al. A retrospective, multicenter study evaluating the prognostic value of minor salivary gland histology in a large cohort of patients with primary Sjogren's syndrome. *Lupus*. 2015;24(3):315-20.

Catalan-Soares B, Carneiro-Proietti AB, Proietti FA. Heterogeneous geographic distribution of human T-cell lymphotropic viruses I and II (HTLV-I/II): serological screening prevalence rates in blood donors from large urban areas in Brazil. *Cad Saude Publica*. 2005;21(3):926-31.

Cevallos R, Geffray L, Guillemin L, Cevallos L, Veyssier P, Darnige L, et al. [Primitive Sjogren's syndrome in France and Ecuador. Possible involvement of HTLV 1]. *Bull Soc Pathol Exot*. 1993;86(5 Pt 2):439-41.

Chisholm DM, Mason DK. Labial salivary gland biopsy in Sjogren's disease. *J Clin Pathol*. 1968;21(5):656-60.

Christodoulou MI, Kapsogeorgou EK, Moutsopoulos HM. Characteristics of the minor salivary gland infiltrates in Sjogren's syndrome. *J Autoimmun*. 2010;34(4):400-7.

Costa S, Quintin-Roue I, Lesourd A, Jousse-Joulin S, Berthelot JM, Hachulla E, et al. Reliability of histopathological salivary gland biopsy assessment in Sjogren's syndrome: a multicentre cohort study. *Rheumatology (Oxford)*. 2015;54(6):1056-64.

Currer R, Van Duyne R, Jaworski E, Guendel I, Sampey G, Das R, et al. HTLV tax: a fascinating multifunctional co-regulator of viral and cellular pathways. *Front Microbiol*. 2012;3:406.

d'Auriol L, Vernant JC, Ouka M, Nerienet E, Buisson G, Neisson-Vernant C, et al. Diagnosis of HTLV-I infected seronegative neurological patients by polymerase chain reaction amplification in Martinique. *Nouv Rev Fr Hematol*. 1990;32(1):113-6.

Dalavanga YA, Drosos AA, Moutsopoulos HM. Labial salivary gland immunopathology in Sjogren's syndrome. *Scand J Rheumatol Suppl*. 1986;61:67-70.

Daniels TE, Cox D, Shiboski CH, Schiodt M, Wu A, Lanfranchi H, et al. Associations between salivary gland histopathologic diagnoses and phenotypic features of Sjogren's syndrome among 1,726 registry participants. *Arthritis Rheum*. 2011;63(7):2021-30.

Delamarre L, Rosenberg AR, Pique C, Pham D, Callebaut I, Dokhelar MC. The HTLV-I envelope glycoproteins: structure and functions. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1996;13 Suppl 1:S85-91.

Eguchi K, Matsuoka N, Ida H, Nakashima M, Sakai M, Sakito S, et al. Primary Sjogren's syndrome with antibodies to HTLV-I: clinical and laboratory features. *Ann Rheum Dis.* 1992;51(6):769-76.

Fei C, Atterby C, Edqvist PH, Ponten F, Zhang WW, Larsson E, et al. Detection of the human endogenous retrovirus ERV3-encoded Env-protein in human tissues using antibody-based proteomics. *J R Soc Med.* 2014;107(1):22-9.

Ferraz-Chaoui AK, Atta AM, Atta ML, Galvao-Castro B, Santiago MB. Study of autoantibodies in patients with keratoconjunctivitis sicca infected by the human T cell lymphotropic virus type 1. *Rheumatol Int.* 2010;30(6):775-8.

Feuer G, Green PL. Comparative biology of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2. *Oncogene.* 2005;24(39):5996-6004.

Fox RI, Stern M, Michelson P. Update in Sjogren syndrome. *Curr Opin Rheumatol.* 2000;12(5):391-8.

Garcia-Vallejo F, Dominguez MC, Tamayo O. Autoimmunity and molecular mimicry in tropical spastic paraparesis/human T-lymphotropic virus-associated myelopathy. *Braz J Med Biol Res.* 2005;38(2):241-50.

Gascon MRP, Casseb J, Smid J, Vidal JE, Fonseca LAM, Paiva A, et al. Cognitive impairment is frequent among symptomatic carriers of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1), regardless of their clinical status. *J Neurol Sci.* 2017;377:185-9.

Gessain A, Barin F, Vernant JC, Gout O, Maurs L, Calender A, et al. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet.* 1985;2(8452):407-10.

Gessain A, Cassar O. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. *Front Microbiol.* 2012;3:388.

Gessain A, Gout O. Chronic myelopathy associated with human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I). *Ann Intern Med.* 1992;117(11):933-46.

Goncalves DU, Proietti FA, Ribas JG, Araujo MG, Pinheiro SR, Guedes AC, et al. Epidemiology, treatment, and prevention of human T-cell leukemia virus type 1-associated diseases. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23(3):577-89.

Goon PK, Igakura T, Hanon E, Mosley AJ, Barfield A, Barnard AL, et al. Human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I)-specific CD4+ T cells: immunodominance hierarchy and preferential infection with HTLV-I. *J Immunol.* 2004;172(3):1735-43.

Green JE, Hinrichs SH, Vogel J, Jay G. Exocrinopathy resembling Sjogren's syndrome in HTLV-1 tax transgenic mice. *Nature.* 1989;341(6237):72-4.

Greenspan JS, Daniels TE, Talal N, Sylvester RA. The histopathology of Sjogren's syndrome in labial salivary gland biopsies. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1974;37(2):217-29.

Hamza N, Bos NA, Kallenberg CG. B-cell populations and sub-populations in Sjogren's syndrome. *Presse Med.* 2012;41(9 Pt 2):e475-83.

Hernandez-Molina G, Leal-Alegre G, Michel-Peregrina M. The meaning of anti-Ro and anti-La antibodies in primary Sjogren's syndrome. *Autoimmun Rev.* 2011;10(3):123-5.

Hirata T, Uchima N, Kishimoto K, Zaha O, Kinjo N, Hokama A, et al. Impairment of host immune response against strongyloides stercoralis by human T cell lymphotropic virus type 1 infection. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;74(2):246-9.

Johnsen SJ, Berget E, Jonsson MV, Helgeland L, Omdal R, Jonsson R. Evaluation of germinal center-like structures and B cell clonality in patients with primary Sjogren syndrome with and without lymphoma. *J Rheumatol.* 2014;41(11):2214-22.

Jonsson R, Vogelsang P, Volchenkov R, Espinosa A, Wahren-Herlenius M, Appel S. The complexity of Sjogren's syndrome: novel aspects on pathogenesis. *Immunol Lett.* 2011;141(1):1-9.

Kalyanaraman VS, Sarngadharan MG, Robert-Guroff M, Miyoshi I, Golde D, Gallo RC. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science.* 1982;218(4572):571-3.

Kaplan JE, Osame M, Kubota H, Igata A, Nishitani H, Maeda Y, 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*. 1990;3(11):1096-101.

Kinoshita T, Imamura J, Nagai H, Ito M, Ito S, Ikeda S, et al. Absence of HTLV-I infection among seronegative subjects in an endemic area of Japan. *Int J Cancer*. 1993;54(1):16-9.

Konsta OD, Thabet Y, Le Dantec C, Brooks WH, Tzioufas AG, Pers JO, et al. The contribution of epigenetics in Sjogren's Syndrome. *Front Genet*. 2014;5:71.

Laine M, Porola P, Udby L, Kjeldsen L, Cowland JB, Borregaard N, et al. Low salivary dehydroepiandrosterone and androgen-regulated cysteine-rich secretory protein 3 levels in Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum*. 2007;56(8):2575-84.

Lee SJ, Lee JS, Shin MG, Tanaka Y, Park DJ, Kim TJ, et al. Detection of HTLV-1 in the labial salivary glands of patients with Sjogren's syndrome: a distinct clinical subgroup? *J Rheumatol*. 2012;39(4):809-15.

Leon-Monzon M, Soriano V, Escudero D, Gonzalez-Lahoz J. [Serologic activity against retrovirus in patients with Sjogren syndrome]. *Med Clin (Barc)*. 1993;100(4):121-4.

Lima CM, Santos S, Dourado A, Carvalho NB, Bittencourt V, Lessa MM, et al. Association of Sicca Syndrome with Proviral Load and Proinflammatory Cytokines in HTLV-1 Infection. *J Immunol Res*. 2016;2016:8402059.

Liquidato BM, Bussoloti Filho I, Camargo ACK, Soler RdC. Aspectos do diagnóstico na Síndrome de Sjögren. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2002;68:363-7.

Llamas-Gutierrez FJ, Reyes E, Martinez B, Hernandez-Molina G. Histopathological environment besides the focus score in Sjogren's syndrome. *Int J Rheum Dis*. 2014;17(8):898-903.

Lopes MSSN, Proietti ABFC. HTLV-1/2 transfusional e hemovigilância: a contribuição dos estudos de look-back. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2008;30:229-40.

Maehara T, Moriyama M, Hayashida JN, Tanaka A, Shinozaki S, Kubo Y, et al. Selective localization of T helper subsets in labial salivary glands from primary Sjogren's syndrome patients. *Clin Exp Immunol*. 2012;169(2):89-99.

Mariette X, Agbalika F, Daniel MT, Bisson M, Lagrange P, Brouet JC, et al. Detection of human T lymphotropic virus type I tax gene in salivary gland epithelium from two patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 1993;36(10):1423-8.

Mariette X, Agbalika F, Zucker-Franklin D, Clerc D, Janin A, Cherot P, et al. Detection of the tax gene of HTLV-I in labial salivary glands from patients with Sjogren's syndrome and other diseases of the oral cavity. *Clin Exp Rheumatol.* 2000;18(3):341-7.

Mariette X, Cherot P, Cazals D, Brocheriou C, Brouet JC, Agbalika F. Antibodies to HTLV-I in Sjogren's syndrome. *Lancet.* 1995;345(8941):71.

Martin F, Taylor GP, Jacobson S. Inflammatory manifestations of HTLV-1 and their therapeutic options. *Expert Rev Clin Immunol.* 2014;10(11):1531-46.

Martins FM, Casseb J, Penalva-de-Oliveira AC, de Paiva MF, Watanuki F, Ortega KL. Oral manifestations of human T-cell lymphotropic virus infection in adult patients from Brazil. *Oral Dis.* 2010;16(2):167-71.

Mavragani CP, Moutsopoulos HM. The geoepidemiology of Sjogren's syndrome. *Autoimmun Rev.* 2010;9(5):A305-10.

Miyazato P, Matsuo M, Katsuya H, Satou Y. Transcriptional and Epigenetic Regulatory Mechanisms Affecting HTLV-1 Provirus. *Viruses.* 2016;8(6).

Mizokami A, Eguchi K, Moriuchi R, Futsuki Y, Terada K, Nakamura H, et al. Low copy numbers of human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) tax-like DNA detected in the salivary gland of seronegative patients with Sjogren's syndrome in an HTLV-I endemic area. *Scand J Rheumatol.* 1998;27(6):435-40.

Mostafa S, Seamon V, Azzarolo AM. Influence of sex hormones and genetic predisposition in Sjogren's syndrome: a new clue to the immunopathogenesis of dry eye disease. *Exp Eye Res.* 2012;96(1):88-97.

Murphy EL, Hanchard B, Figueroa JP, Gibbs WN, Lofters WS, Campbell M, et al. Modelling the risk of adult T-cell leukemia/lymphoma in persons infected with human T-lymphotropic virus type I. *Int J Cancer.* 1989;43(2):250-3.

Nakamura H, Eguchi K, Nakamura T, Mizokami A, Shirabe S, Kawakami A, et al. High prevalence of Sjogren's syndrome in patients with HTLV-I associated myelopathy. *Ann Rheum Dis*. 1997;56(3):167-72.

Nakamura H, Horai Y, Tokuyama A, Yoshimura S, Nakajima H, Ichinose K, et al. HTLV-I virological and histopathological analysis in two cases of anti-centromere-antibody-seropositive Sjogren's syndrome. *Mod Rheumatol*. 2013;23(1):133-9.

Nakamura H, Kawakami A, Hayashi T, Nakamura T, Iwamoto N, Yamasaki S, et al. Low prevalence of ectopic germinal centre formation in patients with HTLV-I-associated Sjogren's syndrome. *Rheumatology (Oxford)*. 2009;48(7):854-5.

Nakamura H, Takagi Y, Kawakami A, Ida H, Nakamura T, Eguchi K. HTLV-I infection results in resistance toward salivary gland destruction of Sjogren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol*. 2008;26(4):653-5.

Nakashima M, Itagaki A, Yamada O, Hagari S, Furukawa A, Kamahora T, et al. Evidence against a seronegative HTLV-I carrier rate among children. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1990;6(9):1057-8.

Nishioka K, Sumida T, Hasunuma T. Human T lymphotropic virus type I in arthropathy and autoimmune disorders. *Arthritis Rheum*. 1996;39(8):1410-8.

Ohyama Y, Nakamura S, Hara H, Shinohara M, Sasaki M, Ikebe-Hiroki A, et al. Accumulation of human T lymphotropic virus type I-infected T cells in the salivary glands of patients with human T lymphotropic virus type I-associated Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum*. 1998;41(11):1972-8.

Okajima R, Casseb J, Sanches JA. Co-presentation of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis and adult-onset infective dermatitis associated with HTLV-1 infection. *Int J Dermatol*. 2013;52(1):63-8.

Orland JR, Engstrom J, Frider J, Sacher RA, Smith JW, Nass C, et al. Prevalence and clinical features of HTLV neurologic disease in the HTLV Outcomes Study. *Neurology*. 2003;61(11):1588-94.

Osame M, Usuku K, Izumo S, Ijichi N, Amitani H, Igata A, et al. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet*. 1986;1(8488):1031-2.

Perzova R, Graziano E, Sanghi S, Welch C, Benz P, Abbott L, et al. Increased seroreactivity to HERV-K10 peptides in patients with HTLV myelopathy. *Viol J.* 2013;10:360.

Pijpe J, Kalk WW, Bootsma H, Spijkervet FK, Kallenberg CG, Vissink A. Progression of salivary gland dysfunction in patients with Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis.* 2007;66(1):107-12.

Pinto LA, Galvao Castro B, Soares MB, Grassi MF. An Evaluation of the Spontaneous Proliferation of Peripheral Blood Mononuclear Cells in HTLV-1-Infected Individuals Using Flow Cytometry. *ISRN Oncol.* 2011;2011:326719.

Poetker SK, Porto AF, Giozza SP, Muniz AL, Caskey MF, Carvalho EM, et al. Clinical manifestations in individuals with recent diagnosis of HTLV type I infection. *J Clin Virol.* 2011;51(1):54-8.

Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980;77(12):7415-9.

Popovic M, Reitz MS, Jr., Sarngadharan MG, Robert-Guroff M, Kalyanaraman VS, Nakao Y, et al. The virus of Japanese adult T-cell leukaemia is a member of the human T-cell leukaemia virus group. *Nature.* 1982;300(5887):63-6.

Proietti FA, Carneiro-Proietti AB, Catalan-Soares BC, Murphy EL. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene.* 2005;24(39):6058-68.

Ramirez E, Fernandez J, Cartier L, Villota C, Rios M. Defective human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) provirus in seronegative tropical spastic paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy (TSP/HAM) patients. *Virus Res.* 2003;91(2):231-9.

Rigby SP, Cooke SP, Weerasinghe D, Venables PJ. Absence of HTLV-1 tax in Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 1996;39(9):1609-11.

Risselada AP, Looije MF, Kruize AA, Bijlsma JW, van Roon JA. The role of ectopic germinal centers in the immunopathology of primary Sjogren's syndrome: a systematic review. *Semin Arthritis Rheum.* 2013;42(4):368-76.

Roman GC, Osame M. Identity of HTLV-I-associated tropical spastic paraparesis and HTLV-I-associated myelopathy. *Lancet*. 1988;1(8586):651.

Sakai JA, Nagai M, Brennan MB, Mora CA, Jacobson S. In vitro spontaneous lymphoproliferation in patients with human T-cell lymphotropic virus type I-associated neurologic disease: predominant expansion of CD8+ T cells. *Blood*. 2001;98(5):1506-11.

Sarigul M, Yazisiz V, Bassorgun CI, Ulker M, Avci AB, Erbasan F, et al. The numbers of Foxp3 + Treg cells are positively correlated with higher grade of infiltration at the salivary glands in primary Sjogren's syndrome. *Lupus*. 2010;19(2):138-45.

Seiki M, Hattori S, Hirayama Y, Yoshida M. Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983;80(12):3618-22.

Shattles WG, Brookes SM, Venables PJ, Clark DA, Maini RN. Expression of antigen reactive with a monoclonal antibody to HTLV-1 P19 in salivary glands in Sjogren's syndrome. *Clin Exp Immunol*. 1992;89(1):46-51.

Shibasaki H, Endo C, Kuroda Y, Kakigi R, Oda K, Komine S. Clinical picture of HTLV-I associated myelopathy. *J Neurol Sci*. 1988;87(1):15-24.

Shimoyama M. Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukaemia-lymphoma. A report from the Lymphoma Study Group (1984-87). *Br J Haematol*. 1991;79(3):428-37.

SICA SsICCA-. Labial Salivary Glands – Histopathological Assessment for General Application. University of California, San Francisco; 2005; Available from: <https://sicca-online.ucsf.edu/Home/Protocols>.

Singh SK. Endogenous retroviruses: suspects in the disease world. *Future Microbiol*. 2007;2(3):269-75.

Sumida T, Yonaha F, Maeda T, Kita Y, Iwamoto I, Koike T, et al. Expression of sequences homologous to HTLV-I tax gene in the labial salivary glands of Japanese patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum*. 1994;37(4):545-50.

Talal N, Dauphinee MJ, Dang H, Alexander SS, Hart DJ, Garry RF. Detection of serum antibodies to retroviral proteins in patients with primary Sjogren's syndrome (autoimmune exocrinopathy). *Arthritis Rheum.* 1990;33(6):774-81.

Tanaka S, Ikeda H, Otsuka N, Yamamoto Y, Sugaya T, Yoshiki T. Tissue specific high level expression of a full length human endogenous retrovirus genome transgene, HERV-R, under control of its own promoter in rats. *Transgenic Res.* 2003;12(3):319-28.

Tangy F, Ossondo M, Vernant JC, Smadja D, Bletry O, Baglin AC, et al. Human T cell leukemia virus type I expression in salivary glands of infected patients. *J Infect Dis.* 1999;179(2):497-502.

Terada K, Katamine S, Eguchi K, Moriuchi R, Kita M, Shimada H, et al. Prevalence of serum and salivary antibodies to HTLV-1 in Sjogren's syndrome. *Lancet.* 1994;344(8930):1116-9.

Toufaily C, Landry S, Leib-Mosch C, Rassart E, Barbeau B. Activation of LTRs from different human endogenous retrovirus (HERV) families by the HTLV-1 tax protein and T-cell activators. *Viruses.* 2011;3(11):2146-59.

Ureta-Vidal A, Pique C, Garcia Z, Dehee A, Tortevoeye P, Desire N, et al. Human T cell leukemia virus Type I (HTLV-I) infection induces greater expansions of CD8 T lymphocytes in persons with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis than in asymptomatic carriers. *J Infect Dis.* 2001;183(6):857-64.

Vale DAD, Casseb J, de Oliveira ACP, Bussoloti Filho I, de Sousa S, Ortega KL. Prevalence of Sjogren's syndrome in Brazilian patients infected with human T-cell lymphotropic virus. *J Oral Pathol Med.* 2017;46(7):543-8.

Valim V, Zandonade E, Pereira AM, de Brito Filho OH, Serrano EV, Musso C, et al. Primary Sjogren's syndrome prevalence in a major metropolitan area in Brazil. *Rev Bras Reumatol.* 2013;53(1):24-34.

van der Ryst E, Smith MS, Visagie HM. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the diagnosis of HTLV-I infection. *J Infect.* 1996;32(2):109-12.

Verdonck K, Gonzalez E, Van Dooren S, Vandamme AM, Vanham G, Gotuzzo E. Human T-lymphotropic virus 1: recent knowledge about an ancient infection. *Lancet Infect Dis.* 2007;7(4):266-81.

Vernant JC, Buisson G, Magdeleine J, De Thore J, Jouannelle A, Neisson-Vernant C, et al. T-lymphocyte alveolitis, tropical spastic paresis, and Sjogren syndrome. *Lancet*. 1988;1(8578):177.

Vernant JC, Buisson GG, Sobesky G, Arfi S, Gervaise G, Roman GC. Can HTLV-1 lead to immunological disease? *Lancet*. 1987;2(8555):404.

Vitali C. Immunopathologic differences of Sjogren's syndrome versus sicca syndrome in HCV and HIV infection. *Arthritis Res Ther*. 2011;13(4):233.

Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, et al. Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis*. 2002;61(6):554-8.

Watanabe T. HTLV-1-associated diseases. *Int J Hematol*. 1997;66(3):257-78.

Wolfe ND, Heneine W, Carr JK, Garcia AD, Shanmugam V, Tamoufe U, et al. Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(22):7994-9.

Yamaguchi T, Ohshima K, Karube K, Tutiya T, Kawano R, Suefuji H, et al. Clinicopathological features of cutaneous lesions of adult T-cell leukaemia/lymphoma. *Br J Dermatol*. 2005;152(1):76-81.

Yamano S, Renard JN, Mizuno F, Narita Y, Uchida Y, Higashiyama H, et al. Retrovirus in salivary glands from patients with Sjogren's syndrome. *J Clin Pathol*. 1997;50(3):223-30.

Zandbelt MM, van den Hoogen FH, de Wilde PC, van den Berg PJ, Schneider HG, van de Putte LB. Reversibility of histological and immunohistological abnormalities in sublabial salivary gland biopsy specimens following treatment with corticosteroids in Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2001;60(5):511-3.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa – FOU SP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 69/11
CAAE 0076.0.017.000-11

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa **APROVOU** o protocolo de pesquisa **"Prevalência de síndrome de Sjögren em uma população vivendo com HTLV-1 em São Paulo"**, de responsabilidade da pesquisadora Daniela Assis do Vale, sob orientação da Profa. Dra. Karem López Ortega.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 28 de setembro de 2011.

Prof. Dra. Márcia Turolla Wanderley
Coordenadora do CEP-FOUSP

ANEXO B – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa – IIER

COORDENADORIA DOS SERVIÇOS DE SAÚDE
INSTITUTO DE INFECTOLOGIA "EMILIO RIBAS"COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Av. Dr. Arnaldo, 165 - Cerqueira César - São Paulo - SP
CEP: 01246-900 – TEL: 3896-1406
E-mail: comitedeetica-iier@ig.com.br66
88

PARECER

PROTOCOLO DE PESQUISA N.º 04/2012

PARECER N.º 039/2012

Data: 02/3/2012

*Título da Pesquisa: "Prevalência de Síndrome de Sjogren em uma população vivendo com HTLV-1 em São Paulo"**Investigador Principal: Dr. Augusto Cesar Penalva de Oliveira**Autor Principal: Daniela Assis do Vale***CONSIDERAÇÕES:** O Comitê de Ética em Pesquisa considera respondida a pendência do parecer anterior e Aprova o estudo e seu TCLE.

(X) APROVADO

() NÃO APROVADO

() COM PENDÊNCIAS- OBS.: a ausência de resposta em 60 dias, acarretará em arquivamento do processo por falta de interesse do pesquisador.

TEMÁTICA ESPECIAL

☐ SIM ☐ NÃO

CONEP

☐ SIM ☐ NÃOSVS (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA) ☐ SIM ☐ NÃO
Dra. Anna Christina Nunes D'Ambrosio
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisas - I.I.E.R

ANEXO C – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa – ISCMSP

IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE S PAULO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS

Rua Santa Isabel, 305, 4º andar - Santa Cecília CEP 01221-010 São Paulo – SP.
 Tel.: (11) 2176-7689 E-mail: eticamedbernadete@santacasasp.org.br

São Paulo, 27 de agosto de 2012.

Projeto nº 119/12 - PB
 Informe este número para
 identificar seu projeto no CEP

Ilmo.(a).Sr. (a).

Dra. Daniela Assis do Vale

Departamento de Otorrinolaringologia

O Comitê de Ética e Pesquisa da ISCMSP, em reunião ordinária dia **25/04/2012** e no cumprimento de suas atribuições, após revisão do seu Projeto de Pesquisa: **"Prevalência de síndrome de Sjögren em uma população vivendo com HTLV-1 em São Paulo"**, emitiu parecer enquadrando-o na seguinte categoria:

☒ **Aprovado (Inclusive TCLE);**

☐ **Com pendências** há modificações ou informações relevantes a serem atendidas em 10 dias, (enviar as alterações em duas cópias);

☐ **Retirado**, (por não ser reapresentado no prazo determinado);

☐ **Não aprovado e;**

☐ **Aprovado (inclusive Termo de Consentimento Livre e Esclarecido), e encaminhado para apreciação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – MS - CONEP, a qual deverá emitir parecer no prazo de 60 dias.** Informamos, outrossim, que, segundo os termos da Resolução 196/96 do Ministério da Saúde a pesquisa só poderá ser iniciada após o recebimento do parecer de aprovação da CONEP.

Prof. Dr. Nelson Keiske Ono

Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa – ISCMSP

Conforme a Resolução 196/96, o relatório parcial deve ser apresentado de forma detalhada ao CEP, inicialmente em **27/02/2013** e a cada seis meses. Conforme ofício circular 0226/CONEP/CNS, datado de 29-10-2010, a suspensão de estudo e relatório final deverão ser apresentados conforme modelo elaborado pela CONEP. Impressos disponíveis em nosso site: www.santacasasp.org.br

ANEXO D – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa – FOU SP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Detecção de proteínas e partículas virais do HTLV-1 em glândulas salivares de pacientes com Síndrome de Sjögren e de infectados pelo HTLV-1

Pesquisador: Karem López Ortega

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 66230317.0.0000.0075

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.006.186

Apresentação do Projeto:

Será um estudo observacional de corte transversal comparativo onde dois grupos serão estudados: Grupo 1: contará com todas as amostras de glândulas salivares obtidas de pacientes com SS primária ou secundária que buscaram o serviço do Ambulatório de Estomatologia do Departamento de Otorrinolaringologia da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (ISCMSP) para diagnóstico e acompanhamento da síndrome. Grupo 2: será composto por amostras de glândulas salivares de pacientes soropositivos para o HTLV-1 do Instituto de Infectologia Emílio Ribas (IIER), diagnosticados previamente com SS ou síndrome sicca. Em ambos os grupos as amostras de glândula salivar foram colhidas em estudo realizado previamente e aprovado pela instituições participantes e proponente (Protocolo 69/11, CAAE 0076.0.017.000.11). Todas as amostras foram coletadas à época e trazidas para análise pelo Serviço de Patologia Cirúrgica vinculada à disciplina de Patologia Oral e Maxilofacial da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, onde hoje encontram-se armazenadas.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Este trabalho tem o objetivo de investigar indícios da presença do HTLV em glândulas salivares menores de pacientes infectados por esse vírus.

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 2.006.186

Objetivo Secundário: a) Verificar a relação entre linfócitos CD4+ e CD8+ no infiltrado inflamatório das glândulas salivares menores de pacientes com SS e de pacientes HTLV-1+. b) Verificar a presença de proteínas virais nas glândulas salivares de pacientes com SS e de pacientes HTLV-1+. c) Verificar a presença e a quantidade de material genético do HTLV-1 nas glândulas salivares de pacientes com SS e de pacientes HTLV-1+.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e benefícios apresentados pela pesquisadora estão adequados.

Riscos: Como não trabalharemos diretamente com os sujeitos da pesquisa e sim com as amostras removidas através de biópsia já realizada os riscos envolvem a manipulação desse material infectado. Para redução desses riscos equipamentos de proteção individual serão utilizados e o manuseio desse material será feito somente em local pré-estabelecido para isso visando a não contaminação das amostras nem a contaminação de outros materiais.

Benefícios: Os benefícios para os pacientes que participaram da primeira fase dessa pesquisa virão a longo prazo, através do reconhecimento de que o HTLV-1 tenha capacidade de causar uma reação linfoproliferativa que englobe também as glândulas salivares confirmando assim, a sialodente como uma das manifestações desse vírus, ampliará o entendimento sobre a patogênese do HTLV-1, suas manifestações clínicas e alterações imunológicas decorrentes da infecção.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é relevante e não apresenta comprometimento ético

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos apresentados pela pesquisadora: 1.Folha de Rosto, 2.Declaração da Patologia, 3.Projeto Detalhado.

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final, utilizando-se da opção "Enviar Notificação" (descrita no Manual "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte - canto superior direito do site www.saude.gov.br/plataformabrasil).

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária CEP: 05.508-900
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 Fax: (11)3091-7814 E-mail: cepfo@usp.br

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 2.006.186

Qualquer alteração no projeto original deve ser apresentada "emenda" a este CEP, de forma objetiva e com justificativas para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_881774.pdf	24/03/2017 13:36:21		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_Pesquisa_HTLV.docx	24/03/2017 13:35:48	Karem López Ortega	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_Patologia.jpg	24/03/2017 13:21:22	Karem López Ortega	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	24/03/2017 13:17:35	Karem López Ortega	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 07 de Abril de 2017

Assinado por:
Maria Gabriela Haye Blazevic
(Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária CEP: 05.508-900
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 Fax: (11)3091-7814 E-mail: cepfo@usp.br