



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA**  
**SAÚDE**



**AVALIAÇÃO DA GRAVIDADE DA PERIODONTITE**  
**CRÔNICA NA INFECÇÃO PELO HTLV-1**

Tiago de Moraes Alves da Cunha

Tese de Doutorado

Salvador (Bahia), 2013

C972 Cunha, Tiago de Morais Alves da  
Avaliação da gravidade da periodontite crônica na infecção pelo  
HTLV-1 / Tiago de Morais Alves da Cunha. – Salvador, 2013.  
87 f.

Orientador: Prof. Dr. Edgar Marcelino de Carvalho

Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia.  
Faculdade de Medicina da Bahia, 2013.

1. Odontologia. 2. Periodontia. 3. Doença Periodontal. I.  
Carvalho, Edgar Marcelino de. II. Universidade Federal da  
Bahia. III. Título.

CDU 616.314.17-008.1



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA**  
**SAÚDE**



**AVALIAÇÃO DA GRAVIDADE DA PERIODONTITE**  
**CRÔNICA NA INFECÇÃO PELO HTLV-1**

Tiago de Moraes Alves da Cunha  
Orientador: Prof. Dr. Edgar Marcelino de Carvalho

Tese apresentada ao Colegiado do  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS DA SAÚDE da Faculdade de  
Medicina da Universidade Federal da Bahia,  
como pré-requisito obrigatório para a  
obtenção do grau de Doutor em Ciências da  
Saúde.

Salvador (Bahia), 2013



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA**  
**SAÚDE**



**TESE DE DOUTORADO**

**AVALIAÇÃO DA GRAVIDADE DA PERIODONTITE CRÔNICA NA**  
**INFEÇÃO PELO HTLV-1**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**MEMBROS TITULARES:**

Profa. Dra. Maria Ilma Araújo, Doutora em Biologia Celular e Molecular – UFBA  
(Presidente);

Profa. Dra. Silvane Maria Braga Santos, Doutora em Imunologia – UFBA;

Profa. Dra. Sara Timóteo Passos, Doutora em Imunologia – UFBA;

Profa. Dra. Silvana Pereira Giozza, Doutora em Imunologia – Ministério da Saúde-Brasília;

Prof. Dr. Alan Araújo de Jesus, Doutor em Biotecnologia - UNIME

**MEMBROS SUPLENTE:**

Prof. Dr. Edgar Marcelino de Carvalho

Salvador (Bahia), 2013

# DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho ao nascimento da minha filha Pietra Jacobino Cunha, cuja luz que trouxe a minha vida foi de essencial importância como motivação para conclusão dessa etapa da minha formação.*

# AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao Professor Dr. Jmary Oliveira pelo incentivo e atenção dispensada para que eu pudesse continuar nessa caminhada.

Ao prof. Dr. Edgar Marcelino de Carvalho por ter aceito a mim como orientando e pela paciência que procedeu comigo nos momentos de dificuldade.

A meus colegas pelo convívio saudável e amizade durante os quatro anos de curso.

Aos colegas de equipe do Curso de Especialização em Prótese Dentária da UNIME, representada por Paulo Rocha, Alan Araújo, Eduardo Oliva, Rosa Amoedo e Márcio Giampá, grupo do qual tenho orgulho de fazer parte, pela ajuda e amizade.

A meu pai, Neidimir Cunha, espelho de caráter e humanidade, minha eterna admiração. Obrigado pelos ensinamentos.

A minha mãe, Aureneide Cunha, espelho de dedicação e amor, meu porto seguro.

A minhas queridas irmãs Taís e Tatiana, por todo o carinho e companheirismo.

# ÍNDICE

Índice de Tabelas	3
Índice de Figuras	4
Lista de Siglas e Abreviaturas	6
I. RESUMO	8
II. INTRODUÇÃO	9
III. REVISÃO DE LITERATURA	11
III.1. Patogênese e manifestações clínicas da infecção pelo HTLV-1	11
III.2. Vírus envolvidos na patogênese da periodontite crônica	14
III.3. Manifestações orais na infecção pelo HTLV-1	21
IV. OBJETIVOS	24
V. MATERIAIS E MÉTODOS	25
V.1. Tipo e desenho do estudo	25
V.2. Definição de caso	25
V.2.1. Pacientes com periodontite crônica e HAM/TSP	25
V.2.2. Pacientes com doença periodontal infectados pelo HTLV-1 sem HAM/TSP	26
V.2.3. Pacientes com doença periodontal não infectados pelo HTLV-1	26
V.3. Critérios de inclusão e exclusão	26
V.4. Aspectos éticos	26
V.5. Avaliação imunológica e carga pró-viral	26
V.6. Avaliação periodontal	27
V.7. Análise estatística	27
VI. RESULTADOS	28

VII. DISCUSSÃO	37
VIII. CONCLUSÕES	43
IX. SUMMARY	44
X. REFERÊNCIAS	45
XI. ANEXOS	54
1. Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (TCLE)	
2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (CEP)	
XII. ARTIGO SUBMETIDO	
1. Journal of Periodontology	



# ÍNDICE DE TABELAS

**Tabela I.** Características demográficas dos pacientes com periodontite crônica infectados pelo HTLV-1 e do grupo controle (sem infecção pelo vírus). 28

**Tabela II.** Frequência da gravidade da periodontite crônica nos pacientes infectados pelo HTLV-1 (com e sem HAM/TSP) e controles (pacientes com periodontite crônica não infectados pelo HTLV-1). 30

# ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Sonda periodontal utilizada para mensurar a perda de inserção clínica. 27
- Figura 2.** Frequência dos diferentes graus de periodontite crônica (leve, moderada e grave) entre indivíduos infectados pelo HTLV-1 e controles não infectados pelo vírus. Análise estatística realizada pelos testes Qui-quadrado (comparação das frequências) e teste exato de Fisher (comparação entre grupos). 29
- Figura 3.** Carga pró-viral em células mononucleares do sangue periférico de indivíduos infectados pelo HTLV-1 com diferentes graus de doença periodontal (leve, moderada e grave). Análise estatística realizada pelo teste de Kruskal-Wallis. 31
- Figura 4.** Carga pró-viral em células mononucleares do sangue periférico de indivíduos infectados pelo HTLV-1 com e sem HAM/TSP e periodontite grave. Análise estatística realizada pelo teste de Mann-Whitney. 32
- Figura 5.** Produção espontânea de IFN- $\gamma$  (A) e TNF- $\alpha$  (B) no sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico de indivíduos infectados pelo HTLV-1 com diferentes graus de periodontite crônica (leve, moderada e grave). Análise estatística realizada pelo teste de Kruskal-Wallis. 33
- Figura 6.** Produção espontânea de IFN- $\gamma$  (A) e TNF- $\alpha$  (B) no sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico de indivíduos com periodontite grave infectados pelo HTLV-1 com e sem HAM/TSP. Análise estatística realizada pelo teste de Mann-Whitney. 34
- Figura 7.** Produção espontânea de IL-5 (A) e IL-10 (B) no sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico de indivíduos infectados pelo HTLV-1 com diferentes graus de periodontite crônica (leve, moderada e grave). Análise estatística realizada pelo teste de Kruskal-Wallis 35

**Figura 8.** Produção espontânea de IL-5 (A) e IL-10 (B) no sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico de indivíduos com periodontite grave infectados pelo HTLV-1 com e sem HAM/TSP. Análise estatística realizada pelo teste de Mann-Whitney. 36

# LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ATLL	Leucemia/Linfoma de células T em Adultos
CMSP	Culturas não estimuladas de células mononucleares do sangue periférico
DNA	Ácido desoxiribonucleico
EBV	Epstein-Barr Vírus
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EDSS	Extended Disability Status Scale
HAM/TSP	Mielopatia associada ao HTLV-1/Paraparesia Espástica Tropical
HCMV	Citomegalovírus Humano
HPV-16	Papiloma Vírus Humano 16
HSV-1	Herpesvírus 1
HTLV	Vírus Linfotrópico Humano de Células T
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HTLV-1	Vírus Linfotrópico Humano de Células T do tipo 1
HTLV-2	Vírus Linfotrópico Humano de Células T do tipo 2
IFN- $\gamma$	Interferon - gama
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6

IL-12	Interleucina 12
IL-17	Interleucina 17
IL-18	Interleucina 18
IL-10	Interleucina 10
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
OMDS	Osame Motor Dysfunction Scale
PCR	Polymerase Chain Reaction
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF- $\beta$	Fator de crescimento celular - beta
Th1, Th2	Células T <i>helper</i> do tipo 1, 2
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral – alfa
UFBA	Universidade Federal da Bahia
UNIME	União Metropolitana de Educação e Cultura
WHO	Organização Mundial de Saúde

# I. RESUMO

**Título.** AVALIAÇÃO DA GRAVIDADE DA PERIODONTITE CRÔNICA NA INFECÇÃO PELO HTLV-1. **Introdução.** Alguns vírus têm sido implicados na patogênese da doença periodontal, potencializando o efeito da reação pró-inflamatória e determinando a gravidade da doença periodontal. **Objetivos.** Avaliar a influência da infecção pelo HTLV-I na gravidade da periodontite crônica e determinar a relação entre produção de citocinas e carga pró-viral e a gravidade da periodontite crônica associada ao HTLV-1 **Material e Métodos.** Participaram do estudo 71 indivíduos infectados pelo HTLV-I com doença periodontal e 72 pacientes com doença periodontal não infectados pelo HTLV-1. Foram comparadas as frequências dos níveis de gravidade da periodontite crônica nos diferentes grupos. A carga pró-viral e a produção espontânea de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-5 e IL-10 em culturas não estimuladas de células mononucleares de sangue periférico (CMSP) foram comparadas na periodontite leve, moderada e grave de indivíduos infectados pelo HTLV-1. **Resultados.** Não houve diferença estatística na frequência da periodontite leve, moderada e grave nos pacientes infectados pelo HTLV-1 com ou sem HAM/TSP (P=0,916). Em comparação ao grupo controle (19,4%), a frequência da forma grave da doença periodontal foi maior nos indivíduos infectados pelo HTLV-1 sendo encontrada em 46,8% e 41,7% respectivamente no grupo de indivíduos infectados pelo HTLV-1 sem doença neurológica e nos pacientes com HAM/TSP (P=0,004). A carga pró-viral nos indivíduos infectados não apresentou diferença e foi de 77.731 cópias/10<sup>6</sup> células (IQ 10.449 – 198.314 cópias/10<sup>6</sup> células) na periodontite grave, 182.701 cópias/10<sup>6</sup> células (IQ 79.059 – 279.369 cópias/10<sup>6</sup> células) na periodontite moderada e 144.457 cópias/10<sup>6</sup> cels (IQ 40.512 – 201.714 cópias/10<sup>6</sup> células) na periodontite leve (P> 0,05). A produção espontânea de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-5 por CMSP de indivíduos infectados pelo HTLV-1 não revelou diferença estatística entre as formas leve, moderada e grave da periodontite crônica. Nos infectados pelo HTLV-1 observou-se uma tendência para diminuição da produção de IL-10 nos indivíduos com periodontite grave (P=0,05). **Conclusões.** A infecção pelo HTLV-1 parece influenciar na gravidade da periodontite crônica. No entanto, a produção espontânea de citocinas e a carga pró-viral não apresentou relação com o aumento da gravidade da periodontite crônica associada ao HTLV-1. **Palavras-Chaves:** 1. HTLV-1; 2. Periodontite crônica; 3. Doença periodontal; 4. Citocinas; 5. Carga pró-viral.

## II. INTRODUÇÃO

O vírus linfotrópico de células T humano tipo 1 (HTLV-1) foi o primeiro retrovírus humano identificado, sendo isolado pela primeira vez em 1980 (Poiesz et al., 1980). O HTLV-2 foi descoberto em 1982 e recentemente foram identificados os tipos 3 e 4. (Calattini et al., 2005; Wolfe et al., 2005)

Estima-se que cerca de 15 a 20 milhões de pessoas estejam infectadas pelo HTLV-1 em todo o mundo. No entanto, algumas regiões específicas como o Japão, Oeste Africano, algumas Ilhas do Caribe e América do Sul apresentam maior prevalência da infecção pelo vírus (Proietti et al., 2005). No Brasil, a cidade de Salvador, no estado da Bahia, figura como a de maior prevalência, registrando índices de 1,76% da população geral (Dourado et al., 2003).

A transmissão do vírus se faz pelo aleitamento materno, via sexual, uso de agulhas contaminadas por usuários de drogas e por transfusão de sangue e de seus derivados contaminados (Barmak K et al., 2003).

Embora a maioria dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 apresente a forma assintomática da doença, cerca de 40% podem apresentar disfunção erétil, neuropatia periférica e distúrbios na função da bexiga (Araújo et al., 1998; Castro et al., 2003). Estima-se que 5% dos indivíduos infectados desenvolvem paraparesia espástica tropical / mielopatia associado ao HTLV-1 (HAM/TSP) ou leucemia/linfoma de célula T em adultos (ATLL) (Manss et al., 1999).

O mecanismo exato da entrada do vírus na célula ainda não está bem elucidado. No entanto, sabe-se que os alvos principais da infecção pelo HTLV-1 são as células T, particularmente os linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Por outro lado, o HTLV-2 infecta, preferencialmente, os linfócitos T CD8<sup>+</sup> (Chen et al., 1983). Essa diferença de tropismo celular pode estar relacionada às diferenças clínicas e à evolução das infecções associadas a estes vírus (Nagai et al., 2001; Furukawa et al., 2003; Goon et al., 2003)

Outras manifestações clínicas têm sido associadas com o HTLV-1. Ainda que todas as doenças, que podem ter este vírus como agente causal, não estejam muito bem estabelecidas, existem fortes evidências de que a infecção pelo HTLV-1 pode estar associada com algumas condições inflamatórias como: uveíte, síndrome seca, polimiosite, alveolite linfocítica e artrite (Murphy et al., 2004). Estudos mostram que manifestações orais como gengivite, periodontite e mucosa oral seca são mais frequentes nos portadores do vírus, mesmo naqueles indivíduos que não desenvolveram mielopatia (Caskey et al., 2007).

A periodontite crônica ou doença periodontal crônica é uma doença infecciosa na qual a resposta inflamatória crônica induz destruição tecidual (Graves & Cochran, 2003; Kinane & Attstrom, 2005). Alguns vírus, dentre os quais pode-se destacar o herpes simples e o citomegalovírus têm sido implicados na patogênese da doença periodontal (Slots et al., 2006; Slots, 2007). A liberação de citocinas induzidas por estes patógenos alteram a natureza da resposta do hospedeiro, potencializando o efeito da reação pró-inflamatória e determinando o aumento da gravidade da doença periodontal (Sanz & Quirynen, 2005; Brito-Mello, 2007), iniciando ou acelerando a destruição tecidual periodontal (Kamma et al., 2001; Saygun et al., 2004a; Saygun et al., 2004b).

Assim como acontece na doença periodontal, as citocinas participam da patogênese da infecção pelo HTLV-1 e dessa forma, a co-infecção com este vírus pode ser considerada um potencial fator modificador no curso da periodontite. De fato, estudos recentes demonstram que problemas bucais são características comuns nos indivíduos infectados e que estes pacientes apresentam maior prevalência de doença periodontal (Garlet et al., 2010).



# III. REVISÃO DE LITERATURA

## 1. Patogênese e manifestações clínicas da infecção pelo HTLV-1

O HTLV-1 é o mais prevalente dos vírus linfotrópicos humanos. Sabe-se que este vírus está relacionado com dois diferentes tipos de doenças incuráveis: mielopatia/paraparesia tropical espástica associada ao HTLV (HAM/TSP) e leucemia/linfoma de célula T em adultos (ATLL) (Verdonck et al., 2007). A HAM/TSP é caracterizada como uma doença inflamatória sistêmica desmielinizante mediada pela resposta imune. ATLL por sua vez constitui-se em uma neoplasia maligna de linfócitos T pleomórficos (Matutes, 2007)

Apesar de o HTLV-1 ter sido o primeiro retrovírus associado à malignidade isolado em humanos, a literatura ainda possui pouca informação a respeito da infecção e patogênese, se comparado a outros retrovírus, como HIV. Provavelmente isso se deva ao fato de o vírus causar doença grave em apenas 5% dos infectados e raramente se associar com o óbito. A HAM/TSP é a manifestação neurológica mais importante e estima-se que essa degeneração seja causada por uma resposta inflamatória exacerbada ao vírus, com predominância de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>. As células T CD4<sup>+</sup> quando infectadas pelo HTLV-1 e as células T CD8<sup>+</sup>, que são geradas para controlar a infecção viral, produzem citocinas pró-inflamatórias neurotóxicas, que são encontradas em altas concentrações no fluido cerebrospinal e lesões espinhais de pacientes com HAM/TSP conduzindo a um processo inflamatório de desmielinização, principalmente na medula espinhal torácica (Goon et al., 2004). O vírus pode permanecer infectando as células T CD4<sup>+</sup> indefinidamente por toda a vida.

A HAM/TSP se associa com lesões em tecidos outros, além do nervoso, especialmente o ocular, reumático e dermatológico. A infecção é mantida pela proliferação de linfócitos que circundam um pró-vírus e expressam proteínas do HTLV-1, especialmente a Tax, promovendo uma seletiva e ativa expansão de células T infectadas (Alberti et al., 2011). O aumento da carga pró-viral está diretamente relacionado com a progressão da doença que por sua vez está correlacionada com o desequilíbrio entre o vírus e o hospedeiro (Sonoda et al., 2004). Linfócitos T citotóxicos são extensamente ativados tanto nos portadores assintomáticos quanto nos que manifestam a forma HAM/TSP. Os indivíduos assintomáticos parecem apresentar alta frequência de monócitos pró-inflamatórios e de células anti-inflamatórias T CD4<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> como mecanismo imunoregulatório para contrabalancear TNF- $\alpha$  derivado de monócitos (Brito-Melo et al., 2007). Quanto à forma HAM/TSP o ambiente pró-inflamatório é a chave do perfil imunológico e um aumento da

frequência de células T CD8<sup>+</sup> ativadas (HLA-DR<sup>+</sup>) em combinação com uma maior expressão de CD18 tem sido observado nesses indivíduos (Nagai et al., 2001). Podem ser encontrados ainda no sangue bem como no fluido cerebrospinal altas concentrações de citocinas pró-inflamatórias como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 e IL-6 (Goon et al., 2003). No que diz respeito à progressão, o polimorfismo do HLA pode influenciar o desenvolvimento da HAM/TSP enquanto que o alelo HLA-A\*2 tem sido associado com proteção (Jeffery et al., 2000). Além disso, parâmetros imunológicos tais como diminuição do percentual de células B, associados ao aumento de células CD8<sup>+</sup> ativadas são apontados como prováveis biomarcadores para o prognóstico da forma HAM/TSP (Gonçalves et al., 2008).

Embora a maioria dos indivíduos infectos não desenvolva nenhuma complicação, estudos recentes mostram um significativo aumento na prevalência de disfunção erétil, neuropatia periférica, alterações funcionais da bexiga e outras manifestações clínicas nos indivíduos infectados pelo HTLV-1 que não preenchem os critérios da organização mundial de saúde para HAM/TSP (Araújo et al., 2009; Santos et al., 2012).

Evidências recentes apontam para uma ligação entre o HTLV-1 e um crescente espectro de doenças tais como: uveíte, distúrbios neurológicos, artropatia e síndrome seca. Com o intuito de identificar possíveis manifestações do vírus em pacientes recém diagnosticados com o vírus, 142 indivíduos foram avaliados em um estudo de prevalência, sendo 71 infectados e 71 controles não infectados. Fatores como dormência nas mãos e pés, dificuldade para correr, noctúria, artralgia e fotofobia foram significativamente mais relatados pelo grupo de pacientes infectados. Sendo estas possíveis manifestações iniciais do HTLV-1, todo paciente tão logo seja diagnosticado deve submeter-se a uma rigorosa busca por esses sintomas (Poetker et al., 2011).

Caskey et al. (2007) pesquisaram a prevalência de determinadas manifestações clínicas em indivíduos portadores do HTLV-1. Foi aplicado um questionário, bem como uma avaliação física em 115 pacientes positivos para o vírus e 115 negativos (Controle). Comparados aos controles, os indivíduos infectados apresentaram maior probabilidade de manifestar fraqueza nos braços e pernas, bem como dormência nas mãos e pés. Artralgia, noctúria e disfunção erétil também foram mais prevalentes nesse grupo. Essas evidências reforçam a ideia de que maior atenção deve ser dada à infecção pelo HTLV-1, já que mesmo aqueles indivíduos que não desenvolvem a forma HAM/TSP podem apresentar outras manifestações clínicas que interferem na qualidade de vida, bem estar e saúde.

Diversos pesquisadores têm encontrado associações do HTLV-1 com a síndrome de Sjögren ou condições similares (Terada et al., 1994; Nakamura et al., 1997; Merle et al., 2002). Um estudo avaliou a frequência e gravidade das complicações em glândulas lacrimais

e salivares nos indivíduos infectados pelo HTLV-1 com ou sem o desenvolvimento da mielopatia. Nos casos avaliados, a síndrome seca foi mais comum no grupo de pacientes com mielopatia. No entanto 22% dos pacientes apenas infectados pelo vírus apresentaram sinais de mucosa oral seca comparáveis àqueles observados nos indivíduos que desenvolveram a forma mielopática. Este trabalho não avaliou a gravidade da periodontite e não foi encontrada correlação entre fluxo salivar e as citocinas pró-inflamatórias TNF $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (Giozza et al., 2007).

A carga pró-viral é um importante marcador biológico para o entendimento da patogênese do vírus e de fato foi observado uma relação direta entre a carga pró-viral na saliva e manifestações bucais (Lins et al., 2012). Além disso, o aumento da carga pró-viral também está associado com outras doenças relacionadas ao HTLV-1, especificamente a HAM/TSP (Demontis et al., 2011). Com o objetivo de avaliar a relação da carga pró-viral com o aparecimento da ceratoconjuntivite seca, Vargens et al. (2011) avaliaram 104 pacientes infectados pelo HTLV-1 com e sem a forma mielopática. A ceratoconjuntivite foi encontrada em 42% dos casos, sendo mais prevalente nos portadores da HAM/TSP. Os pacientes que desenvolveram essa desordem ocular apresentaram carga pró-viral maior comparado àqueles que não desenvolveram. Além disso, foi evidenciado que a carga pró-viral maior que 100.000 cópias/10<sup>6</sup> cels aumentou significativamente o risco de desenvolver a ceratoconjuntivite seca. Os resultados permitiram concluir que além da carga pró-viral do HTLV-1 ser maior nos pacientes com ceratoconjuntivite, a mesma pode constituir-se em um importante marcador biológico para esta doença (Vargens et al., 2011).

Algumas doenças como a tuberculose, podem ter o seu prognóstico alterado quando há co-infecção com retrovírus tais como o HIV e o HTLV, provavelmente pelo efeito na modulação da resposta imune. Estudos indicam que a taxa de mortalidade em pacientes com tuberculose e co-infectados com o HTLV-1 é semelhante às relacionadas com a co-infecção com o HIV (Pedral-Sampaio et al., 1997). Além disso, a contaminação simultânea com esses dois retrovírus tem sido associada com o aumento do risco para o desenvolvimento da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), bem como a elevação da taxa de mortalidade a níveis mais altos (Pedral-Sampaio et al., 1997).

Outro estudo revelou que indivíduos portadores de hepatite C e co-infectados pelo HTLV-1 apresentaram maior incidência e gravidade de doenças no fígado e maior probabilidade de morte por câncer no fígado, o que pode ser explicado pelos efeitos do mecanismo de desregulação da resposta imune na infecção pelo HTLV-1 (Boshi-Pinto et al., 2000).

Por outro lado, o tratamento para infecções por helmintos, reconhecido como modulador da resposta imune, não demonstrou interferir com o curso da progressão da infecção pelo HTLV-1 na medida em que não afetou o risco para o desenvolvimento de doenças neurológicas características (Sundberg et al., 2012).

## **2. Vírus envolvidos na patogênese da periodontite crônica.**

A atual definição de doença periodontal crônica foi introduzida no Workshop mundial para a classificação de condições e doenças periodontais de 1999 (Caton & Armitage, 1999), sendo definida como uma doença inflamatória que resulta em dano periodontal progressivo e lento, relativamente relacionado com a idade. É diferenciada clinicamente da gengivite pela perda de inserção do tecido conjuntivo ao dente, na presença concomitante de inflamação gengival que se não tratada pode levar a perda do elemento dental afetado (American Academy of Periodontology, 1999). Para título de estudos epidemiológicos, a periodontite é mensurada através de limiares específicos de gravidade, levando-se em consideração a extensão da perda de inserção clínica. Dessa forma, pode ser dividida em leve, moderada e avançada (Demmer & Papapanou, 2010).

Dentre os principais eventos histológicos, pode-se destacar: alterações inflamatórias agudas em resposta à colonização microbiana no dente, afluxo de neutrófilos em direção a componentes microbianos do biofilme subgengival, descolamento do epitélio juncional com consequente formação de bolsas, acumulação de células inflamatória crônicas, migração apical do epitélio em direção raiz do dente e reabsorção osteoclástica do osso alveolar (Armitage et al., 2010).

Muitos detalhes da etiologia e patogênese da doença periodontal são ainda desconhecidos, no entanto acredita-se que o mecanismo de destruição tecidual se deve em grande parte à resposta inflamatória e imunológica do hospedeiro frente ao biofilme subgengival (Smith et al., 2010). A periodontite é um processo caracterizado por intenso acúmulo de células envolvidas na resposta imune. Células T apresentam um importante papel na resposta imune, regulando a ativação de células B e plasmócitos nos sítios afetados. (Yamazaki et al., 1995). A presença de variadas espécies gram-negativas na placa subgengival desencadeia uma resposta inflamatória exacerbada envolvendo a liberação de citocinas tais como: TNF- $\alpha$  e interleucinas (IL) 1 $\beta$  que estão relacionadas com a progressão da doença (Graves & Cochran, 2003; Kinane & Attstrom, 2005). Contrariamente, citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 agem para contrabalancear o efeito dos mediadores pró-

inflamatórios nos locais afetados (Claudini et al., 2008). Dessa forma, é provável que o equilíbrio entre a resposta pró-inflamatória e anti-inflamatória seja responsável por direcionar a progressão ou estabilização dos danos teciduais (Teng, 2002; Cardoso et al., 2009).

Além desses fatores, características genéticas em indivíduos susceptíveis são prováveis fatores de risco, todavia seu efeito na expressão da doença ainda permanece pouco elucidado (Stabholz et al., 2010).

A patogênese da periodontite é um processo que envolve a interação multifatorial entre fatores microbianos, do hospedeiro e ambiental. Para o entendimento da patogênese da doença periodontal é importante compreender a inter-relação entre o sistema imunológico do hospedeiro e os patógenos periodontais. Sabe-se que a destruição tecidual é provocada pela associação entre espécies de bactérias específicas e a colonização polimicrobiana da superfície dentária. Entretanto, a quantidade de placa bacteriana por si só não é suficiente para explicar as características clínicas e patológicas da periodontite (Bilichodmath et al., 2009).

De fato, a lista de patógenos envolvidos na patogênese da periodontite vem crescendo e atualmente inclui uma grande variedade de microrganismos que não apenas anaeróbios gram-negativos. O fato de que determinados vírus apresentam papel importante na microbiota da periodontite é atualmente bem estabelecida. Evidências de inúmeros estudos reforçam a idéia de que o desenvolvimento e progressão da doença periodontal está associado com a co-infecção entre vírus e a proliferação de patógenos bacterianos oportunistas oriundos da microbiota subgengival (Contreras et al., 1999; Kamma et al., 2001; Kinane & Attstrom, 2005; Botero et al., 2007; Bilichodmath et al., 2009; Lin & Li, 2009; Chalabi et al., 2010; Bader & Ivic-Kardum, 2011). Um desses exemplos acontece com a infecção por membros da família do herpesvírus, que resulta no aumento de citocinas inflamatórias que por sua vez interrompem a homeostasia entre o hospedeiro e sua flora normal. A alteração inflamatória que se estabelece associada a proliferação bacteriana contribui para o desenvolvimento e progressão da doença (Slots, 2011).

Células inflamatórias associadas ao herpes vírus presente em áreas de inflamação periodontal podem contribuir para o desenvolvimento e alteração no curso da periodontite (Contreras et al., 1999). A quantidade de herpesvírus, incluindo Epstein-Barr vírus e citomegalovirus, é bastante alta na periodontite agressiva e pode interagir sinergicamente com bactérias periodontopatogênicas na etiologia da doença periodontal. O herpesvirus implica na diminuição da resposta imune do hospedeiro no local afetado e dessa forma aumenta a agressividade de bactérias periodontopatogênicas inerentes ao indivíduo. As bactérias por sua vez podem aumentar a virulência do vírus. Sendo assim, a presença de herpesvírus nos sítios periodontais infectados pode resultar em implicações clínicas relevantes (Slots, 2007).

Um estudo demonstrou que o citomegalovírus e o herpes vírus humano 7 podem estar presentes em sítios periodontalmente afetados, no entanto são incomuns em áreas saudáveis (Thomasini et al., 2012). Neste estudo foi encontrada uma correlação entre a presença destes vírus e a diminuição de células CD19<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup>. Além disso, foi constatado que células T, especificamente células T CD4<sup>+</sup> são componentes importantes do infiltrado inflamatório de pacientes portadores de periodontite crônica. Dessa forma diferentes tipos de herpesvírus podem ter papel importante na periodontite crônica através da modulação da resposta de células T (Thomasini et al., 2012).

A infecção por citomegalovírus prejudica os mecanismos de defesa do periodonto permitindo a proliferação de bactérias periodontopatogênicas (Beader & Ivic-Kardum, 2011). Os macrófagos, células que apresentam papel importante no combate a patógenos bacterianos, provavelmente têm sua capacidade funcional alterada pela presença desses vírus, o que inibe os mecanismos de defesa contra microrganismos invasores. A produção de TNF- $\alpha$ , tipicamente induzida por bactérias orais, diminui na infecção por citomegalovírus e Epstein-Barr. Adicionalmente, a atividade fagocítica dos macrófagos é inibida, bem como a expressão do receptor Toll-like 9. Tais alterações podem explicar o papel destes herpesvírus no desenvolvimento da doença periodontal (Lin & Li, 2009).

Com o objetivo de identificar a ocorrência do citomegalovírus em uma população de indivíduos periodontalmente saudáveis, Foglio-Bonda et al. (2010) avaliaram amostras de fluido crevicular gengival em 50 pacientes. As amostras foram obtidas através de duas sondagens livre de sangramento para cada indivíduo, uma na região anterior e outra em posterior. O citomegalovírus foi identificado em 33% dos participantes da pesquisa e sua presença parece não ser influenciada por fumo ou bebidas alcoólicas. No entanto, há estudos que não apontam frequência aumentada desses vírus na superfície subgengival de sítios afetados por periodontite crônica quando comparados com sítios saudáveis, sugerindo que podem haver diferenças em relação a origem das populações estudadas (Combs et al., 2008; Dawson et al., 2009a).

Os resultados do estudo de Botero et al. (2007) corroboram com a ideia da co-infecção entre citomegalovírus e determinadas bactéria serem um importante fator de destruição tecidual na periodontite. De fato nos indivíduos com periodontite a prevalência do vírus foi maior na comparação com os controles saudáveis. A profundidade de sondagem, bem como o nível de inserção clínica também se mostraram aumentadas nos sítios positivos para o citomegalovírus. Além disso, o grupo de pacientes com periodontite demonstrou uma frequência e níveis maiores de bactérias patogênicas específicas nos casos positivos para o vírus.

O Epstein-Barr e o citomegalovírus compreendem os vírus mais estudados em periodontia e estima-se que mais de um milhão de cópias genômicas podem estar presentes em um único sítio periodontal infectado. Além disso, bolsas mais profundas apresentam maior quantidade do vírus se comparado a bolsas periodontais mais superficiais (Saygun et al., 2005). Como a periodontite é iniciada pelo acúmulo de bactérias patogênicas, estes vírus são apontados como grandes responsáveis já que sua presença provoca uma supressão na resposta imune local, permitindo a proliferação de periodontopatógenos. O Epstein-Barr acomete principalmente os linfócitos B enquanto o citomegalovírus infecta monócitos, macrófagos e células T. Estas células inflamatórias quando infectadas produzem citocinas que levam a destruição tecidual, além de diminuir a habilidade do organismo na defesa contra bactérias (Saygun et al., 2002). Possivelmente os vírus agem aumentando a susceptibilidade celular à aderência bacteriana. No que diz respeito ao *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, reconhecido periodontopatógeno, sua aderência às células epiteliais constitui-se em um importante passo para a patogênese da doença periodontal. Um estudo *in vitro* verificou que a aderência dessa bactéria pode ser influenciada pela presença do citomegalovírus (Teughels et al., 2007).

Para confirmar a associação desses herpesvírus com bactérias periodontopagênicas nas lesões periodontais, Saygun et al. (2008) avaliaram 15 pacientes com periodontite e 15 pacientes livres de sinais clínicos de doença periodontal. Em cada grupo, material microbiológico foi coletado utilizando uma cureta, na maior profundidade de sondagem encontrada em cada indivíduo. O objetivo foi identificar a contagem subgingival do citomegalovírus humano, vírus Epstein-Barr, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* e *Campylobacter rectus*. Os resultados confirmaram a associação entre os herpesvírus e bactérias nas lesões periodontais, bem como uma correlação positiva com grau de gravidade da periodontite. A possibilidade de associação entre vírus e patógenos bacterianos também foi objeto de estudo de Sunde et al. (2008). Quando foram analisadas amostras colhidas em bolsas mais profundas, 50% foram positivas para o Epstein-Barr e nenhuma continha citomegalovírus. Nas lesões mais superficiais a proporção foi de 40% para o Epstein-Barr e 12% para o citomegalovírus. Porém a quantidade de vírus encontrada em todos os casos foi próxima ao limite de detecção. Foi observada também uma associação significativa entre o Epstein-Barr e a presença das bactérias *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis*. Ao contrário de outros estudos, os autores afirmam que apesar de ter sido encontrada associação entre o Epstein-Barr e os microrganismos avaliados, parece improvável que estes vírus tenham papel principal na

patogênese da periodontite. Os autores acreditam que a presença dos vírus pode ser reflexo da maior quantidade de sangue e saliva nas amostras dos casos se comparado aos controles, ou devido ao acúmulo dos vírus ao redor de linfócitos nos tecidos inflamados (Sunde et al., 2008).

Estas divergências podem ser explicadas, em parte, pelo tipo de exame utilizado para quantificar e identificar os vírus. Um estudo mostrou que a detecção do citomegalovírus, foi melhor utilizando o PCR aninhado, se comparado ao PCR de tempo real e exame de cultura viral (Botero et al., 2008). Aliado a isso, só houve concordância entre os diferentes tipos de PCR em 47,7% e 4,1% respectivamente para o grupo de pacientes com periodontite e para os controles (Botero et al., 2008). Outro fator importante é a origem da amostra coletada na comparação da presença dos vírus. Para detecção do citomegalovírus e Epstein-Barr foram coletadas amostras de saliva não estimulada, sangue periférico e placa subgengival, sendo posteriormente submetidas ao exame de PCR aninhado. A frequência de detecção do vírus Epstein-Barr na placa subgengival, saliva e sangue periférico foi respectivamente 45%, 37,5% e 25%. Já o citomegalovírus foi encontrado em 82,5% das amostras subgengivais e sangue periférico e em 75% das amostras de saliva. A sensibilidade para detectar o Epstein-Barr na saliva e sangue periférico quando o mesmo era detectado na placa subgengival foi baixa, sendo respectivamente 22% e 27,7%. No entanto, a sensibilidade na detecção do citomegalovírus na saliva e sangue periférico quando encontrado na placa subgengival foi alta, sendo respectivamente 81,8% e 87,8%. Dessa forma sugere-se a combinação de amostras em determinadas situações a fim de evitar resultados falso-negativos (Imbronito et al., 2008).

Jankovic et al. (2011) avaliaram a prevalência do citomegalovírus e Epstein-Barr em sítios com peri-implantite e mucosite, além da correlação entre o herpesvirus e parâmetros clínicos tais como: profundidade de sondagem, índice de placa visível, sangramento à sondagem e presença de supuração. O citomegalovírus foi encontrado em 65% dos locais afetados pela peri-implantite, enquanto o Epstein-Barr teve uma frequência de 45%. Nas áreas com saúde periodontal a proporção foi de 6% e 11% respectivamente para o citomegalovírus e o Epstein-Barr. Foi encontrada uma correlação significativa entre a presença subgengival dos herpesvírus estudados e os parâmetros clínicos avaliados, sugerindo que, assim como na periodontite, os vírus apresentam potencial de ativação da patogênese na peri-implantite.

Algumas doenças sistêmicas podem influenciar na frequência desses vírus. Evidências mostram que as bolsas periodontais rasas de indivíduos portadores de diabetes tipo 2 e periodontite crônica podem apresentar maior quantidade do vírus Epstein-Barr nos casos onde o controle glicêmico esteve ruim. Além disso, os indivíduos livres deste vírus apresentaram controle glicêmico de moderado a bom. Para o citomegalovírus, o controle glicêmico não



influenciou na sua frequência em nenhum dos três tipos de bolsas estudados (Casarin et al., 2010).

Manifestações bucais, especialmente a periodontite, são comuns em indivíduos portadores do vírus HIV. Grande et al. (2008) compararam a frequência do vírus herpes simples (HSV-1), Epstein-Barr vírus (EBV) e citomegalovírus humano (HCMV) na saliva, placa subgingival e sangue periférico de pacientes HIV positivos e negativos portadores de doença periodontal. Foram incluídos no estudo 50 pacientes HIV positivos, sendo 23 com gengivite e 27 com periodontite e 50 pacientes HIV negativos com periodontite crônica. Parâmetros clínicos como: profundidade de sondagem, nível de inserção clínica, índice gengival e índice de placa foram registrados e comparados entre os grupos. O HCMV foi o vírus mais prevalente tanto nos indivíduos HIV- positivos (82%) quanto nos negativos (84%). O HSV-1 foi o menos prevalente nos dois grupos estudados, sendo detectado em frequências similares nos sítios orais e no sangue periférico. O EBV-1 foi o único que apresentou diferenças significativas entre os grupos, sendo encontrado mais frequentemente na saliva e placa subgingival dos indivíduos HIV-positivos. O padrão de citocinas no sangue periférico de indivíduos portadores do HIV e periodontite também sofrem alterações quando comparado àqueles livre de doença periodontal. Os níveis de IL-2 e IL-18 foram significativamente maiores nos portadores do HIV e periodontite. Foi demonstrado também uma correlação positiva entre o grau de gravidade da periodontite e os níveis de IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-18 e células T CD8 nos pacientes positivos para o vírus, sugerindo que estas citocinas podem ser um fator importante na etiopatogenia da periodontite (Falaska et al., 2008).

Grenier et al. (2009) compararam a presença do citomegalovírus, Epstein-Barr e herpes vírus simples no fluido crevicular gengival em 3 diferentes grupos, compostos de indivíduos periodontalmente saudáveis, pacientes com gengivite e pacientes com periodontite. Adicionalmente foi avaliado em um subgrupo de pacientes portadores de periodontite crônica, o efeito do tratamento (raspagem e alisamento radicular) na permanência de vírus herpéticos. Diferenças estatisticamente significantes foram encontradas para a prevalência do citomegalovírus em pacientes saudáveis e com periodontite, sendo respectivamente 8% e 35%. Houve uma associação direta entre prevalência e profundidade de bolsa. No subgrupo dos portadores de periodontite que receberam tratamento pôde-se constatar a eliminação do citomegalovírus e do Epstein-Barr e diminuição da presença do vírus herpes simples. Este estudo demonstrou que o tratamento periodontal é importante para amenização dos efeitos sinérgicos dos vírus na patogênese da doença periodontal, já que promovem a sua eliminação ou diminuição nos sítios afetados (Grenier et al., 2009).

A saliva é um reconhecido veículo de transmissão horizontal dos herpesvírus, no entanto a origem desses vírus na saliva ainda permanece desconhecida. Para avaliar a importância da periodontite como fonte de recurso para herpesvírus orais foram coletadas amostras salivares de indivíduos com periodontite, gengivite e desdentados totais. Concluiu-se que citomegalovírus e Epstein-Barr são comumente encontrados em pacientes com comprometimento periodontal e possivelmente as lesões periodontais funcionam como fonte de origem para algumas espécies de herpesvírus na saliva (Sahin et al., 2009).

Com o objetivo de avaliar o potencial dos microrganismos encontrados na saliva em diagnosticar doença periodontal, comparou-se a quantidade de microrganismos na saliva e na bolsa periodontal mais profunda de indivíduos periodontalmente saudáveis, portadores de gengivite, portadores de periodontite crônica e portadores de periodontite agressiva (Saygun et al., 2011). Os resultados sugeriram que a mensuração das bactérias *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Tannerella forsythia* na saliva parecem ter potencial em diagnosticar a presença da periodontite. No entanto o nível salivar do vírus Epstein-Barr não apresentou diferença estatística entre os quatro grupos (Saygun et al., 2011). A presença do vírus na saliva também aumenta as chances de estarem presentes a nível subgengival. Pacientes com grandes quantidades do Epstein-Barr na saliva apresentaram probabilidade 10 vezes maior de presença no biofilme subgengival se comparados aos indivíduos livres de vírus na saliva. No entanto, não foi encontrada correlação significativa entre a presença do vírus na saliva e a gravidade da doença periodontal (Dawson et al., 2009b).

Apesar de estar presente tanto em indivíduos comprometidos quanto em indivíduos saudáveis, existem relatos de que o Epstein-Barr em estado latente pode ser reativado nos pacientes acometidos por doença periodontal em virtude da presença do *Porphyromonas gingivalis*. Tais indícios sugerem que a periodontite pode contribuir para a progressão de doenças relacionadas ao vírus Epstein-Barr (Imai et al., 2012).

Chalabi et al. (2010) pesquisaram a associação entre a periodontite crônica, bactérias patogênicas e diferentes tipos de herpesvírus. Foram coletadas amostras subgengivais de 40 pacientes periodontalmente saudáveis e 40 portadores de periodontite crônica, com profundidade de sondagem  $\leq$  3 mm ou  $>$  6 mm. Foi encontrada associação entre *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, Epstein-Barr tipo 1, citomegalovírus e a periodontite crônica. No entanto, o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e Epstein-Barr tipo 2 não mostraram associação com sítios comprometidos periodontalmente. Nas áreas com profundidade de sondagem  $\leq$  3 mm, não houve associação significativa com nenhum dos agentes infecciosos estudados. Estes resultados reforçam a hipótese de que na patogênese da doença periodontal crônica, alguns vírus apresentam um importante sinergismo com bactérias.

Este sinergismo tem levado os pesquisadores a pesquisar associações com outros vírus humanos que poderiam influenciar na patogênese da doença periodontal. O papilloma vírus humano-16 (HPV-16) é comumente detectado na mucosa oral normal bem como em lesões orais tais como: carcinoma de células escamosas, condiloma, verruga vulgar, hiperplasia epitelial focal. Supondo que este vírus pudesse estar envolvido no colapso periodontal e que o tecido periodontal funcionasse como um reservatório, sua prevalência foi estudada em indivíduos brasileiros com e sem problemas periodontais. Em nenhum dos 104 indivíduos avaliados foi detectado o HPV-16, dessa forma este vírus não apresentou associação com doença periodontal. Sendo assim, para a população estudada pôde-se concluir que o HPV-16 não teve participação na patogênese da periodontite e que o tecido gengival não age como um reservatório para este vírus (Horewicz et al., 2010).

### **3. Manifestações Oraís na infecção pelo HTLV-1.**

Poucos estudos são direcionados a identificar alterações orais em pacientes soropositivos para o HTLV-1. Por outro lado, diversos pesquisadores têm encontrado associações deste vírus com a síndrome de Sjögren ou condições similares (Terada et al., 1994; Nakamura et al., 1997; Merle et al., 2002).

Por ser a xerostomia uma das manifestações mais comuns dessa síndrome, a hipótese de que a mesma pode ser uma provável consequência da infecção pelo vírus tem levado os pesquisadores a uma maior atenção com a saúde bucal. Martins et al. (2010) verificaram a presença de manifestações orais em uma população de brasileiros infectados pelo HTLV-1 e na tentativa de identificar possíveis fatores de risco. No total, 139 indivíduos foram avaliados, sendo 35,2% portadores de paraparesia tropical espástica/ mielopatia (HAM/TSP). As manifestações orais mais comuns foram a xerostomia (26,8%), candidíase (20,8%), língua fissurada (17,9%) e perda das papilas linguais (17,9%). A análise de regressão logística multivariada revelou que a HAM/TSP é um fator de risco independente para xerostomia, tendo esses indivíduos 3 vezes mais probabilidade de desenvolver tal sintoma, se comparado aos indivíduos apenas infectados.

O HTLV-1 tem sido implicado como agente causal de diversas manifestações clínicas, dentre elas a doença periodontal (Garlet et al., 2010). Tem sido demonstrado que as citocinas participam da patogênese tanto da infecção pelo HTLV-1 quanto da doença periodontal. A infecção pelo HTLV-1 tem sido associada com o aumento da expressão de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  pelas células T CD8<sup>+</sup> e a altos níveis de quimiocinas CXCL9 e CXCL10, que são quimiocinas associadas com a produção de IFN- $\gamma$  e atração de células T ao local de inflamação (Santos et

al., 2004; Guerreiro et al., 2006). De fato, o aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias Th1, bem como células T autorreativas observados na infecção pelo vírus, em parte se deve a uma deficiência na função das células T regulatórias e a diminuição da habilidade da IL-10 e TGF- $\beta$  em modular a resposta imune (Santos et al., 2006). Dessa forma a infecção pelo HTLV-1 pode ser considerada um potencial fator de modificação na patogênese da doença periodontal (Manns et al., 1999; Graves & Cochran, 2003).

Para verificar a possível influência do vírus na patogênese da periodontite, Garlet et al. (2010) compararam biópsias de sítios periodontais de pacientes HTLV-1 positivos com periodontite crônica, HTLV-1 negativos com periodontite crônica, e indivíduos sem doença periodontal e sem infecção pelo HTLV. Os pacientes com associação do vírus e periodontite apresentaram valores significativamente maiores de sangramento à sondagem, profundidade de bolsa e perda de inserção quando comparados ao grupo apenas com doença periodontal. Com relação à produção de citocinas, a expressão de TNF- $\alpha$  e IL-4 foi semelhante nos dois grupos com doença periodontal, enquanto que IL-12 e IL-17 foram maiores no grupo positivo para o vírus. Em comparação com o grupo de indivíduos com periodontite e HTLV-1 negativos houve um aumento significativo dos níveis de IL-1 $\beta$  e IFN- $\gamma$  no grupo dos portadores. No entanto, a expressão dos marcadores de células T regulatórias FOXP3 e IL-10 foi significativamente menor nesse grupo. Devido ao aumento da intensidade dos parâmetros clínicos da doença periodontal nos pacientes infectados pelo HTLV, bem como a desregulação na produção de citocinas evidenciada nesses indivíduos, os autores posteriormente investigaram se esses resultados poderiam estar associados com diferenças na carga e frequência de periodontopatógenos e vírus em bolsas periodontais. Todos os patógenos avaliados foram bem menos frequentes nos pacientes sem doença periodontal. Entretanto, a frequência dos vírus: herpes simples-1, citomegalovírus e Epstein-Barr e a frequência e carga dos periodontopatógenos: *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, não apresentou diferença nos dois grupos. Esses resultados sugeriram que o HTLV-1, assim como outros vírus, pode ter um papel importante na patogênese da doença periodontal pelo potencial de alteração na produção de citocinas (Garlet et al., 2010).

O aumento da carga pró-viral tem sido observado em várias manifestações clínicas da infecção pelo HTLV-1. Estudo avaliando o perfil da saúde oral de indivíduos infectados pelo vírus com e sem HAM/TSP, visando identificar provável associação entre a carga pró-viral na saliva e a gravidade da doença periodontal, além de examinar variações entre células mononucleares do sangue periférico e células da saliva encontrou uma fraca correlação positiva entre a carga pró-viral na saliva e no sangue, sendo a média dos valores encontrados

nos pacientes HAM/TSP maior do que a dos indivíduos apenas infectados pelo vírus. Adicionalmente foi observada uma relação direta entre a carga pró-viral na saliva e manifestações bucais (Lins et al., 2012).

Um estudo recente observou uma alta frequência de gengivite, periodontite e mucosa oral seca em pacientes positivos para o HTLV-1, mas sem desenvolvimento da mielopatia. É provável que essas manifestações orais estejam ligadas a uma exagerada resposta imune Th1 associada a infecção pelo vírus, ou até mesmo pela influência direta do vírus. No entanto, para comprovar a influência isolada do vírus é necessário eliminar fatores confundidores como o hábito de fumar, presença de doenças sistêmicas e/ou outras infecções virais, o que reconhecidamente não foi ajustado pelos autores (Caskey et al., 2007).

Tendo em vista a influência de determinados vírus na patogênese da doença periodontal crônica, e o fato de estudos apontarem para o aumento da frequência de manifestações orais em indivíduos infectados pelo vírus HTLV-1, o objetivo do corrente estudo foi avaliar a gravidade da doença periodontal na infecção pelo HTLV-1 comparando esta gravidade com a documentada em indivíduos com periodontite sem infecção pelo HTLV-1, determinar se a gravidade da periodontite é maior em pacientes com mielopatia do que em indivíduos infectados pelo vírus, mas sem doença neurológica e verificar se a produção espontânea de citocinas e carga pró-viral se correlacionam com a gravidade da doença periodontal crônica.

Baseado nos dados apresentados, nossa hipótese é de que indivíduos infectados pelo HTLV-1 apresentam uma maior gravidade da doença periodontal em decorrência de uma maior produção de citocinas pró-inflamatórias e carga pró-viral.

## IV. OBJETIVOS

➤ Geral: avaliar a associação entre o HTLV-1 e a gravidade da doença periodontal crônica.

➤ Específicos:

1. Comparar a gravidade da periodontite crônica em indivíduos infectados ou não pelo HTLV-1;
2. Avaliar a existência de associação entre gravidade da doença periodontal crônica com doença neurológica associada ao HTLV-1;
3. Avaliar a existência de associação entre produção de citocinas inflamatórias e gravidade da doença periodontal crônica em indivíduos infectados pelo HTLV-1.
4. Avaliar a existência de associação entre a carga pró-viral e a gravidade da doença periodontal crônica em indivíduos infectados pelo HTLV-1.

# V.MATERIAL E MÉTODOS

## 1. Tipo e desenho do estudo

Estudo de corte transversal com o objetivo de avaliar a associação entre HTLV-1 e a gravidade da doença periodontal crônica em três grupos de estudo: **1)** Indivíduos infectados pelo HTLV-1 sem HAM/TSP com periodontite; **2)** Indivíduos infectados pelo HTLV-1 com HAM/TSP e periodontite crônica; **3)** Pacientes com periodontite não infectados pelo vírus HTLV-1 (Controle).

Após cálculo amostral e assumindo um poder estatístico de 80%, foram incluídos no presente estudo 71 indivíduos infectados pelo HTLV-1 e acompanhados no Ambulatório Multidisciplinar de HTLV-1 do Serviço de Imunologia – Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos (Com-HUPES) da Universidade Federal da Bahia (UFBA) no período de 2008 a 2012. Em todos os indivíduos encaminhados para atendimento no referido ambulatório, o diagnóstico da infecção viral é realizado com base na detecção de anticorpos anti-HTLV-1 pelo método de ELISA (Cambridge BiotechCorp., Worcester, MA) e confirmado pela técnica de Western-blot (HTLV blot 2.4; Genelab, Singapore). Como grupo controle participaram 72 pacientes com periodontite crônica, não infectados pelo HTLV-1 e acompanhados no ambulatório do Curso de Especialização em Periodontia da Faculdade de Ciências Agrárias e da Saúde da União Metropolitana de Educação e Cultura (UNIME) no período de Janeiro a Agosto de 2012. Os dados desses pacientes foram obtidos através da revisão e avaliação dos prontuários.

Duas escalas foram utilizadas para a avaliação do comprometimento neurológico associado ao HTLV-1: a OMDS “Osame Motor Dysfunction Scale” e a EDSS “Extended Disability Status Scale”.

## 2. Definição de caso

### • *2.1 Pacientes com periodontite crônica e HAM/TSP:*

Pacientes com inflamação crônica e perda de inserção periodontal determinada por sondagem associados à placa bacteriana ou cálculo dental, de acordo com critérios estabelecidos no Workshop mundial para a classificação de condições e doenças periodontais de 1999 (Caton & Armitage, 1999). Diagnóstico de HAM/TSP baseado nos critérios da

Organização Mundial de Saúde (WHO, 1989). Além das manifestações neurológicas todos os pacientes apresentavam EDSS  $\geq 3$  e OMDS  $\geq 1$ .

- **2.2 Pacientes com doença periodontal infectados pelo HTLV-1 sem HAM/TSP:**

Pacientes com doença periodontal diagnosticados de acordo com critérios estabelecidos no item 2.1 e com EDSS e OMDS igual a zero.

- **2.3. Pacientes com doença periodontal não infectados pelo HTLV-1:**

Pacientes com doença periodontal diagnosticados de acordo com critérios estabelecidos no item 2.1 acompanhados no ambulatório do Curso de Especialização em Periodontia da UNIME.

### **3. Critérios de inclusão e exclusão**

- **3.1. Critérios de Inclusão:**

Pacientes de ambos os sexos e com idade superior a 18 anos com periodontite crônica e sem tratamento periodontal ou uso de antibióticos por pelo menos 6 meses antes do início da pesquisa. Além disso, todos os indivíduos possuíam um total de 8 ou mais dentes.

- **3.2. Critérios de Exclusão:**

Pacientes co-infectados pelo HIV e pelo vírus C da hepatite, agentes que reconhecidamente interferem com o curso da doença periodontal crônica. Pacientes do sexo feminino em período de gravidez, portadores de diabetes mellitus, fumantes, indivíduos com infecção helmíntica e portadores de outras desordens neurológicas.

### **4. Aspectos éticos**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Com-HUPES (Protocolo N<sup>o</sup> 014/08) e todos os participantes assinaram Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE).

### **5. Avaliação imunológica e carga pró-viral**

Todos os participantes do ambulatório multidisciplinar de HTLV-1 têm determinado por ocasião da sua admissão no ambulatório, e periodicamente, a produção de TNF  $\alpha$ , INF  $\gamma$ , IL-5 e IL-10 e carga pró-viral. Os dados apresentados com relação a essas variáveis foram obtidos do banco de dados do Ambulatório Multidisciplinar de HTLV-1 do Serviço de



Imunologia (Com-HUPES) sendo utilizado a avaliação realizada durante o período de estudo (2008 a 2012). De modo sucinto a produção de citocinas foi determinada pela técnica de ELISA em sobrenadante de culturas não estimuladas de células mononucleares do sangue periférico cultivadas por 72 horas conforme previamente descrito (Santos et al. 2004). Para determinação da carga pró-viral, de modo sucinto, o DNA foi extraído das células mononucleares utilizando proteinase K, e a carga pró-viral de HTLV-1 foi quantificada pelo PCR em tempo real (Dehee et al.,2002).

## 6. Avaliação Periodontal

Os pacientes foram avaliados quanto a gravidade da doença periodontal crônica segundo os critérios estabelecidos no 1999 International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions (Caton & Armitage, 1999). Dessa forma, a gravidade foi determinada pela perda de inserção periodontal ou inserção clínica sendo considerada: **leve (1 a 2 mm)**, **moderada (3 a 4mm)** e **grave ( $\geq 5\text{mm}$ )**.

A perda de inserção periodontal foi mensurada clinicamente como a distância entre a junção cimento-esmalte e a profundidade de sondagem, naqueles indivíduos com sinal de doença periodontal com profundidade de sondagem superior a 3mm. As sondagens foram realizadas por um examinador devidamente treinado e calibrado, mensurando 6 diferentes áreas por dente (Mesial, Meio e Distal) nas faces vestibular e lingual, utilizando o mesmo tipo de sonda periodontal (UNC-15, Hu-Friedy, Chicago, IL, USA) com força moderada de sondagem correspondente a aproximadamente 0,25N.



**Figura 1.** Sonda periodontal utilizada para mensurar a perda de inserção clínica.

## 7. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas pelo “software” GraphPad Prism v. 5.0, e os resultados das análises univariadas considerados significantes se a probabilidade (p) do erro  $\alpha$  foi  $\leq 5\%$  ( $p \leq 0,05$ ). A significância das diferenças observadas na frequência da gravidade da doença periodontal nos diferentes grupos foi identificada através do teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ). O teste exato de Fisher foi utilizado para comparação dos diferentes graus de periodontite

crônica entre os grupos. Os dados da carga pró-viral e as concentrações de citocinas foram expressos como mediana e interalo interquartil (IQ). O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn's, foi utilizado para identificar diferenças entre os diferentes grupos de pacientes com doença periodontal crônica.

## VI. RESULTADOS

As características demográficas dos pacientes com periodontite crônica, infectados ou não pelo HTLV-1 são mostrados na Tabela I.

**Tabela I. Características demográficas dos pacientes com periodontite crônica infectados pelo HTLV-1 e do grupo controle (sem infecção pelo vírus).**

<b>Características</b>	<b>HTLV-1 (n= 71)</b>	<b>Controle (n= 72)</b>	<b>P</b>
<b>Idade</b>			0,26 <sup>a</sup>
<b>Média (DP)</b>	54,47 (11,69)	50,13 (11,65)	
<b>Gênero</b>			0,34 <sup>b</sup>
<b>Feminino, n (%)</b>	43 (60,6)	49 (68,1)	
<b>Masculino, n (%)</b>	28 (39,4)	23 (31,9)	
<b>Raça/Etnia</b>			0,85 <sup>b</sup>
<b>Branco, n (%)</b>	16 (22,5)	19 (26,4)	
<b>Mulato, n (%)</b>	30 (42,3)	25 (34,7)	
<b>Negro, n (%)</b>	25 (35,2)	28 (38,9)	
<b>Outros</b>	0	0	

<sup>a</sup> Teste de Mann Whitney.

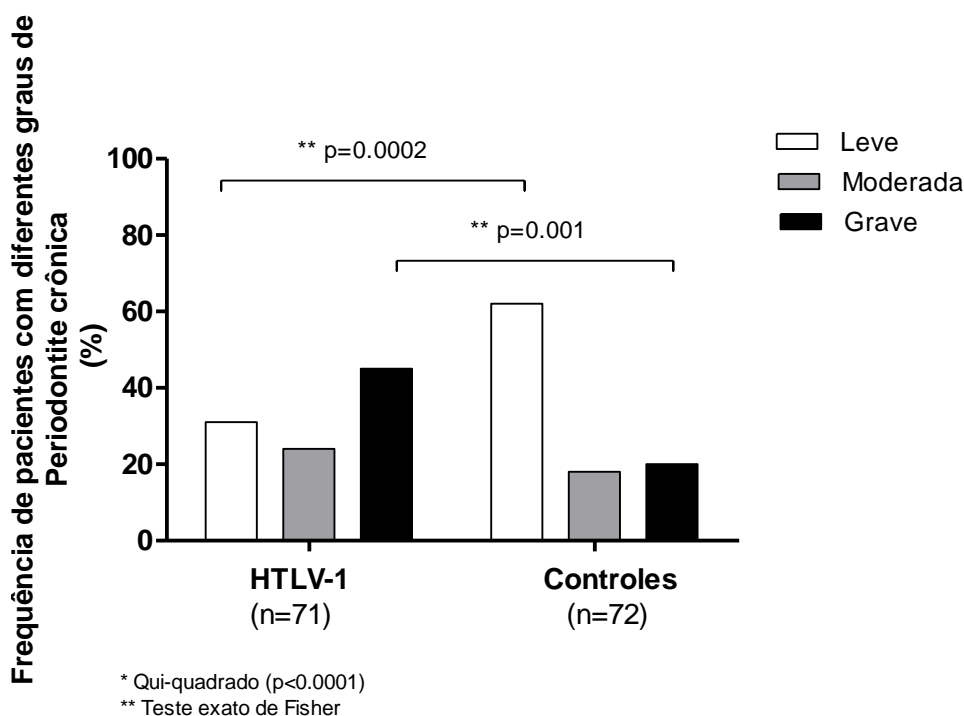
<sup>b</sup> Teste do Qui-quadrado

A população de estudo foi constituída de 143 pacientes com periodontite crônica (71 pacientes infectados pelo HTLV-1 e 72 não infectados, formando o grupo controle). Não foram observadas diferenças quanto à idade quando os pacientes infectados pelo HTLV-1 (média 54,47 anos, DP 11,69 anos) foram comparados com o grupo controle (média 50,13 anos, DP 11,65 anos),  $p=0,26$ . A maioria dos pacientes tinha idade superior aos 50 anos com variação de 24 a 77 anos. Não foram observadas diferenças na frequência de brancos, mulatos ou negros entre os grupos ( $p=0,85$ ). Da mesma forma, também não houve diferença quanto ao gênero ( $p=0,34$ ).

## Gravidade da periodontite crônica em pacientes infectados pelo HTLV-1 e pacientes não infectados.

A Figura 2 compara a gravidade da periodontite crônica entre indivíduos infectados pelo HTLV-1 e no grupo controle (pacientes com periodontite crônica e não infectados pelo HTLV-1).

**Figura 2.**



**Figura 2.** Frequência dos diferentes graus de periodontite crônica (leve, moderada e grave) entre indivíduos infectados pelo HTLV-1 e controles não infectados pelo vírus. Análise estatística realizada pelos testes Qui-quadrado (comparação das frequências) e teste exato de Fisher (comparação entre grupos).

Foram analisados 71 indivíduos com periodontite crônica e infectados pelo HTLV-1 e 72 indivíduos com periodontite crônica sem infecção pelo HTLV-1 (grupo controle). Entre os indivíduos infectados pelo HTLV-1, 22 (31%) apresentaram periodontite crônica leve, 17 (24%), moderada e 32 (45%) periodontite grave. Entre os pacientes sem infecção pelo HTLV-1, 45 (62%) apresentaram periodontite leve, 13 (18%), moderada e 14 (20%) periodontite grave (Qui-quadrado,  $p < 0,0001$ ). Observamos que a forma grave da periodontite crônica foi maior entre os indivíduos infectados pelo HTLV-1 (32/71) quando comparada com os

pacientes sem infecção pelo HTLV-1 (14/72),  $p=0,001$ , teste exato de Fisher. A forma leve da periodontite crônica foi maior entre os controles (45/72) quando comparada com os indivíduos infectados pelo HTLV-1 (22/71),  $p=0,0002$ . Não houve diferença quanto ao grau de periodontite crônica moderada entre os grupos ( $p=0,4$ )

**Gravidade da periodontite crônica considerando os indivíduos infectados pelo HTLV-1 com HAM/TSP, infectados sem HAM/TSP e controles (pacientes com periodontite crônica não infectados pelo HTLV-1).**

Para verificar se a forma grave da periodontite crônica era mais frequente entre os indivíduos infectados pelo HTLV-1 com doença neurológica, utilizamos informações contidas no banco de dados da coorte de HTLV (escalas de OSAME e EDSS) e dividimos os indivíduos infectados pelo HTLV-1 que participaram deste estudo em dois grupos distintos. O primeiro grupo constituído de pacientes sem HAM/TSP ( $n= 47$ ) e o outro grupo de pacientes que desenvolveram mielopatia associada ao HTLV-1 ( $n= 24$ ). A Tabela II compara a frequência dos diferentes graus da periodontite crônica entre os pacientes com periodontite crônica com e sem HAM/TSP e os controles (pacientes com periodontite crônica não infectados pelo HTLV-1).

**Tabela II. Frequência da gravidade da periodontite crônica nos pacientes infectados pelo HTLV-1 (com e sem HAM/TSP) e controles (pacientes com periodontite crônica não infectados pelo HTLV-1).**

Periodontite crônica	Forma clínica da infecção pelo HTLV-1		Controle	$p^a$
	Sem HAM/TSP ( $n= 47$ )	HAM/TSP ( $n= 24$ )	Não infectados ( $n= 72$ )	
	n (%)	n (%)	n (%)	
Leve	14 (29,8%)	8 (33,3%)	45 (62,5%) <sup>c</sup>	0,0008
Moderada	11 (23,4%)	6 (25,0%)	13 (18,1%)	0,68
Grave	22 (46,8%) <sup>b</sup>	10 (41,7%) <sup>b</sup>	14 (19,4%)	0,004

<sup>a</sup>Análise estatística pelo teste do Qui-quadrado.

<sup>b</sup>Diferença estatisticamente significativa comparado ao grupo controle.

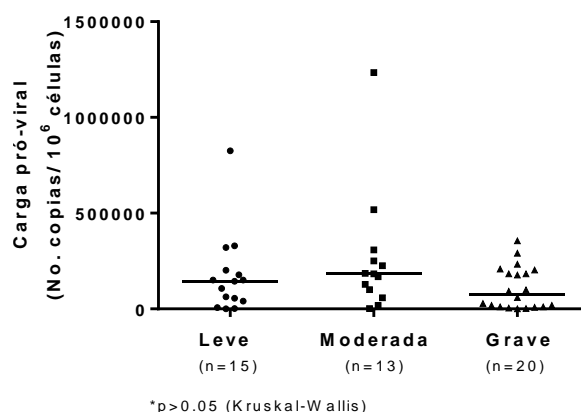
<sup>c</sup>Diferença estatisticamente significativa em comparado aos pacientes infectados com e sem HAM/TSP.

As formas leve, moderada e grave da doença periodontal apresentaram distribuição semelhante nos indivíduos infectados pelo HTLV-1 sem doença neurológica e nos pacientes com HAM/TSP. Não foi encontrada diferença estatística com relação à gravidade da doença periodontal para estes dois grupos ( $p=0,916$ , teste do Qui-quadrado). Todavia, houve uma associação da gravidade da doença periodontal com infecção pelo HTLV-1, independente da presença ou não de HAM/TSP, desde que periodontite mais grave foi mais frequente nos indivíduos infectados pelo HTLV-1 do que em pacientes com periodontite crônica sem infecção pelo HTLV-1 ( $p=0,004$ ). A frequência da periodontite moderada foi semelhante nos 3 grupos avaliados, sendo 23,4%, 25% e 18,1% respectivamente para os pacientes infectados pelo HTLV-1 sem doença neurológica, pacientes com HAM/TSP e pacientes não infectados pelo HTLV-1 ( $p=0,68$ ). Como já observado anteriormente, a frequência de periodontite leve foi maior nos pacientes sem infecção pelo HTLV-1 quando comparados aos pacientes infectados pelo HTLV-1 independente do desenvolvimento ou não da doença neurológica ( $p=0,0008$ ).

### **Carga pró-viral em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com periodontite crônica e infectados pelo HTLV-1.**

A Figura 3 representa a carga pró-viral do HTLV-1 nas células dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 com diferentes graus de periodontite crônica (leve, moderada e grave).

**Figura 3.**



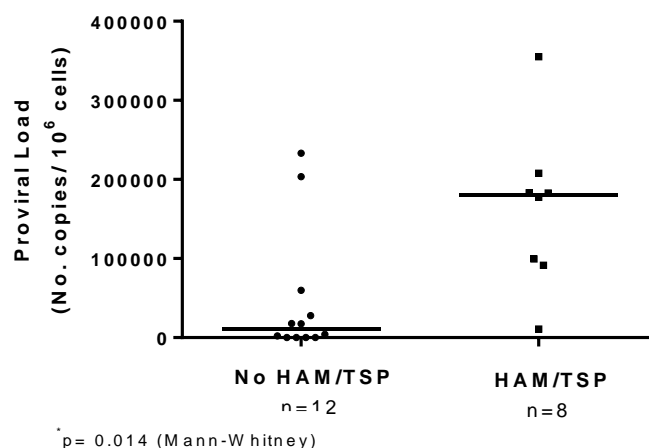
**Figura 3.** Carga pró-viral em células mononucleares do sangue periférico de indivíduos infectados pelo HTLV-1 com diferentes graus de doença periodontal (leve, moderada e grave). Análise estatística realizada pelo teste de Kruskal-Wallis.

Dos 71 pacientes com periodontite crônica, infectados pelo HTLV-1, somente 48 apresentavam o registro da carga pró-viral no banco de dados. Destes, 15 pacientes apresentavam periodontite leve, 13 periodontite moderada e 20 apresentavam a forma grave da periodontite crônica. A mediana da carga pró-viral das células dos pacientes com periodontite leve foi de 144.457 cópias/ $10^6$  células (IQ 40.512 – 201.714 cópias/ $10^6$  células). A mediana da carga pró-viral dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 com periodontite crônica grave foi de 77.731 cópias/ $10^6$  células (IQ 10.449 – 198.314 cópias/ $10^6$  células) enquanto os pacientes com periodontite crônica moderada apresentavam uma carga pró-viral de 182.701 cópias/ $10^6$  células (IQ 79.059 – 279.369 cópias/ $10^6$  células). Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos ( $P > 0,05$ , Teste de Kruskal-Wallis).

Posteriormente a carga pró-viral nos pacientes com periodontite grave foi comparada entre os indivíduos infectados com e sem HAM/TSP, com a finalidade de observar uma possível influência da mielopatia na forma grave da doença periodontal.

A figura 4 mostra a carga pró-viral nos pacientes com periodontite grave infectados pelo HTLV-1 com e sem HAM/TSP.

**Figura 4.**



**Figura 4.** Carga pró-viral em células mononucleares do sangue periférico de indivíduos infectados pelo HTLV-1 com e sem HAM/TSP e periodontite grave. Análise estatística realizada pelo teste de Mann-Whitney.

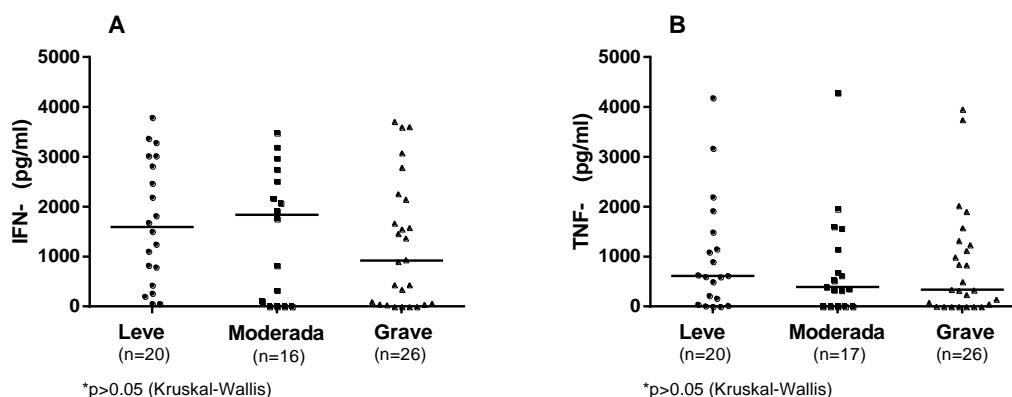
A mediana da carga pró-viral das células dos pacientes com periodontite grave infectados pelo HTLV-1 sem HAM/TSP foi de 10.917 (IQ 0 – 51.780 cópias/ $10^6$  células). A

mediana da carga pró-viral dos indivíduos com HAM/TSP e periodontite crônica grave foi de 180.060 cópias/10<sup>6</sup> células (IQ 93.498 – 201.598 cópias/10<sup>6</sup> células). Foi observada diferença estatística na frequência da carga pró-viral na periodontite grave, sendo maior nos pacientes com HAM/TSP (P=0,014, Teste de Mann-Whitney).

**Perfil das citocinas inflamatórias e regulatórias (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-5) em culturas não estimuladas de células mononucleares do sangue periférico de pacientes com periodontite crônica e infectados pelo HTLV-1.**

A análise do perfil das citocinas nos diferentes graus de gravidade da periodontite crônica foi realizada nos 71 pacientes infectados pelo HTLV-1. A figura 5 representa o perfil de citocinas inflamatórias com padrão Th1 (TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) produzidas no sobrenadante de culturas de células mononucleares não estimuladas nas três formas da doença periodontal entre os indivíduos infectados pelo HTLV-1.

**Figura 5.**



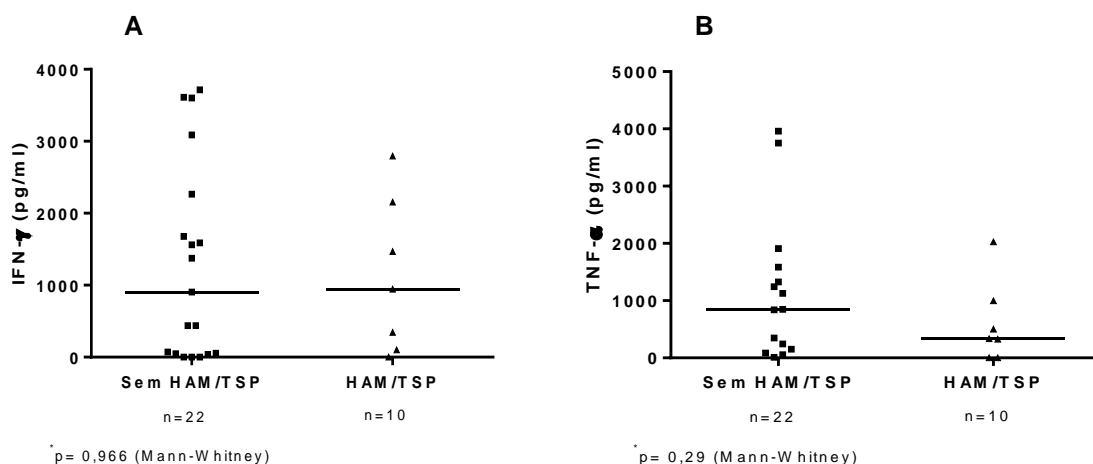
**Figura 5.** Produção espontânea de IFN- $\gamma$  (A) e TNF- $\alpha$  (B) no sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico de indivíduos infectados pelo HTLV-1 com diferentes graus de periodontite crônica (leve, moderada e grave). Análise estatística realizada pelo teste de Kruskal-Wallis.

A concentração de IFN- $\gamma$  produzido pelas células de indivíduos infectados pelo HTLV-1 com a forma leve da periodontite crônica foi de 1596 pg/ml, IQ 522 – 2971. Nos pacientes com a forma moderada da periodontite a concentração desta citocina foi de 1838pg/ml, IQ 28 – 2691 pg/ml. Foi observada uma discreta diminuição da concentração de IFN- $\gamma$  pelas células dos pacientes com periodontite grave (924 pg/ml, IQ 0 – 2183 pg/ml), porém não houve diferença estatística na concentração desta citocina quando os grupos foram

comparados ( $p > 0.05$ , teste de Kruskal-Wallis, Figura 5A). Também não foram observadas diferenças na concentração de TNF- $\alpha$  produzido por CMSP de indivíduos infectados pelo HTLV-1 com periodontite crônica leve (611 pg/ml, IQ 79 – 1409 pg/ml), moderada (392 pg/ml, IQ 0 – 1361 pg/ml) e grave (341 pg/ml, IQ 9 – 1263 pg/ml),  $p > 0,05$  (Figura 5B).

Dos 32 indivíduos com periodontite grave infectados pelo HTLV-1, 22 não apresentavam HAM/TSP e 10 apresentavam HAM/TSP. O perfil das citocinas inflamatórias com padrão Th1 (TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) produzidas no sobrenadante de culturas de células mononucleares não estimuladas foram comparados entre esses pacientes com a finalidade de observar possíveis diferenças (Figura 6).

**Figura 6.**



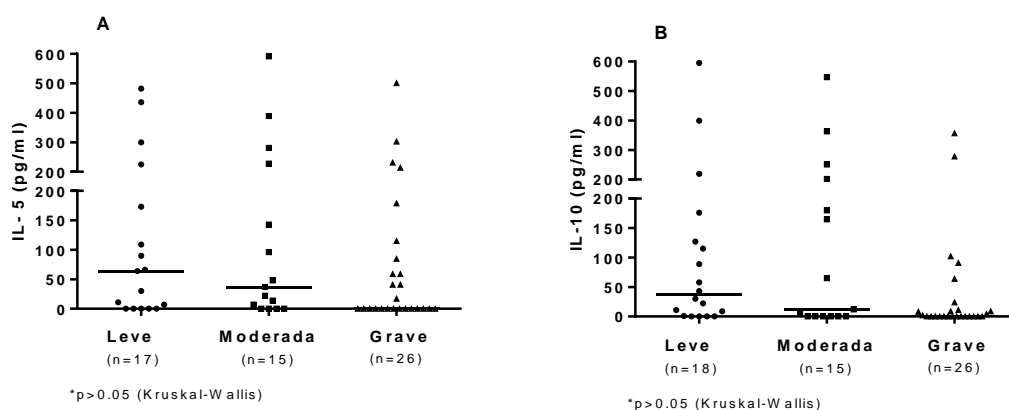
**Figura 6.** Produção espontânea de IFN- $\gamma$  (A) e TNF- $\alpha$  (B) no sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico de indivíduos com periodontite grave infectados pelo HTLV-1 com e sem HAM/TSP. Análise estatística realizada pelo teste de Mann-Whitney.

A concentração de IFN- $\gamma$  produzido pelas células de indivíduos com periodontite grave infectados pelo HTLV-1 sem HAM/TSP foi de 905 pg/ml, IQ 47 – 2264. Nos pacientes com HAM/TSP a concentração desta citocina foi de 944 pg/ml, IQ 102 – 2156 pg/ml. Não houve diferença estatística na concentração desta citocina quando os indivíduos com periodontite grave com e sem HAM/TSP foram comparados ( $P=0,966$ , Teste de Mann-Whitney, Figura 6A). Também não foram observadas diferenças na concentração de TNF- $\alpha$  produzido por CMSP de indivíduos com a forma grave da doença periodontal, infectados pelo HTLV-1 sem HAM/TSP (848 pg/ml, IQ 154 – 1586 pg/ml) e com HAM/TSP (334 pg/ml, IQ 0 – 997 pg/ml),  $p=0,29$  (Figura 6B).



A figura 7 avalia o perfil de citocinas, Th2 (IL-5) e regulatórias (IL-10), produzidas no sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico de indivíduos infectados pelo HTLV-1 com diferentes graus de doença periodontal.

**Figura 7.**

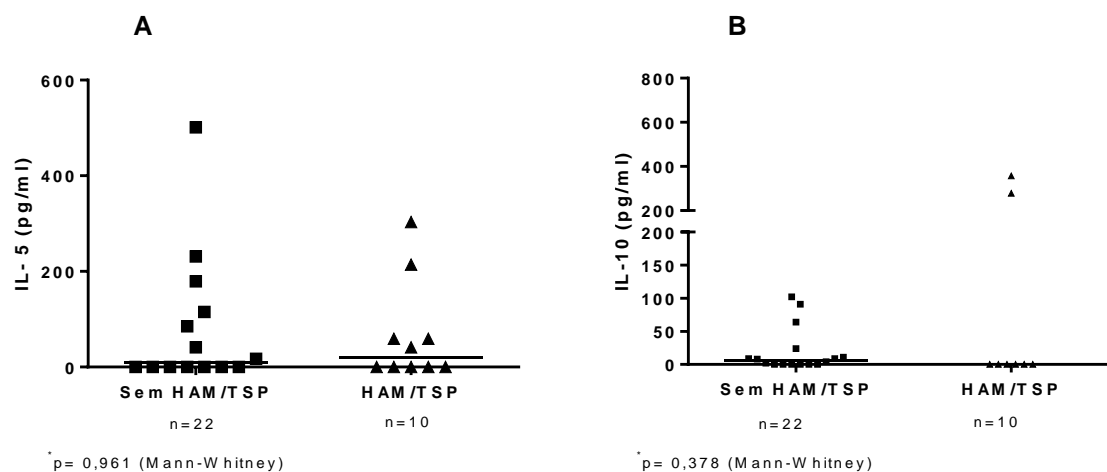


**Figura 7.** Produção espontânea de IL-5 (A) e IL-10 (B) no sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico de indivíduos infectados pelo HTLV-1 com diferentes graus de periodontite crônica (leve, moderada e grave). Análise estatística realizada pelo teste de Kruskal-Wallis

A produção espontânea de IL-5 secretada pelas CMSP dos pacientes com periodontite crônica leve foi de 64 pg/ml, IQ 0 – 199 pg/ml. Nos pacientes com periodontite moderada a mediana da concentração desta citocina foi de 228 pg/ml, IQ 37 – 592 pg/ml. Apesar da diminuição da produção de IL-5 nas culturas de células dos pacientes com a forma grave da periodontite crônica (0 pg/ml, IQ 0 -92 pg/ml), não foi observado diferença estatística na produção desta citocina quando os grupos foram comparados ( $p > 0,05$ , teste de Kruskal-Wallis, Figura 7A). Observou-se uma tendência para diminuição da produção espontânea de IL-10 pelas CMSP dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 que apresentavam a forma grave da doença periodontal (0 pg/ml, IQ 0 – 214 pg/ml) quando comparados com os pacientes com as formas leve (36 pg/ml, IQ 1 – 139 pg/ml) e moderada (12 pg/ml, IQ 0 – 202 pg/m) da periodontite crônica (Figura 7B). Também não foi observada diferença estatística na produção desta citocina quando os grupos foram comparados ( $p > 0,05$ ).

Posteriormente, a produção espontânea de IL-5 e IL-10 produzida pela CMSP de indivíduos infectados pelo HTLV-1 com e sem HAM/TSP foi avaliada em indivíduos com periodontite crônica (Figura 8).

**Figura 8.**



**Figura 8.** Produção espontânea de IL-5 (A) e IL-10 (B) no sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico de indivíduos com periodontite grave infectados pelo HTLV-1 com e sem HAM/TSP. Análise estatística realizada pelo teste de Mann-Whitney.

A produção espontânea de IL-5 secretada pelas CMSP dos pacientes com periodontite grave, infectados pelo HTLV-1 sem HAM/TSP e com HAM/TSP foram respectivamente 8,5 pg/ml, IQ 0 – 131 pg/ml e 20,5 pg/ml, IQ 0 – 97,75 pg/ml. Não foi observada diferença estatística na produção desta citocina quando da presença ou não de HAM/TSP nos indivíduos com periodontite grave ( $P=0,961$ , Teste de Mann-Whitney, Figura 8A). A produção espontânea de IL-10 pelas CMSP dos indivíduos com periodontite grave infectados pelo HTLV-1 com HAM/TSP (208,5 pg/ml, IQ 0 – 357 pg/ml) e sem HAM/TSP (6 pg/ml, IQ 0 – 20,75 pg/m) também não demonstrou diferença estatística ( $P=0,378$ , Teste de Mann-Whitney, Figura 8B).

## VII. DISCUSSÃO

No presente estudo, a infecção pelo HTLV-1 demonstrou influenciar na gravidade da periodontite crônica, independente do desenvolvimento ou não da HAM/TSP. Este é o primeiro estudo a avaliar a frequência dos diferentes graus de gravidade da periodontite crônica na infecção pelo HTLV-1.

Evidências têm sido acumuladas sobre a influência da co-infecção de determinados vírus como o herpesvírus, citomegalovírus e Epstein-Barr na progressão e gravidade da doença periodontal, através da associação com a proliferação de patógenos bacterianos oportunistas oriundos da microbiota subgengival (Botero 2007; Beader & Ivic-Kardum, 2011). Estudos prévios demonstraram que indivíduos infectados pelo HTLV-1 apresentam maior frequência de periodontite crônica do que indivíduos soronegativos (Caskey et al., 2007). Embora a relação de causa e efeito desta associação não seja de todo conhecida, como a doença periodontal é um processo inflamatório crônico (American Academy of Periodontology, 1999) e na infecção pelo HTLV-1 existe uma resposta inflamatória exacerbada (Santos et al., 2004) é possível que este processo inflamatório aumente não só a susceptibilidade para o desenvolvimento como a gravidade da doença periodontal.

Ainda que dados demográficos como, idade, sexo e raça tenham sido semelhantes na população estudada, não foram obtidos dados como renda familiar e nível de escolaridade. No entanto, apesar de terem sido realizadas as análises de pacientes infectados e não infectados em centros diferentes, as duas instituições são destinadas ao atendimento gratuito de populações carentes e dessa forma é provável que esses dados também sejam semelhantes nos dois grupos.

Estudos mostram que a co-infecção com HTLV-1 pode alterar o prognóstico de outras doenças com aumento da taxa de mortalidade da tuberculose (Pedral-Sampaio et al., 1997) e maior incidência e gravidade de doenças no fígado e morte por câncer no fígado em indivíduos com hepatite C (Boshi-Pinto et al., 2000). Além disso, vários estudos têm evidenciado a associação do HTLV-1 com diversas manifestações bucais (Manns et al., 1999; Graves & Cochran, 2003; Martins et al., 2010; Garlet et al., 2010). Em concordância com esses dados, o presente estudo identificou uma frequência significativamente maior da periodontite grave nos pacientes infectados pelo vírus se comparado aos controles não infectados ( $P=0,0004$ ). Nesses pacientes a frequência de periodontite crônica grave foi de 45,1% enquanto que para o grupo controle foi de apenas 19,4%. Conforme o esperado, a

forma leve da doença foi significativamente maior no grupo controle (62,5%) o que sugere que o HTLV-1 influencia na gravidade da doença periodontal.

Os resultados apresentados nesse estudo estão de acordo com outro trabalho que revelou que indivíduos infectados pelo HTLV-1 com periodontite crônica apresentaram valores significativamente maiores de sangramento à sondagem, profundidade de bolsa e perda de inserção quando comparados aos pacientes apenas com periodontite (Garlet et al., 2010). Assim como acontece na co-infecção com outras doenças, a influência do HTLV-1 na doença periodontal provavelmente se deve a defeitos no mecanismo de regulação da resposta imune na infecção pelo vírus.

Na comparação entre os indivíduos infectados com ou sem mielopatia, não foi encontrada diferença significativa no grau de gravidade da doença periodontal crônica. Os resultados demonstraram semelhança na frequência dos graus leve, moderado e grave da periodontite crônica tanto para pacientes sem doenças neurológicas associadas ao HTLV-1 quanto para os que desenvolveram HAM/TSP. Tais evidências não correspondem ao encontrado em outras manifestações clínicas do vírus, onde os indivíduos infectados que desenvolvem HAM/TSP apresentam 3 vezes mais probabilidade de desenvolver xerostomia (Martins et al., 2010). Além disso, nesse grupo de pacientes a ceratoconjutivite é mais prevalente (Vargens et al., 2011). Outro estudo demonstrou que a síndrome seca também é mais comum nesses pacientes, quando comparados aos indivíduos não infectados, ou aqueles infectados que não desenvolveram mielopatia (Giozza et al., 2007).

A importância das evidências encontradas no estudo acima se dá em virtude da maioria dos indivíduos infectados ainda serem considerados assintomáticos, apenas pelo fato de não chegarem a desenvolver a mielopatia. No entanto, ainda que a grande maioria dos infectados não desenvolva nenhuma complicação, tem sido relatado um significativo aumento na prevalência de disfunção erétil, neuropatia periférica, alterações funcionais da bexiga e outras manifestações clínicas nos indivíduos infectados pelo HTLV-1 que não preenchem os critérios da OMS para HAM/TSP (Araújo et al., 1998). O presente estudo identificou que a gravidade da doença periodontal é influenciada pelo HTLV-1 independentemente do desenvolvimento da mielopatia. Outros estudos já demonstraram preocupação semelhante e apontaram associação da infecção pelo HTLV-1 com diversos sintomas, tais como: artralgia, disfunção erétil, fraqueza e dormência nas mãos e nos pés, uveíte, noctúria, síndrome seca, além de outras manifestações bucais (Caskey et al., 2007; Poetker et al., 2011). Sendo assim, fica evidente que maior atenção deve ser dada à infecção por HTLV-1, já que mesmo aqueles indivíduos que não desenvolvem HAM/TSP podem apresentar outros sintomas que interferem na qualidade de vida e saúde. A população do estudo foi composta de indivíduos

diagnosticados com periodontite crônica e o objetivo da avaliação periodontal foi classificar os pacientes quanto ao grau de gravidade da periodontite crônica. A gravidade da periodontite crônica foi determinada pelo grau de perda de inserção clínica ou perda de inserção periodontal de acordo com critérios previamente descritos (Caton & Armitage, 1999). Dessa forma, não avaliamos outros parâmetros clínicos e conseqüentemente os mesmos não foram descritos.

A carga pró-viral é um importante marcador biológico para o entendimento da patogênese do vírus, bem como para elucidar seu real envolvimento com as manifestações da doença (Demontis et al., 2011). Estudos prévios mostraram relação direta da carga pró-viral na saliva com manifestações bucais tais como: gengivite, periodontite e profundidade de sondagem (Lins et al., 2012). Além disso, foi demonstrado que indivíduos HTLV- positivos que desenvolveram ceratoconjuntivite seca apresentaram carga pró-viral maior comparado àqueles que não desenvolveram. Quando a carga pró-viral foi superior a 100.000 cópias/10<sup>6</sup>cels houve um aumento significativo no risco dessa doença (Vargens et al., 2011). Embora o aumento da carga pró-viral na infecção pelo HTLV-1 esteja diretamente relacionado com a progressão da doença e associado com o desenvolvimento da mielopatia (Demontis et al., 2011), no nosso estudo este marcador pareceu não influenciar na gravidade da doença periodontal já que entre os pacientes infectados a distribuição foi correspondente nas três formas da doença periodontal crônica. Curiosamente a forma mais grave da doença periodontal apresentou a menor carga pró-viral embora não tenha havido significância estatística. O fato de a carga pró-viral no presente estudo ter sido mensurada apenas no sangue pode explicar a diferença em relação a outros estudos, já que os que apontaram influência nas manifestações orais como gengivite, profundidade de sondagem e periodontite foram coletados além do sangue, da saliva (Lins et al., 2012) ou diretamente das lesões periodontais (Garlet et al., 2010). A fraca correlação entre a carga pró-viral na saliva e no sangue, identificada no estudo de Lins et al. (2012), reforça ainda mais esta hipótese. Além disso, no presente estudo foi utilizado o PCR em tempo real para detecção da carga pró-viral. Um estudo demonstrou que pode haver divergências nas mensurações em relação ao tipo de PCR utilizado. Na detecção do citomegalovírus em particular, esta foi maior usando o PCR aninhado, se comparado ao PCR em tempo real e exame de cultura viral. Aliado a isso, o índice de concordância entre os diferentes tipos de PCR foi menor que 50% em todos os grupos estudados, sendo de apenas 4,7% em um dos grupos (Botero 2008). No entanto, quando a carga proviral nos pacientes infectados pelo HTLV-1 com periodontite severa foi comparada entre os pacientes que desenvolveram ou não a HAM/TSP, foi observada

diferença estatisticamente significativa, sendo os valores maiores para os indivíduos com HAM/TSP.

Sabe-se que a presença de espécies gram-negativas na placa subgingival desencadeia a liberação de citocinas tais como: TNF- $\alpha$  e interleucinas (IL) 1 $\beta$  que estão relacionadas com a progressão da doença periodontal (Graves & Cochran, 2003; Kinane & Attstrom 2005). Determinadas citocinas anti-inflamatórias como a IL-10, por sua vez agem para contrabalancear esse efeito nos locais afetados (Claudini et al., 2008). A infecção pelo HTLV-1 tem sido associada com o aumento da produção de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  que em parte se deve a uma deficiência na função das células T regulatórias e a diminuição da habilidade da IL-10 e TGF- $\beta$  em modular a resposta imune (Goon et al., 2003; Santos et al., 2005; Brito-Melo et al., 2007). Esse mecanismo de ação pode explicar a influência da infecção pelo HTLV-1 na patogênese da doença periodontal (Manns et al., 1999; Graves & Cochran, 2003). No corrente estudo, a produção de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  foi comparada nas três formas de gravidade da doença periodontal dos indivíduos infectados pelo HTLV-1. Não foram identificadas alterações significativas na produção dessas citocinas nos diferentes graus da doença periodontal crônica. Estudo prévio avaliando a expressão de citocinas na periodontite apontou diferenças significativas na produção de IFN- $\gamma$ , no entanto a concentração de TNF- $\alpha$  foi semelhante nos indivíduos com doença periodontal infectados pelo vírus HTLV-1 e não infectados (Garlet et al., 2010). Tal divergência pode ser explicada pelo fato de que no estudo de Garlet et al. (2010) a expressão das citocinas apresentadas foram resultados da expressão de mRNA obtidos diretamente das lesões periodontais, enquanto que no presente estudo foram obtidas através de amostras do sangue. Outro estudo, apesar de não ter avaliado a gravidade da periodontite, demonstrou não haver correlação entre fluxo salivar e as citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (Giozza et al., 2007). Sendo o fluxo salivar importante para a manutenção da saúde oral e a infecção pelo HTLV-1 reconhecidamente um mecanismo de influência na diminuição do mesmo, se faz importante pesquisar a associação dos diferentes graus de gravidade da doença periodontal crônica com o fluxo salivar ou a presença da síndrome seca. Embora não tenha sido identificada relação da concentração de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  com a gravidade da doença periodontal na infecção pelo HTLV-1, foi demonstrado em estudo prévio uma correlação positiva entre o grau de destruição do periodonto e os níveis de IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-18 e células T CD8 em pacientes HIV positivos, outro conhecido retrovírus pertencente à mesma família do HTLV (Falaska et al., 2008). Sendo assim, pelo menos no que tange a infecção pelo HTLV-1 as concentrações dessas citocinas no sangue não parecem estar relacionada com a gravidade da doença periodontal, sendo inclusive encontrada concentrações menores nos pacientes afetados pela forma grave, ainda que não tenha havido

significância estatística. A expressão de citocinas não foi avaliada nos indivíduos do grupo controle, devido aos mesmos pertencerem a outra instituição e isso impossibilitou a comparação entre as concentrações de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  de pacientes infectados e não infectados. Esse fato, aliado à origem das amostras (sangue) podem ser considerados fatores limitantes na capacidade do estudo em inferir que a expressão de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  não tem relação com a gravidade da periodontite crônica.

Um estudo comparou a expressão de várias citocinas em lesões periodontais de pacientes com doença periodontal infectados ou não pelo HTLV-1. A expressão de IL-4 foi semelhante nos dois grupos, enquanto que IL-12 e IL-17 foi maior no grupo de infectados. No entanto, a expressão dos marcadores de células T regulatórias FOXP3 e IL-10 foi significativamente menor nesse grupo (Garlet et al., 2010).

Nenhum outro estudo procurou associar a expressão de determinadas citocinas com os diferentes graus de gravidade da doença periodontal. A tentativa de identificar alterações no padrão de produção de IL-5 nos graus leve, moderado e grave da doença periodontal em pacientes infectados pelo HTLV-1 não demonstrou resultado significativo. Pôde-se perceber, no entanto, uma tendência para diminuição da produção de IL-10 na forma grave da doença periodontal, bem como um aumento na forma leve ( $P > 0,05$ ). Sendo a diminuição da habilidade da IL-10 em modular a resposta imune um possível mecanismo de ação da influência da infecção pelo HTLV-1 na patogênese da doença periodontal, esse resultado parece compreensível na medida em que os indivíduos infectados que apresentavam a forma mais grave da periodontite detinham menor produção dessa citocina.

Como dito anteriormente, uma limitação do presente estudo foi o fato de as citocinas terem sido quantificadas apenas no sangue. Outros estudos que avaliaram a influência de vírus na patogênese da doença periodontal, utilizam também a saliva, amostras do fluido crevicular gengival, ou biópsias diretamente dos sítios periodontalmente afetados para fins de comparação.

A identificação de bactérias peridontopatogênicas nos sítios infectados também é um recurso utilizado e que pode de fato confirmar o vírus HTLV-1 como fator modificador da doença periodontal. O ideal seria identificar a frequência destas bactérias no periodonto dos indivíduos infectados pelo HTLV com os três diferentes graus de gravidade da doença periodontal crônica. No entanto, por ser esse estudo parte de uma coorte maior que visa identificar a relação das citocinas e carga pró-viral com outras manifestações clínicas associadas ao HTLV-1 que não necessariamente manifestações orais, esses dados já haviam sido previamente coletados e as avaliações feitas apenas no sangue.

A comparação da frequência de bactérias e vírus periodontopatógenos entre os grupos de infectados e não infectados pelo HTLV-1 apesar de importante, não foi realizada pelos mesmos motivos citados anteriormente. No entanto, estudo prévio realizado com amostras biopsiadas de lesões periodontais não demonstrou diferença na frequência e na carga pró-viral de conhecidos periodontopatógenos (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) e vírus (herpesvírus, Epstein-Barr e citomegalovírus) entre indivíduos com periodontite infectados e não infectados pelo HTLV-1 (Garlet et al., 2010).

A documentação no presente estudo que a periodontite crônica é mais grave em indivíduos infectados pelo HTLV-1, associado a estudos prévios que mostram uma reação exacerbada de citocinas pró-inflamatórias, diminuição de citocinas regulatórias e presença de vírus no periodonto, dão suporte ao fato de que a infecção pelo HTLV-1 por modificar a resposta imune não só aumenta a susceptibilidade para doença periodontal como torna a periodontite mais grave.



## VIII. CONCLUSÕES

1. A infecção pelo HTLV-1 se associa com a gravidade da periodontite crônica.
2. Não existe associação entre a gravidade da periodontite crônica e a gravidade da doença neurológica associada ao HTLV-1.
3. A não existência de associação entre a produção espontânea de citocinas e carga pró-viral com gravidade da periodontite crônica sugere que fatores ligados à migração do vírus para o periodonto e a resposta imune associada é mais importante que a resposta imune existente na patogênese da periodontite crônica.

## IX. SUMMARY

**Title.** ANALYSIS OF PERIODONTITIS SEVERITY ASSOCIATED WITH HTLV-1 INFECTION. **Background.** Viruses have been implicated in the pathogenesis of periodontitis, as they may interfere in the proinflammatory response, potentiating periodontitis severity. **Objectives.** Investigate the influence of HTLV-I infection in the periodontitis severity, and evaluate an association between proviral load and cytokines expression and periodontitis severity. **Methods.** In this study, 71 HTLV-I infected individuals with periodontitis and 72 seronegative with periodontitis were investigated. The frequency of periodontitis severity levels were compared in both groups. Proviral load and spontaneous production of cytokines (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-5 e IL-10) in unstimulated culture of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were compared in the slight, moderate and severe periodontitis of HTLV-1-infected individuals. **Results.** No significant differences were found in the frequency of slight, moderate and severe periodontitis of HTLV-1 carriers compared to HAM/TSP individuals (P=0.916). The frequency of severe periodontitis was significantly higher in HTLV-1 infected individuals than in seronegative patients with chronic periodontitis (P=0.004). Proviral load of infected individuals were 77.731 copies/10<sup>6</sup> cells (IQ 10.449 – 198.314 copies/10<sup>6</sup> cells) in severe periodontitis, 182.701 copies/10<sup>6</sup> cells (IQ 79.059 – 279.369 copies/10<sup>6</sup> cells) in moderate periodontitis and 144.457 copies/10<sup>6</sup> cells (IQ 40.512 – 201.714 copies/10<sup>6</sup> cells) in slight periodontitis (P=0.238). Levels of spontaneous TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-5 produced by PBMCs from HTLV-1 infected individuals did not revealed statistical differences between slight, moderate and severe periodontitis. A trend to diminished production of IL-10 was observed in severe periodontitis (P=0.05). **Conclusions.** HTLV-1 infection may influence in periodontitis severity, but measurement of cytokines and proviral load in PBMC were not associated with severity of periodontitis.

**Key-words:** 1. HTLV-1; 2. Periodontitis; 3. Periodontal disease; 4. Cytokines; 5. Proviral load

## X. REFERÊNCIAS

- Alberti C, Cartier L, Valenzuela MA, Puente J, Tanaka Y, Ramirez E. Molecular and clinical effects of betamethasone in human T-cell lymphotropic virus type-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients. *Journal of Clinical Virology*, 86: 1641-9, 2011.
- American Academy of Periodontology. The pathogenesis of periodontal diseases. *Journal of Periodontology*, 70: 457-70, 1999.
- Araújo AQ, Andrade-Filho AS, Castro-Costa CM, Menna-Barreto M, Almeida SM. HTLV-I associated Myelopathy/Tropical spastic paraparesis in Brazil: A nationwide survey. HAM/TSP brasilian study group. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*, 19: 536-41, 1998.
- Araújo AQ, Leite ACC, Lima MASD, Silva MTT. HTLV-1 and neurological conditions: when to suspect and when to order a diagnostic test for HTLV-1 infection? *Arquivos de Neuropsiquiatria*, 67: 132-8, 2009.
- Armitage GC, Cullinan MP, Seymour GJ. Comparative biology of chronic and aggressive periodontitis: introduction. *Periodontol 2000*, 53: 7-11, 2010.
- Barmak K, Hartaj E, Grant C, Alefantis T, Wigdahi B. Human T-cell leukemia virus type 1-induced diseases: pathways to cancer and neurodegeneration. *Virology*, 308: 1-12, 2003.
- Beader N, Ivic-Kardum M. The role of cytomegalovirus infection in the pathogenesis of periodontal diseases. *Acta Clinica Croatica*, 50: 61-6, 2011.
- Bilichodmath S, Mangalekar SB, Sharma DCG, Prabhakar AK, Reddy SB, Kalburgi NB. Herpesvirus in chronic and aggressive periodontitis patients in an Indian population. *Journal of Oral Science*, 51: 79-86, 2009.
- Boschi-Pinto C, Stuver S, Okayama A, Trichopoulos D, Orav EJ, Tsubouchi H, Mueller N. A follow-up Study of morbidity and mortality associated with hepatitis C virus infection and its interaction with human T lymphotropic virus type I in Miyazaki, Japan. *Journal of Infectious Diseases*, 181: 35-41, 2000.
- Botero JE, Parra B, Jaramillo A, Contreras A. Subgingival human cytomegalovirus correlates with increased clinical periodontal parameters and bacterial coinfection in periodontitis. *Journal of Periodontology*, 78: 2303-10, 2007.

Botero JE, Vidal C, Contreras A, Parra B. Comparison of nested polymerase chain reaction (PCR), real-time PCR and viral culture for the detection of cytomegalovirus in subgingival samples. *Oral Microbiology and Immunology*, 23: 239-44, 2008.

Brito-Melo GE, Peruhype-Magalhães V, Teixeira-Carvalho A, Barbosa-Stancioli EF, Carneiro-Proietti AB, Catalan-Soares B, Ribas JG, Martins-Filho OA. IL-10 produced by CD4+ and CD8+ T cells emerge as a putative immunoregulatory mechanism to counterbalance the monocyte-derived TNF-alpha and guarantee asymptomatic clinical status during chronic HTLV-I infection. *Clinical and Experimental Immunology*, 147: 35-44, 2007.

Caton JG, Armitage GC. 1999 International workshop for a classification of periodontal diseases and conditions. *In: Ann American Academy of Periodontology*. Illinois, 1-112p., 1999.

Cardoso CR, Garlet GP, Crippa GE, Rosa AL, Júnior WM, Rossi MA, Silva JS. Evidence of the presence of th17 cells in chronic lesions of human periodontal disease. *Oral Microbiology and Immunology*, 24: 1-6, 2009.

Calattini S, Chevalier SA, Duprez R, Bassot S, Froment A, Mahieux R, Gessain A. Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. *Retrovirology*, 2: 30, 2005.

Casarin RC; Duarte PM; Santos VR; Lima JA; Gagnon G; Casati MZ; Gonçalves RB. Influence of glycemic control on Epstein-Bar and Cytomegalovirus infection in periodontal pocket of type 2 diabetic subjects. *Archives of Oral Biology*, 55: 902-6, 2010.

Caskey MF, Morgan DJ, Porto AF, Giozza SP, Muniz AL, Orge GO, Travassos MJ, Barrón Y, Carvalho EM, Glesby MJ. Clinical manifestations associated with HTLV type I infection: A cross-sectional study. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 23: 365-71, 2007.

Castro NM, Rodrigues-Junior W, Muniz A, Luz GO, Porto AM, Machado A, Carvalho EM. Neurogenic bladder as the first manifestation of HTLV-I infection. *Ciência e Saúde*, 3: 66-9, 2003.

Chalabi M; Rezaie F; Moghim S; Mogharehabet A; Rezaei M; Mehraban B. Periodontopathic bacteria and herpesviruses in chronic periodontitis. *Molecular Oral Microbiology*, 25: 236-40, 2010.

Chen IS, Quan SG, Golde DW. HTLV-1 transforms normal human lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80: 7006-9, 1983.

Claudini M, Trombone AP, Cardoso CR, Ferreira SB Jr, Martins W Jr, Assis GF, Santos CF, Trevilatto PC, Campanelli AP, Silva JS, Garlet GP. The broad effects of the functional IL-10 promoter 592 polymorphism: modulation of IL-10, TIMP-3 and OPG expression and their

association with periodontal disease outcome. *Journal of Leukocyte Biology*, 84: 1565-73, 2008.

Combs DR, Reilly EA, Dawson DR, Avdiushko AS, Danaher RJ, Miller CS. Detection of human cytomegalovirus in dental plaque from individual periodontal sites by real-time polymerase chain reaction. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, 106: 840-4, 2008.

Contreras A, Umeda M, Chen C, Bakker I, Morrison JL, Slots J. Relationship between herpesvirus and adult periodontitis and periodontopathic bacteria. *Journal of Periodontology*, 70: 478-84, 1999.

Dawson DR, Wang C, Danaher RJ, Lin Y, Kryscio RJ, Jacob RJ, Miller CS. Real-time polymerase chain reaction to determine the prevalence and copy number of epstein-barr virus and cytomegalovirus DNA in subgingival plaque at individual healthy and periodontal disease sites. *Journal of Periodontology*, 80: 1133-40, 2009a.

Dawson DR, Wang C, Danaher RJ, Lin Y, Kryscio RJ, Jacob RJ, Miller CS. Salivary levels of Epstein-Barr virus DNA correlate with subgingival levels, not severity of periodontitis. *Oral Diseases*, 15: 554-9, 2009b.

Dehee A, Cesaire R, Desire N, Lezin A, Bourdonne O, Bera O, Plumelle Y, Smadja D, Nicolas JC. Quantitation of HTLV-1 proviral load by a TaqMan real-time PCR assay. *Journal of Virology Methods*, 103: 37-51, 2002.

Demmer RT, Papapanou P. Epidemiologic patterns of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontology 2000*, 53: 28-44, 2010.

Demontis MA, Hilburn S, Taylor GP. The clinical utility of HTLV-1 viral load measurement. *Retrovirology*, 8(suppl 1): A46, 2011.

Dourado I, Alcantara LC, Barreto ML, da Gloria Teixeira M, Galvão-Castro B. HTLV-I in the general population of Salvador, Brazil. A city with African ethnic and sociodemographic characteristics. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*, 34: 527-31, 2003.

Falasca K, Vecchiet F, Ucciferri C, Vignale F, Conti P, Pizzigallo A, Piattelli A, Vecchiet J. Periodontitis and cytokine patterns in HIV positive patients. *European Journal of Medical Research*, 13: 163-8, 2008.

Foglio-Bonda PL, Gabriele M, Graziani F, De Andrea M, Mondini M, Gariglio M. High prevalence of human cytomegalovirus in a population of periodontally healthy subjects. *Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugía Bucal*, 15: 292-6, 2010.

Furukawa Y, Saito M, Matsumoto W, Usuku K, Tanaka Y, Izumo S, Osame M. Different cytokine production in tax-expressing cells between patients with human T cell lymphotropic

virus type 1 (HTLV-1)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis and asymptomatic HTLV-1 carriers. *Journal of Infectious Diseases*. 187: 1116-25, 2003.

Garlet GP, Giozza SP, Silveira EM, Claudino M, Santos SB, Avila-Campos MJ, Martins W Jr, Cardoso CR, Trombone AP, Campanelli AP, Carvalho EM, Silva JS. Association of human T lymphotropic virus I amplification of periodontitis severity with altered cytokine expression in response to a standard periodontopathogen infection. *Clinical Infectious Diseases*, 50: 11-18, 2010.

Giozza SP, Santos SB, Martinelli M, Porto MA, Muniz AL, Carvalho EM. Salivary and lacrimal gland disorders and HTLV-1 infection. *Revue de Stomatologie et de Chirurgie Maxillo-faciale*, 152: 1-5, 2008.

Gonçalves DU, Proietti FA, Barbosa-Stancioli EF, Martins ML, Ribas JG, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Peruhype-Magalhães V, Carneiro-Proietti AB. HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP) inflammatory network. *Inflammation & Allergy - Drug Targets*, 7: 98-107, 2008.

Goon PK, Igakura T, Hanon E, Mosley AJ, Asquith B, Gould KG, Taylor GP, Weber JN, Bangham CRM. High circulating frequencies of tumor necrosis factor alpha- and interleukin-2-secreting human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-specific CD4<sup>+</sup> T cells in patients with HTLV-1-associated neurological disease. *Journal of Virology*, 77: 9716–22, 2003.

Goon PK, Igakura T, Hanon E, Mosley AJ, Barfield A, Barnard AL, Kaftanzi L, Tanaka Y, Taylor GP, Weber JN, Bangham CR. Human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) specific CD4<sup>+</sup> cells: immunodominance hierarchy and preferential infection with HTLV-1. *Journal of Immunology*, 3: 1735-43, 2004.

Grande SR, Imbronito AV, Okuda OS, Lotufo RF, Magalhães MH, Nunes FD. Herpes viruses in periodontal compromised sites: comparison between HIV-positive and -negative patients. *Journal of Clinical Periodontology*, 35: 838-45, 2008.

Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-I and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *Journal of Periodontology*, 74: 391-401, 2003.

Grenier G, Gagnon G, Grenier D. Detection of herpetic viruses in gingival crevicular fluid of patients suffering from periodontal diseases: prevalence and effect of treatment. *Oral Microbiology and Immunology*, 24: 506-9, 2009.

Guerreiro JB, Santos SB, Morgan DJ, Porto AF, Muniz AL, Ho JL, Teixeira AL Jr, Teixeira MM, Carvalho EM. Levels of serum chemokines discriminate clinical myelopathy associated with human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) disease from HTLV-1 carrier state. *Clinical Experimental Immunology*, 145:296-301, 2006.

- Horewicz VV, Feres M, Rapp GE, Yasuda V, Cury PR. Human papillomavirus-16 prevalence in gingival tissue and its association with periodontal destruction: a case-control study. *Journal of Periodontology*, 81: 562-8, 2010.
- Imai K, Inoue H, Tamura M, Cueno ME, Inoue H, Takeichi O, Kusama K, Saito I, Ochiai K. The periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* induces the Epstein-Barr virus lytic switch transactivator ZEBRA by histone modification. *Biochimie*, 94: 839-46, 2012.
- Imbronito AV, Grande SR, Freitas NM, Okuda O, Lotufo RF, Nunes FD. Detection of Epstein-Barr virus and human cytomegalovirus in blood and oral samples: comparison of three sampling methods. *Journal of Oral Science*, 50: 25-31, 2008.
- Jankovic S, Aleksic Z, Dimitrijevic B, Lekovic V, Camargo P, Kenney B. Prevalence of human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus in subgingival plaque at peri-implantitis, mucositis and healthy sites. A pilot study. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 40: 271-6, 2011.
- Jeffery KJM, Siddiqui AA, Bunce M, Lloyd AL, Vine AM, Witkover AD, Izumo S, Usuku K, Welsh KI, Osame M, Bangham CRM. The influence of HLA class I alleles and heterozygosity on the outcome of human T cell lymphotropic virus type I infection. *Journal of Immunology*, 165: 7278-84, 2000.
- Kamma JJ, Contreras A, Slots J. Herpes viruses and periodontopathic bacteria in early-onset periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 28: 879-85, 2001.
- Kinane DF, Attstrom R. Advances in pathogenesis of periodontitis: group B consensus report of the fifth European Workshop in Periodontology. *Journal of Clinical Periodontology*, 32(suppl 6): 130-1, 2005.
- Lin YL, Li M. Human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus inhibit oral bacteria-induced macrophage activation and phagocytosis. *Oral Microbiology and Immunology*, 24: 243-8, 2009.
- Lins L, de Carvalho VJ, de Almeida Rego FF, Azevedo R, Kashima S, Gallazi VN, Xavier MT, Galvão-Castro B, Alcantara LC. Oral health profile in patients infected with HTLV-1: Clinical findings, proviral load, and molecular analysis from HTLV-1 in saliva. *Journal of Medical Virology*, 84: 1428-36, 2012.
- Manss A, Hisad M, La Grenade L. Human T-Lymphotropic virus type I infection. *Lancet*, 353: 1951-8, 1999.
- 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 Diseases*, 16: 167-71, 2010.

- Matutes E. Adult T-cell Leukemia/Lymphoma. *Journal of Clinical Pathology*, 12: 1373-7, 2007.
- Merle H, Cabre P, Olindo S, Merle S, Smadja D. Ocular lesions in 200 patients infected by the human T-cell lymphotropic virus type 1 in Martinique (French West Indies). *American Journal of Ophthalmology*, 2; 190-5, 2002.
- Murphy EL, Wang B, Sacher RA, Fridey J, Smith JW, Nass CC, Newman B, Owby HE, Garratty G, Hutching ST, Schreibert GB. Respiratory and urinary tract infections, arthritis and asthma associated with HTLV-I and HTLV-II infection. *Emerging Infectious Diseases*, 10: 109-16, 2004.
- Nagai M, Kubota R, Greten TF, Schneck JP, Leist TP, Jacobson S. Increased activated human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) Tax 11-19 – specific memory and effector CD8+ cells in patients with HTLV-I – associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: correlation with HTLV-I provirus load. *Journal of Infectious Diseases*, 183: 197-205, 2001.
- Nakamura H, Eguchi K, Nakamura T, Mizokami A, Shirabe S, Kawakami A, Matsuoka N, Migita K, Kawabe Y, Nagataki S. High prevalence of Sjögren syndrome in patients with HTLV-1 associated myelopathy. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 3: 167-72, 1997.
- Pedral-Sampaio DB, Netto EM, Pedrosa C, Brites C, Duarte M, Harrington W. Co-infection of tuberculosis and HIV/HTLV retroviruses: frequency and prognosis among patients admitted in a Brazilian hospital. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 1: 31-5, 1997.
- Poetker SK, Porto AF, Giozza SP, Muniz AL, Caskey MF, Carvalho EM, Glesby MJ. Clinical manifestations in individuals with recent diagnosis of HTLV type I infection. *Journal of Clinical Virology*, 51: 54-58, 2011.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77: 7415-9, 1980.
- Proietti FA, Carneiro-Proietti AB, Catalan-Soares BC, Murphy EL. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene*, 24: 6058-68, 2005.
- Sahin S, Saygun I, Kubar A, Slots J. Periodontitis lesions are the main source of salivary cytomegalovirus. *Oral Microbiology and Immunology*, 24: 340-2, 2009.
- Santos SB, Porto AF, Muniz AL, de Jesus AR, Magalhães E, Melo A, Dutra WO, Gollob KJ, Carvalho EM. 2004. Exacerbated inflammatory cellular immune response characteristics of HAM/TSP is observed in a large proportion of HTLV-I asymptomatic carriers. *Infectious Diseases*, 4:7, 2004.



- Santos SB, Porto AF, Muniz AL, Luna T, Nascimento MC, Guerreiro JB, Oliveira-Filho J, Morgan DJ, Carvalho EM. Modulation of T cell responses in HTLV-1 carriers and in patients with myelopathy associated with HTLV-1. *Neuroimmunomodulation*, 13:145-51, 2006.
- Santos S, Oliveira P, Luna T, Souza A, Nascimento M, Siqueira I, Tanajura D, Muniz AL, Glesby MJ, Carvalho EM. Overactive bladder associated with human T-cell lymphotropic virus type 1 infection. *Journal of Medical Virology*, 84: 1809-17, 2012.
- Sanz M, Quirynen M. Advances in the etiology of periodontitis: group A consensus report of the fifth European Workshop in Periodontology. *Journal of Clinical Periodontology*, 32(supply 6): 54-6, 2005.
- Saygun I, Sahin S, Özdemir A, Kurtis B, Yapar M, Kubar A, Ozcan G. Detection of human viruses and clinical parameters. *Journal of Periodontology*, 73: 1437-43, 2002.
- Saygun I, Kubar A, Ozdemir A, Yapar M, Slots J. Herpesviral–bacterial interrelationships in aggressive periodontitis. *Journal of Periodontal Research*, 39: 207-12, 2004a.
- Saygun I, Yapar M, Ozdemir A, Kubar A, Slots J. Human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus type I in periodontal abscesses. *Oral Microbiology and Immunology*, 19: 83-7, 2004b.
- Saygun I, Kubar A, Özdemir A, Slots J. Periodontitis lesions are a source of salivary cytomegalovirus and Epstein-Barr virus. *Journal of Periodontal Research*, 40: 187-91, 2005.
- Saygun I, Kubar A, Sahin S, Sener K, Slots J. Quantitative analysis of association between herpesviruses and bacterial pathogens in periodontitis. *Journal of Periodontal Research*, 43: 352-9, 2008.
- Saygun I, Nizam N, Keskiner I, Bal V, Kubar A, Açkel C, Serdar M, Slots J. Salivary infectious agents and periodontal disease status. *Journal of Periodontal Research*, 46: 235-239, 2011.
- Slots J, Saygun I, Sabeti M, Kubar A. Epstein-Barr virus in oral diseases. *Journal of Periodontal Research*, 41: 235-44, 2006.
- Slots J. Herpesviral-bacterial synergy in the pathogenesis of human periodontitis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 20: 278-83, 2007.
- Slots J. Herpesvirus periodontitis: infection beyond biofilm. *Journal of the California Dental Association*, 39: 393-99, 2011.
- Smith M, Seymour GJ, Cullinan MP. Histopathological features of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontology 2000*, 53: 45-54, 2010.
- Stabholz A, Soskolne WA, Shapira L. Genetic and enviromental risk factors for chronic and aggressive periodontitis. *Periodontology 2000*, 53: 138-53, 2010.

- Sunde PT, Olsen I, Enersen M, Beiske K, Grinde B. Human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus in apical and marginal periodontitis: a role in pathology? *Journal of Medical Virology*, 80: 1007-11, 2008.
- Sundberg MA, Costa D, Orge G, Castro NM, Muniz A, Glesby MJ, Carvalho EM. Helminthic infection and the risk of neurologic disease progression in HTLV-1. *Journal of Clinical Virology*, 53: 251-5, 2012.
- Teng YT. Mixed periodontal Th1-Th2 cytokine profile in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-specific osteoprogenin ligand (or RANK-L)- mediated alveolar bone destruction in vivo. *Infection and immunity*, 70: 5269-73, 2002.
- Terada K, Katamine S, Eguchi K, Moriuchi R, Kita M, Shimada H, Yamashita I, Iwata K, Tsuji Y, Nagataki S. Prevalence of serum and salivary antibodies to HTLV-1 in Sjögren's syndrome. *Lancet*, 8930: 1116-9, 1994.
- Teughels W, Sliepen I, Quirynen M, Haake SK, Van Eldere J, Fives-Taylor P, Van Ranst M. Human cytomegalovirus enhances *A. actinomycetemcomitans* adherence to cells. *Journal of Dental Research*, 86: 175-80, 2007.
- Thomasini RL, Bonon SH, Durante P, Costa SCB. Correlation of cytomegalovirus and human herpesvirus 7 with and cells in chronic periodontitis patients. *Journal of Periodontal Research*, 47:114-20, 2012.
- Vargens CCL, Grassi MFR, Boa-Sorte N, Rathsam-Pinheiro RH, Olavarria VN, Kruschewsky RA, Galvão-Castro B. Keratoconjunctivitis sicca of human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) infected individuals is associated with high levels of HTLV-1 proviral load. *Journal of Clinical Virology*, 52: 177-80, 2011.
- Verdonck K, González E, Van Dooren S, Vandamme A, Vanham G, Gotuzzo E. Human T lymphotropic virus 1: recent knowledge about an ancient infection. *Lancet Infectious Diseases*, 4: 266-81, 2005.
- World Health Organization. Report of the scientific group on HTLV-I and associated disease. Kagoshima, Japan, December 1988: Virus disease Human T lymphotropic virus type I (HTLV-I). *The Weekly Epidemiological Record*, 49: 382-3, 1989.
- Wolfe ND, Heneine W, Carr JK, Garcia AD, Shanmugam V, Tamoufe U, Torimiro JN, Prosser AT, LeBreton M, Mpoudi-Ngole E, McCutchan FE, Birx DL, Folks TM, Burke DS, Switzer WM. Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 22: 7994-9, 2005.

Yamazaki K, Nakajima T, Hara K. Immunohistological analysis of T cell function subsets in chronic inflammatory periodontal disease. *Clinical and Experimental immunology*, 99: 384-91, 1995.

# **XI. ANEXOS**

## Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**Nome do Projeto:** Resposta Imunológica, Fatores Virais e Infecções por Helminhos na Expressão da Doença Associada ao HTLV-1

**Nome do Participante:**

**Investigador Principal:** Edgar M. Carvalho, médico, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Rua João das Botas s/n, Canela, 40110-160, Salvador-Bahia-Brazil.

**Nº do Projeto:**

**Convite e Objetivo:** Você é convidado a participar de um estudo que tem como objetivo determinar doenças ou manifestações clínicas associadas à infecção causada pelo vírus HTLV-1 e avaliar as razões pelas quais alguns pacientes apresentam doença neurológica associada à infecção pelo HTLV-1. Participam do estudo 500 indivíduos infectados pelo HTLV-1, 40 pacientes com mielopatia associada ao HTLV-1 e 40 pessoas que não estão infectadas por este vírus. Além das informações aqui prestadas você pode perguntar tudo sobre o estudo ao seu médico. Caso decida participar do estudo você será solicitado a assinar este formulário de consentimento.

**Participação Voluntária:** A sua participação é voluntária. Você pode desistir de participar a qualquer momento, ou seja, agora ou durante a resposta ao questionário e ao exame físico. Você tem liberdade de se recusar a responder qualquer pergunta do questionário que considere invasora de privacidade, causadora de constrangimento e/ou desconforto moral. Caso você decida não participar do estudo, você não terá nenhuma perda por isso. Participando ou não, você receberá o acompanhamento médico oferecido aos pacientes do ambulatório de HTLV.

**Finalidade:** O estudo visa determinar se algumas doenças ou manifestações clínicas estão associadas à infecção pelo vírus HTLV-1, assim como a relação entre a resposta imune, fatores virais e infecção por helmintos com o desenvolvimento da doença neurológica. Iremos também comparar a frequência de manifestações clínicas e resposta imune em pacientes com e sem infecção por helmintos. Além disso, iremos determinar a carga pró-viral do HTLV-1 e armazenar o material para determinar se diferenças virais podem explicar porque alguns pacientes desenvolvem doença e outros não.

**Procedimentos:** Caso você concorde em participar do estudo você responderá a um questionário perguntando sobre queixas clínicas e será examinado por uma equipe de médicos e um dentista. Você será solicitado a fornecer 30ml de sangue (aproximadamente o equivalente a duas colheres de sopa) e a realizar anualmente exame parasitológico de fezes. Em caso de você desenvolver problemas neurológicos, será feita uma punção na sua coluna para obtenção de líquido e determinar se você tem anticorpos contra o HTLV-1 no sistema nervoso central. Caso você não deseje responder alguma pergunta do questionário você poderá não fazê-lo sem que haja qualquer prejuízo. A coleta de sangue será solicitada novamente se você apresentar novas manifestações neurológicas e no final do estudo.

**Duração do estudo:** Após a assinatura do termo de consentimento sua participação no estudo será de 8 anos sendo que a cada ano você deverá comparecer ao ambulatório de HTLV-1 para avaliação clínica e neurológica. Coleta de sangue para estudos imunológicos será feita duas vezes no início e fim do estudo.

**Confidencialidade:** Qualquer informação obtida durante o estudo só será do conhecimento da equipe e do órgão internacional que protege indivíduos em pesquisa (Escritório de Proteção de Pesquisa em Humanos dos Estados Unidos). Os representantes do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América poderão ver sua ficha clínica. Você e qualquer participante deste estudo não serão identificados por nome nas publicações dos resultados do estudo. A confidencialidade estará de acordo com a Constituição Brasileira e a Resolução 196/96.

**Análise de Riscos e Benefícios:** Pequena dor no local da coleta de sangue poderá ocorrer. Em alguns casos, a coleta de sangue pode ser acompanhada por pequeno sangramento ou formação de hematoma. Os riscos da punção da coluna para coleta de líquido são sangramentos e infecção, ambos raros. Mais de 50% dos pacientes apresentam dor de cabeça, que quando necessária é tratada com hidratação e repouso. A resposta ao questionário e a

realização de exames clínicos e de exame físico poderão identificar alguma anormalidade na sua saúde que não estava sendo observada por você. Caso seja identificado algum problema clínico ou neurológico as providências devidas serão tomadas para que se faça o diagnóstico e tratamento do problema.

**Retorno de Benefícios para o Sujeito e para a Sociedade:** Como muitas queixas clínicas são comuns e não necessariamente relacionadas à infecção pelo vírus HTLV-1, é importante determinar que alterações clínicas e neurológicas estão relacionadas com a infecção pelo HTLV-1. Isto permitirá um melhor esclarecimento à população sobre mielopatia associada ao HTLV-1. Os estudos imunológicos contribuirão para identificar marcadores laboratoriais associados ao desenvolvimento da doença neurológica.

**Custos:** Você não terá custos com a sua participação no estudo. Adicionalmente as suas despesas com transporte e alimentação para participar no estudo serão pagas pelo projeto.

**Esclarecimentos:** Caso você precise de esclarecimentos posteriores pode contar com os seguintes investigadores pelo telefone 3237-7353: Dr. Edgar M. Carvalho e Dr. André Luiz Muniz.

**Consentimento:** Se você leu o consentimento informado ou este lhe foi explicado e você aceita participar do estudo, favor assinar o nome abaixo. A você será entregue uma cópia deste formulário para guardar.

Sim, aceito participar do estudo.

Não, não aceito participar do estudo.

_____	_____	_____
Assinatura do participante	Data	Hora
_____	_____	_____
Assinatura do pesquisador	Data	Hora
_____	_____	_____
Assinatura da testemunha	Data	Hora

## Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Controles

**Nome do Projeto:** Resposta Imunológica, Fatores Virais e Infecções por Helminhos na Expressão da Doença Associada ao HTLV-1

**Investigador Principal:** Edgar M. Carvalho, médico, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Rua João das Botas s/n, Canela, 40110-160, Salvador-Bahia-Brasil.

**Comitê de Ética:** Maternidade Climério de Oliveira/UFBA, Rua do Limoeiro, nº 137 - Nazaré Cep.: 40.055-150 Salvador, BA, 55 71 3283-9210/9211, [cepmco@ufba.br](mailto:cepmco@ufba.br)/[cepmco@gmail.com](mailto:cepmco@gmail.com)

**Nome do Participante:** \_\_\_\_\_

**Número de Identificação no Projeto:**

**Convite e Objetivo:** Você é convidado a participar de um estudo que tem como objetivo avaliar as razões pelas quais alguns pacientes apresentam doença neurológica associada à infecção pelo HTLV-1. Além das informações aqui presentes você pode perguntar tudo sobre o estudo aos médicos que fazem parte do projeto. Antes de concordar em participar desta pesquisa é importante que você leia este documento, e caso decida participar do estudo você será solicitado (a) a assinar este formulário de consentimento.

Você foi selecionado como um possível participante nesse estudo porque você doou sangue a um banco de sangue em Salvador, Bahia e foi identificado como NÃO estando infectado pelo vírus HTLV-1.

**Participação Voluntária:**

A sua participação no estudo é voluntária e você estará contribuindo para o melhor entendimento da doença causada pelo vírus HTLV-1. Sua participação nesse estudo será de apenas 1 dia. Você é livre para recusar a participar no estudo, sem perder os seus direitos a cuidados médicos de rotina e sem nenhuma consequência quanto a futuros cuidados médicos no Hospital Universitário Prof. Edgard Santos.

**Finalidade do Estudo:** O objetivo desse estudo é entender as razões porque pessoas desenvolvem uma doença neurológica associada ao HTLV-1 e quais outros sintomas elas podem vir a desenvolver por causa dessa infecção.

**Procedimentos:** Caso você decida participar do estudo será solicitado que você doe trinta mililitros de sangue (mais ou menos 2 colheres de sopa) que vão ser usados para avaliar sua resposta imunológica (sua capacidade de combater infecções).

**Confidencialidade:** Qualquer informação obtida durante este estudo será confidencial sendo apenas compartilhada com outros membros da equipe científica. Os resultados serão divulgados na forma de comunicação científica, não permitindo a identificação individual dos participantes.

**Análises de Riscos e Benefícios:**

A retirada de sangue nos pacientes pode provocar dor leve devido à punção com agulha. Em casos raros se acompanha de sangramento ou mancha na pele. A retirada de sangue venoso é um procedimento médico de rotina, e todos os cuidados apropriados serão tomados.

**Retorno de Benefícios para o Sujeito e para a Sociedade:** Muito pouco se sabe a respeito dos sintomas iniciais da doença neurológica associada ao HTLV-1. O objetivo do presente estudo é identificar anormalidades imunológicas associadas ao HTLV-1. O conhecimento adquirido através desse estudo poderá no futuro ajudar pessoas infectadas pelo HTLV-1, pois permitirá identificar precocemente pessoas propensas a desenvolver problemas neurológicos e neste caso poder realizar precocemente tratamento na perspectiva de evitar o desenvolvimento da doença. Desta forma, o estudo não traz para você nenhum benefício mas ajudará os indivíduos que são infectados pelo HTLV-1.

**Custos:** Você não terá quaisquer custos com os exames de laboratório ou com a avaliação médica. Você não receberá nenhum pagamento por sua participação nesse estudo. Adicionalmente as suas despesas com transporte e alimentação para participar no estudo serão pagas pelo projeto.

**Esclarecimentos:**

Caso tenha alguma pergunta ou apresente alguma complicação relacionada aos procedimentos realizados na pesquisa, você pode contatar pelo telefone 3237-7353 os pesquisadores: Dr. Edgar M. Carvalho e Dr. André Luiz Muniz, no Serviço de Imunologia do HUPES-UFBA, Rua João das Botas, s/n – Canela, telefone (071) 3237-7353, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa CEP/COM/UFBA, na pessoa do Dr. Eduardo Neto, Maternidade Climério de Oliveira/UFBA, Rua do Limoeiro, nº 137 – Nazaré, Cep.: 40.055-150 Salvador, BA, 55 71 3283-9210/9211, [cepmco@ufba.br](mailto:cepmco@ufba.br)/[cepmco@gmail.com](mailto:cepmco@gmail.com)

**Consentimento:**

Se você leu o consentimento informado ou este lhe foi explicado e você concorda em participar do estudo, favor assinar o nome abaixo. A você será entregue uma cópia deste formulário para guardar.

- Sim, eu concordo que a amostra de sangue possa ser guardada para pesquisa no futuro.
- Não, eu não concordo que a amostra de sangue possa ser guardada para pesquisa no futuro.

---

Assinatura do participante	Data	Hora
----------------------------	------	------

---

Assinatura da testemunha	Data	Hora
--------------------------	------	------

**COMPROMISSO DO PESQUISADOR**

Discuti as questões acima apresentadas com os participantes do estudo. É minha opinião que o indivíduo entende os riscos, benefícios e direitos relacionados a este projeto.

---

Assinatura do pesquisador	Data	Hora
---------------------------	------	------





# Herbert Viana de Magalhães

Tradutor Público Juramentado e Intérprete Comercial (Public Translator)

Resolução Junta Comercial do Estado da Bahia – JUCEB nº 9/93, de 02/06/1993  
Decreto Federal Nº 13.609, de 21.10.1943

PREFEITURA MUNICIPAL DO SALVADOR  
CÓDIGO DE ATIVIDADE: 70.262  
Número de Inscrição: 094268001

I certify that a document in Portuguese has been handed in to me for translation, which I duly executed and recorded it in accordance with the provisions of the Law No. 3611, May 9, 2008.

ETHICS IN RESEARCH COMMITTEE-CEP/MCO/UFBA  
CLIMÉRIO DE OLIVEIRA MATERNITY  
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
IORG0003460. Assurance FWA00002471, October 26, 2010  
IRB00004123, October 5, 2007 – October 4, 2010

Rua Padre Feijó 240-Canela – Ambulatório Magalhães Neto 3º andar, Curso de Pós-Graduação em Medicina e Saúde  
CEP.: 40.160-170-Salvador-BA. Telefax.: (71) 203-2740 E-MAIL: CEP\_mco@yahoo.com.br

## OPINION/RESOLUTION NUMBER 030/2008

Register CEP. 014/08 (This number is to be mentioned in the correspondences related to this Project)

**Title of the Project.** “Resposta imunológica, fatores virais e infecções por helmintos na expressão de doença associada ao HTLV-1”.

(“Immunological response, viral factors and infections caused by helmints in the expression of disease associated to HTLV-1”)

**Sponsor/Financing.** National Institute of Health, USA.

**Responsible researcher.** Titular Professor of UFBA, Doctor, Edgar Marcelino de Carvalho Filho, Federal University of Bahia. See “Curriculum Vitae” attached.

**Institution:** Professor Edgard Santos University Hospital Complex, Immunology Services, Federal University of Bahia, C-HUPES/SIM/UFBA.

**Area of Knowledge:** Medicine, 4.01, Level D; Group III

**Objective.** To characterize the natural history of the clinical manifestations in individuals infected by HTLV-1; to determine the influence of the infection caused by helmints in the immune response and expression of disease associated to the infection caused by HTLV-1; to identify viral and immunological markers of the several clinical forms of infection caused by HTLV-1

**Summary.** The lymphotropic virus of T human cells type I (HTLV-1) infects 20 million of individuals all over the world and it is the causal agent of Myelopathy associated to HTLV/ tropical. Paraparesia spastic (HAMITSP). Salvador-Ba possesses the largest infection prevalence caused by HTLV-1 in Brazil. In the last 10 years we have characterized the immunological response in bearers of HTLV-1 and in patients with HAMITSP and certain bases of the immunological alterations that increase the individuals’ susceptibilities infected by HTLV-1 develop disseminated strongyloidiasis. Additionally we documented that neurological and articulate manifestations, periodontite, dry syndrome, urinary manifestations and erectile dysfunction are more frequent in bearers of HTLV-1 than in soro-negatives controls.

We described that bladder neurogenic associated to HTLV-1 precedes the emergence of the HAMITSP. Using a cohort of 500 symptomatic bearers of HTLV-1, the following clinical endings will be appraised: neurogenic bladder associated to HTLV-1, HAMITSP, and worsening of neurological manifestations. These endings will also be compared in patients with and without infection by helmints. The influence of the immune response and of factors viral in the expression of disease will be determined in a study of

transversal cut with three groups of patient: 1) Patient with neurogenic bladder associated to HTLV-1; 2) patient with HAMITSP; and 3) Patient with asymptomatic infection caused by HTLV-1. There will be determined the cytokines inflammatory - levels (TNF-a, IFN-y, IL-17) and of chemiocytes that attract the cells T for inflammation places (CXCL9, CXCL 10), the frequency of cells T CD8 expressing IFN-y and TNF-a. and of cytokines and cells that modulate the immune response (/ L-10, IL-27 regulatory cells T). The load pro-viral will be determined and DNA viral will be stored for future studies with the objective of evaluating the viral polymorphism that can be associated to HAM/TSP.

Inclusion criteria. Individuals with infection caused by HTLV-1 with or without clinic disease (asymptomatic bearers); Individuals infected by HTLV-1 with Infection by Helminths; Bearers of HTLV-1 with Neurogenic Bladder; HAM/TSP and Healthy individuals. Exclusion criteria. Pregnant women and small children under 18 years of age. Analysis of risks. minimum risks of collection of the patient's data in the handbook and a collect of blood of 30 ml. Return of benefits for the subject and/or for the community. The participants may not benefit directly from the study, but they will receive careful follow up for the infection of HTLV-1 and their complications. However, as little it is known about the **clinical manifestations of HTLV-1, it is important to determine** when the clinical manifestations are associated with the viral infection. Besides, the knowledge on the immune response and pro-viral load in the infection caused by HTLV-1 can be used in the development of new intervention strategies. Few studies exist about the infection caused by HTLV-1 and little knowledge about the clinical manifestations, immunological alterations and viral factors associated with the infection progression to HAMSP. This study will allow a better understanding of the natural history of the infection caused by HTLV-1.

Term of Free and Pre-cleared up consent - "TCLPE" uses one accessible language for people who are not of the area of health. It contains justification, the objectives are clearly put, the procedures are clearly exposed. Risks and benefits of the project are clearly exposed. It is clearly specified the voluntary participation in the project. The confidentiality of the picked information and privacy of the data, during and after the protocol are assured. The gratuitousness of the intervention is assured. The address and telephone of the Investigators are described. The Ethics Committee is not mentioned.

Comments. It is a cohort study in which it is studied the immunological response, viral factors and infections for helminths in the expression of associated disease t HTLV-1. The protocol is well argued, their ends are ethical and the knowledge occurring can bring benefits to the community. Protocol has value and it can be ethically justifiable it is recommended the citation of this Institutional a complete and yours respective contacts for eventual consultation on the part of "Investigated". **Approved Protocol.**

Salvador, April 30, 2008.

**Important Note:** All the documentation attached to the Protocol proposed and with initials by the Researcher filed in this CEP, and also another one return with the secretary's initials hereto to the same is an intrinsic part of this Opinion/Resolution and in the "Additional Recommendations" attached, as well as the **un-delayed delivery of partial and final reports as it is found in this release** (Writing Model for Research Report attached).

(Signed): Antônio dos Santos Barata  
 Doctor Professor Antônio dos Santos Barata  
 Coordinator – CEP/MCO/UFBA

(Signed): Antônio dos Santos Barata  
 Doctor Professor Antônio dos Santos Barata  
 Coordinator of the Human Research Ethics Committee  
 Federal University of Bahia

I, HERBERT VIANA DE MAGALHÃES, Public Translator sworn and authorized, do hereby certify the above translation, faithfully drawn up in accordance with the original document attached hereto. Salvador, May 01, 2008.

0942034001 82  
 HERBERT VIANA DE MAGALHÃES

*Herbert Magalhães*



## **XII. ARTIGO SUBMETIDO**



## **EVALUATION OF PERIODONTITIS SEVERITY AND RELATION TO INFLAMMATORY CYTOKINE PATTERNS AND PROVIRAL LOAD IN HTLV-1 INFECTION.**

**Tiago M A Cunha<sup>\*</sup>, Kátia Salgado, Silvana Giozza, Natália Carvalho, Silvane Santos, Edgar M Carvalho<sup>\*\*</sup>**

### **Corresponding author:**

Tiago de Moraes Alves da Cunha  
Avenida Antônio Carlos Magalhães, 3359, Ap 1104N  
CEP: 41800-700  
Salvador, Bahia, Brazil,  
Phone: +55 71 33519112. Fax: +55 71 34317849  
e-mail: tiagoalvescunha@hotmail.com

**3323 words, 6 Figures and 2 Tables**

### **Short running title**

Chronic periodontitis severity in HTLV-1 infection.

### **Summary**

In the present study we show that HTLV-1 infection enhances chronic periodontitis severity, but levels of inflammatory cytokine production in peripheral blood mononuclear cells and proviral load were not associated with severity. Severe periodontitis was also similar in patients with HAM/TSP and in HTLV-1 carriers.

## ABSTRACT

**Background.** Viruses have been implicated in the pathogenesis of periodontitis, as they may interfere in the proinflammatory response, potentiating periodontitis severity. **Objectives.** Investigate the influence of HTLV-I infection in the periodontitis severity, and evaluate an association between proviral load and cytokines expression with periodontitis severity. **Methods.** In this study, periodontitis severity was evaluated in 71 HTLV-I infected individuals with periodontitis and 72 patients with periodontitis without HTLV-1 determined by clinical attachment loss Spontaneous production of cytokines (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-5 e IL-10) in unstimulated culture of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were determined by ELISA and pro-viral load by real time PCR. **Results.** The frequency of severe periodontitis in HTLV-1 infected subjects (32/71, 45%) was higher ( $P < 0.05$ ) than in controls (14/72, 19.4%). No significant differences were found in the frequency of mild, moderate and severe periodontitis in HTLV-1 carriers compared to HAM/TSP patients ( $P=0.916$ ). The proviral load was  $109164 \pm 24762$  copies/ $10^6$  cells in severe periodontitis,  $259924 \pm 89492$  copies/ $10^6$  cells in moderate periodontitis and  $171662 \pm 53846$  copies/ $10^6$  cells in mild periodontitis ( $P=0.238$ ). Levels of spontaneous TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-5 produced by PBMCs from HTLV-1 infected individuals did not revealed statistical differences between mild, moderate and severe periodontitis. A trend to diminished production of IL-10 was observed in severe periodontitis ( $P=0.05$ ). **Conclusions.** HTLV-1 infection may influence periodontitis severity, but measurement of cytokines and proviral load in PBMC were not associated with severity of periodontitis.

**Key-words:** 1. HTLV-1; 2. Periodontitis; 3. Periodontal disease; 4. Cytokines; 5. Proviral load

## INTRODUCTION

Many aspects regarding the etiology and pathogenesis of periodontal disease are yet to be elucidated, but it is believed that tissue destruction mechanism is in part due to the inflammatory response associated with specific bacterias and polimicrobial colonization at the dental surface (Bilichodmath et al., 2009; Smith et al., 2010). It is well-known that gram-negative species in the subgingival biofilm triggers an exacerbate immune response, which involves TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , associated with periodontal disease progression (Graves & Cochran, 2003; Kinane & Attstrom 2005). Conversely, certain anti-inflammatory cytokines such as IL-10 counteract the effect of proinflammatory mediators at the affected sites (Claudini et al., 2008). Therefore, the balance between proinflammatory and anti-

inflammatory response is supposed to regulate and consequently determine the progressive or stable condition of the lesions (Teng, 2002; Cardoso et al., 2009).

Different viruses, such as herpesvirus, cytomegalovirus and Epstein-Barr have been implicated in the progression and severity of periodontal disease (Saygun et al., 2002; Saygun et al., 2005; Botero et al., 2007; Teughels et al., 2007; Botero et al., 2008; Falaska et al., 2008; Saygun et al., 2008; Dawson et al., 2009b; Grenier et al., 2009; Lin & Li, 2009; Sahin et al., 2009; Chalabi et al., 2010; Foglio-Bonda et al., 2010; Beader & Ivic-Kardum, 2011; Thomasini et al., 2012). It is estimated that 15 to 20 million people are infected with HTLV-1 worldwide (Proietti et al., 2005). The city of Salvador, Bahia, has one of the highest prevalence (1.76%) in the overall population in Brazil (Dourado et al., 2003). HTLV-1 associated myelopathy (HAM/TSP) and Adult T cell leukemia/lymphoma (ATLL) are the main diseases associated with HTLV-1. Although the majority of HTLV-1 infected subjects are thought to remain asymptomatic, recent studies have shown that a large frequency of infected individuals have periodontal disease, sicca syndrome, uveitis and HTLV-1 associated arthropathy (Caskey 2007, Castro et al., 2007, Giozza et al., 2007, Vargens et al., 2011). Neurologic manifestations such as erectile dysfunction, peripheral neuropathy, bladder function abnormalities, and other neurological dysfunctions have also been identified in HTLV-1 infected subjects whom do not fulfill the WHO criteria for HAM/TSP (Araújo et al., 1998; Santos et al., 2012).

The main pathology related to HTLV-1 infection ATLL and HAM/TSP are associated with increasing in proviral load and exaggerated Th1 type of immune response with high production of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  (Santos et al., 2004). Therefore by exacerbate immune response HTLV-1 infection may increase susceptibility and severity of periodontal disease. The increasing in cytokine production is in part due to an impairment of regulatory T cells function and diminishing production or ability of IL-10 and TGF- $\beta$  in modulate immune response (Santos 2005; Goon et al., 2003; Brito-Melo et al., 2007). This mechanism might explain HTLV-1 influence in the pathogenesis of periodontitis (Manns et al., 1999; Graves & Cochran, 2003). Actually *in situ* studies comparing patients with HTLV-1 and chronic periodontitis with chronic periodontitis patients without HTLV-1 have shown on that periodontitis in HTLV-1 is associated with increased expression of IL-1 $\beta$  and decreased expression of IL-10 and FOXP3 when compared with patients with chronic periodontitis without HAM/TSP (Garlet et al., 2010).

The proviral load is an important biological marker of disease related to HTLV-1 (Demontis et al., 2011). Previous reports have demonstrated a correlation between proviral load in saliva and oral manifestations such as gingivitis, periodontitis and high probe depth

(Lins et al., 2012). Additionally, HTLV-1 infected subjects with sicca syndrome presented higher proviral load compared to HTLV-1 sero-positive individuals without sicca syndrome (Giozza et al., 2007). When proviral load was higher than 100.000 copies/10<sup>6</sup> cells the risk to develop keratoconjunctivitis increased significantly (Vargens et al., 2011).

The present study aimed to evaluate if HTLV-1 infection was associated with severity of periodontitis as well as to determine whereas periodontitis severity was higher in HAM/TSP and no HAM/TSP patients. Additionally we evaluate if spontaneous cytokines production by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and proviral load in HTLV-1 infection was associated with severity of periodontitis.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Study design and patients**

This cross-sectional study aimed to evaluate association between HTLV-1 and chronic periodontitis severity in three groups: **1)** HTLV-1 infected individuals with periodontitis without HAM/TSP; **2)** HTLV-1 infected individuals with periodontitis and HAM/TSP; **3)** HTLV-1 negative patients with periodontitis (Control).

Participants of the study included 71 HTLV-1 infected patients from the HTLV-1 clinic of the Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos, Salvador, Brazil followed from 2008 to 2012 and a control group composed by 72 non-infected HTLV-1 patients with chronic periodontitis. Diagnosis of HTLV-1 in all patients enrolled in the clinic is based on detection of antibodies anti-HTLV-1 by ELISA (Cambridge BiotechCorp., Worcester, MA) and confirmed by Western-blot analysis (HTLV blot 2.4; Genelab, Singapore). Neurological and motor dysfunctions associated to HTLV-1 were measured by two scales: OMDS “Osame’s Motor Dysfunction Scale” and EDSS “Extended Disability Status Scale”. All patients selected to the study were > 18 years of age and had not received periodontal treatment or antibiotics at least 6 months prior to participating in the study. Each subject had a minimum of 8 teeth.

### **Case definitions**

#### ***HTLV-1 positive patients with periodontitis and HAM/TSP:***

Patients with chronic inflammatory periodontal disease and periodontal attachment loss measured by probing depth associated with biofilm or calculus, according to established

criteria of the 1999 World Workshop for the Classification of Periodontal Diseases and Conditions. HAM/TSP diagnosis was based on the World Health Organization (WHO, 1989) criteria. Besides neurological manifestations, all patients presented with EDSS  $\geq 3$  e OMDS  $\geq 1$ .

***HTLV-1 positive patients with periodontitis without HAM/TSP:***

HTLV-1 infected patients diagnosed with periodontitis by the same criteria previously described who did not fulfill the criteria for HAM/TSP and presented with EDSS e OMDS equal to zero.

***HTLV-1 non-infected patients with periodontitis***

Patients with periodontitis diagnosed according to previously described criteria and negative serology for HTLV-1.

We exclude from the study subjects who were  $< 18$  or who had a history of pregnancy, diabetes mellitus, HIV or HCV co-infection, smoking habits, helminthic infection and other neurological disorders.

The study was approved by the Ethics Committee of the hospital and written informed consent was obtained from all participants.

**Immunological evaluation and proviral load**

All patients enrolled in the cohort group of the HTLV-1 clinic of the Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos has TNF  $\alpha$ , INF  $\gamma$ , IL-5 e IL-10 spontaneous production and proviral load measured at the time of enrollment and periodically during follow-up visits. Data presented in this study were obtained from the data bank of the HTLV-1 clinic in the period of study (2008 a 2012). Briefly, cytokine production in PBMCs was determined by ELISA. Cell cultures were incubated at 37°C for 72 hours as previously described (Santos et al. 2004). To determine proviral load, in summary, DNA was extracted from mononuclear cells using proteinase K and salting-out method and proviral load quantified using real-time PCR method (Dehee et al.,2002).

**Periodontal examination**

The diagnosis of periodontitis was made according to the American Academy of Periodontology and severity measured by established criteria at the 1999 International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions (Caton & Armitage, 1999). Thus, chronic periodontitis severity was determined by clinical attachment loss (CAL)



and considered: **slight (CAL 1 to 2 mm), moderate (CAL 3 to 4mm) e severe (CAL  $\geq$  5mm).**

Clinical attachment loss was clinically measured as the distance between cement-enamel junction and probe depth in those individuals with periodontal disease signs that presented probing depth  $> 3$ mm. All clinical examinations were performed by the same trained and calibrated operator and were recorded at six sites (mesio, medio, disto/buccal and lingual) using a periodontal probe (UNC-15, Hu-Friedy, Chicago, IL, USA).

### **Statistical analysis**

Statistical analysis was performed by using GraphPad Prism v. 5.0 (San Diego, CA) and result of analysis considered significant if  $P$ -values  $\leq 0.05$ . The significance of the differences in observed frequency of periodontitis severity was identified by the  $\chi^2$  test. Comparison of different periodontitis severity degrees between groups was assessed by Fisher's exact test. Data from proviral load and cytokines production was expressed as median and interquartile (IQ) range in all figures. Non-parametric tests (Kruskal-Wallis test with Dunn's post-test and Mann-Whitney test) were used to compare continuous variables.

## **RESULTS**

A total of 143 patients with chronic periodontitis were included in this study (71 HTLV-1 infected individuals and 72 non-infected individuals as the control). Table 1 summarizes the demographic characteristics and shows similarity between study population. Patients did not differ regards age when HTLV-1 infected subjects (mean 54.47 years, SD 11.69) were compared to non-infected subjects (mean 50.13 years, SD 11.65),  $p=0.26$ . The majority of participants had age superior to 50 years, varying between 24 to 77 years. There were also no difference regarding gender ( $p=0.34$ ) and race ( $p=0.85$ ). The sample consisted of 24 infected patients with HAM/TSP, 47 infected patients without HAM/TSP and 72 non-infected patients (Table 2).

Slight, moderate and severe periodontitis were similarly distributed between infected individuals, despite development or not of HAM/TSP. Therefore, no statistical difference was found regarding periodontitis severity between HTLV-1 infected groups ( $p=0.916$ , Chi-square test). However, periodontitis severity was associated with HTLV-1 infection, as severe periodontitis was more frequent in HTLV-1 infected patients than in HTLV-1 non-infected patients ( $p=0.004$ ). Moderate periodontitis frequency was similar in the three groups

evaluated, been 23.4%, 25% e 18.1% respectively for HTLV-1 infection without myelopathy, HAM/TSP and non infected subjects ( $p=0.68$ ). Frequency of slight periodontitis was significantly higher in the non infected patients ( $p=0.0008$ ).

### **Proviral load in PBMCs from HTLV-1 infected patients with chronic periodontitis.**

Figure 1 shows the proviral load from cells of infected individuals with different degrees of periodontitis severity (slight, moderate and severe). The proviral load was determined from cells of 48 HTLV-1 infected patients from the data bank. Proviral load median in slight periodontitis was 144.457 copies/ $10^6$  cells (IQ 40.512 – 201.714 copies/ $10^6$  cells), 77.731 copies/ $10^6$  cells (IQ 10.449 – 198.314 copies/ $10^6$  cells) in moderate periodontitis, while patients with severe periodontitis had proviral load median of 182.701 copies/ $10^6$  cells (IQ 79.059 – 279.369 copies/ $10^6$  cells). No difference between proviral load in cells from HTLV-1 infected patients with slight, moderate and severe periodontitis was observed ( $P>0.05$ , Kruskal-Wallis test).

Subsequently, proviral load in severe periodontitis was compared between patients that developed or not HAM/TSP. As shown in figure 2, proviral load of HAM/TSP patients (median 180.060 copies/ $10^6$  cells, IQ 93.498 – 201.598 copies/ $10^6$  cells) with severe periodontitis differed significantly from that observed in infected individuals with no HAM/TSP (median 10.917 copies/ $10^6$  cells, IQ 0.0– 51.780 copies/ $10^6$  cells,  $P=0.014$ , Mann-Whitney test).

### **Profile of inflammatory and regulatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10 and IL-5) produced by PBMCs from patients with chronic periodontitis and HTLV-1 infection.**

Figure 3 presents the levels of spontaneous inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ ) produced by PBMCs in the three different degrees of chronic periodontitis.

IFN- $\gamma$  level in slight chronic periodontitis was 1379 pg/ml, IQ 253.5 – 2870. In patients with moderate periodontitis this cytokine level was 1761pg/ml, IQ 0 – 2632 pg/ml. HTLV-1 infected patients with severe periodontitis had a discreet lower levels of IFN- $\gamma$  (392 pg/ml, IQ 0 – 1655 pg/ml), even though no statistical difference was observed within the three degrees of periodontitis severity ( $p>0.05$ , Kruskal-Wallis test, Figure 3A). TNF- $\alpha$  levels produced by PBMC of HTLV-1 infected individuals, also did not differ within slight (600 pg/ml, IQ 19.75

– 1241 pg/ml), moderate (375.5 pg/ml, IQ 0 – 1257 pg/ml) and severe (198 pg/ml, IQ 0 – 1094 pg/ml) periodontitis,  $p>0,05$  (Figure 3B).

From the 32 HTLV-1 infected patients with severe periodontitis, 22 did not develop HAM/TSP and 10 were HAM/TSP. Profile of Th1 inflammatory cytokine (TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ ) produced by non stimulated were compared in these two groups (Figure 4).

IFN- $\gamma$  levels produced by cells of patients with severe periodontitis and no HAM/TSP was 671.5 pg/ml, IQ 41 – 2117. Patients with HAM/TSP presented IFN- $\gamma$  levels of 224 pg/ml, IQ 0 – 1639 pg/ml. No statistical difference in IFN- $\gamma$  levels was observed between HAM/TSP and no HAM/TSP patients with severe periodontitis ( $P=0.339$ , Mann-Whitney test, Figure 4A). TNF- $\alpha$  levels produced by PBMCs within patients with severe periodontitis, also did not show difference between HAM/TSP (164.5 pg/ml, IQ 0 – 627.3 pg/ml) and no HAM/TSP patients (295.5 pg/ml, IQ 3 – 1305 pg/ml),  $p=0.262$  (Figure 4B).

Profile of cytokines, Th2 (IL-5) and regulatory (IL-10), produced in PBMCs of HTLV-1 infected individuals within the three different degrees of periodontitis is shown in figure 6.

IL-5 levels produced by PBMCs in slight periodontitis was 9 pg/ml, IQ 0 – 125 pg/ml. Patients with moderate periodontitis presented levels of 22 pg/ml, IQ 0 – 185.5 pg/ml. Although, spontaneous production of IL-5 was diminished in patients with severe periodontitis (0 pg/ml, IQ 0 - 59 pg/ml), no statistical difference was observed when the three different degrees of periodontitis severity were compared ( $p>0,05$ , Kruskal-Wallis test, Figure 5A). A trend to a diminished spontaneous production of IL-10 was observed in HTLV-1 infected patients with severe periodontitis (0 pg/ml, IQ 0 – 9 pg/ml) compared to slight (16.5 pg/ml, IQ 0 – 118 pg/ml) and moderate (5 pg/ml, IQ 0 – 191 pg/m) periodontitis,  $p>0.05$ . (Figure 5B).

Additionally, spontaneous production of IL-5 and IL-10 in patients with severe periodontitis was compared between HAM/TSP and no HAM/TSP (Figure 6).

Expression of IL-5 was evaluated in PBMCs of 10 patients with severe periodontitis and HAM/TSP and 22 patients with severe periodontitis and no HAM/TSP. As shown in Figure 6A, IL-5 levels from HAM/TSP patients (20.5 pg/ml, IQ 0 – 97.75 pg/ml) did not differ from that observed in patients with no HAM/TSP (0 pg/ml, IQ 0 – 52 pg/ml,  $p=0.38$ , Mann-Whitney test). Spontaneous production of IL-10 in patients with severe periodontitis also did not differ in HAM/TSP (0 pg/ml, IQ 0 – 69.75 pg/ml) compared to patients with no HAM/TSP (0 pg/ml, IQ 0 – 9.5 pg/m,  $p=0.41$ , Mann-Whitney test, Figure 6B).

## DISCUSSION

The present study showed that HTLV-1 infection influences periodontitis severity, despite the development or not of the HAM/TSP. However we did not find an association between periodontitis severity and proviral load or production of pro-inflammatory cytokines.

A significant higher frequency of severe periodontitis was identified in HTLV-1 infected patients compared to non-infected patients with periodontitis. As expected, the frequency of slight periodontitis was significantly higher in non-infected patients what suggest that HTLV-1 may influence chronic periodontitis severity. Previous studies have shown that HTLV-1 may favour severity of other diseases such as strongyloidiasis (Porto 2001), tuberculosis (Pedral-Sampaio 1997) and liver disease in hepatitis C virus patients (Boshi-Pinto et al., 2000). It has also been shown that inflammatory diseases associated with HTLV-1 is more frequent in HAM/TSP than in HTLV-1 carriers. Here no significant differences were found regarding severity of chronic periodontitis when HAM/TSP individuals were compared to HTLV-1 carriers only. Our results demonstrated similar frequency of mild, moderate and severe periodontitis between HAM/TSP subjects and HTLV-1 infected individuals who do not fulfill the WHO criteria for HAM/TSP. In contrast to our findings, HAM/TSP has increased prevalence of some clinical manifestations. Patients with HAM/TSP were three times more likely to develop xerostomia when compared to patients without HAM/TSP (Martins et al., 2010) and keratoconjunctivitis was also more prevalent in HAM/TSP (Vargens et al., 2011). Other study revealed that dry syndrome was more common in HAM/TSP, although a large amount of HTLV-1 carriers presented with functional signs of buccal mucosa dryness (Giozza et al., 2007). Our finding is important as most of HTLV-1 infected individuals are considered carriers, only by the fact that they did not develop neurological dysfunctions that fulfill the WHO criteria for HAM/TSP. Our study identified that HTLV-1 infection increase periodontitis severity despite the development or not of myelopathy. Other authors have demonstrated similar concerns and have pointed out association of HTLV-1 infection in the absence of HAM/TSP with several disorders, such as arthralgia, arm or leg weakness, hand or foot numbness, noctúria, uveitis, dry syndrome, gingivitis and periodontitis (Caskey et al., 2007; Poetker et al., 2011).

Although increased proviral load has a direct relation with disease progression in HTLV-1 infection and is associated with HAM/TSP (Demontis et al., 2011), this marker did not seem to influence periodontal disease severity as the distribution was similar in mild, moderate and severe periodontitis ( $P=0.238$ ). Interestingly, severe periodontitis showed the lowest amount of proviral load, although it was not stastically significant. The fact that in the

present study proviral load had been measured in peripheral blood might explain the contradictory results compared to other studies. In the studies that showed influence of proviral load in oral manifestations such as gingivitis, periodontitis and probe depth, this marker were measured besides peripheral blood, also in saliva (Lins et al., 2012) or directly from periodontal tissue samples (Garlet et al., 2010). The weak correlation between proviral load in saliva and peripheral blood identified on the report of Lins et al. (2012) reinforce this hypothesis. Add to that, in the present study real time PCR was used to detect proviral load. A previous report pointed out there might have divergences on measurements related to the type of PCR utilized. In detection of cytomegalovirus specifically, proviral load was higher utilizing nested PCR when compared to real time PCR and viral culture test. Besides, the accordance index among the different types of PCR was lower than 50% in all groups evaluated and as low as 4.7% in one of the groups (Botero 2008). Indeed studies have shown an important variation in the proviral load when several determinations are performed. However, when proviral load in patients with severe periodontitis was compared between HAM/TSP and no HAM/TSP patients, statistical significance was found with HAM/TSP patients presenting higher values.

In the present study, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  expression was measured in the three severity degrees of periodontitis in HTLV-1 infected individuals. No significant changes were identified in these cytokines production at the different degrees of chronic periodontitis. A previous report evaluating cytokines mRNA expression in periodontal tissue showed a significant increasing in IFN- $\gamma$  and a decreased in the expression of FOXP3 in patients infected versus non-infected by HTLV-1 (Garlet et al., 2010). Divergences in our findings may be explained by the fact that in the study of Garlet et al. (2010) the results of cytokines expression presented were measured from mRNA expression directly from periodontal lesions whereas in the current study it was obtained from peripheral blood. Our findings failed to demonstrate association between TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  expression and periodontitis severity in HTLV-1 infection, as different from other studies including performed by one group that shows high levels of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  in HAM/TSP, in the current study spontaneous production of these cytokines in peripheral blood of HAM/TSP patients did not differ from those in HTLV-1 infected patients who do not fulfill the criteria for HAM/TSP. Therefore it possible that our sample size we did not have enough power to determine an association between pro-inflammatory cytokine production and severity of periodontitis.

Our findings did not show difference in the pattern of IL-5 production in HTLV-1 infected patients with slight, moderate and severe chronic periodontitis. However, although similar levels of IL-10 were found in the three degrees of periodontitis severity, HTLV-1

infected patients with severe periodontitis presented a trend toward a lower IL-10 expression, as well as an increase in slight periodontitis ( $P>0,05$ ). Since impairment of IL-10 ability to modulate immune response a possible mechanism to the influence of HTLV-1 in the pathogenesis of periodontal disease, this finding seems to be reasonable as in the present study patients with severe periodontitis presented lower values of IL-10 production.

As previously mentioned, one limitation of this study was the fact that cytokines were measured only at peripheral blood. Other investigators evaluating virus influence in periodontitis pathogenesis also collect samples from saliva, crevicular gingival fluid and periodontal lesions biopsies for comparison.

Data in the current study regarding high frequency of severe periodontitis in HTLV-1 infected individuals and evidences in previous study of interference in the overall proinflammatory and anti-inflammatory balance, as well as detection of virus in periodontal lesions supports the idea that HTLV-1 infection as a potential modifier of immune response, may increase not only periodontal disease susceptibility but also periodontitis severity, independent of the presence of HAM/TSP.

## REFERENCES

- 1- Bilichodmath S, Mangalekar SB, Sharma DCG, Prabhakar AK, Reddy SB, Kalburgi NB. Herpesvirus in chronic and aggressive periodontitis patients in an Indian population. *J Oral Sci* 2009, 51: 79-86.
- 2- Smith M, Seymour GJ, Cullinan MP. Histopathological features of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontol 2000* 2010, 53: 45-54.
- 3- Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol* 2003, 74: 391-401.
- 4- Kinane DF, Attstrom R. Advances in pathogenesis of periodontitis: group B consensus report of the fifth European Workshop in Periodontology. *J Clin Periodontol* 2005, 32(suppl 6): 130-1.
- 5- Claudini M, Trombone AP, Cardoso CR, Ferreira SB Jr, Martins W Jr, Assis GF, Santos CF, Trevilatto PC, Campanelli AP, Silva JS, Garlet GP. The broad effects of the functional IL-10 promoter 592 polymorphism: modulation of IL-10, TIMP-3 and OPG expression and their association with periodontal disease outcome. *J Leuk Biol* 2008, 84: 1565-73.

- 6- Teng YT. Mixed periodontal Th1-Th2 cytokine profile in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-specific osteoprogenin ligand (or RANK-L)- mediated alveolar bone destruction in vivo. *Infect immun* 2002, 70: 5269-73.
- 7- Cardoso CR, Garlet GP, Crippa GE, Rosa AL, Júnior WM, Rossi MA, Silva JS. Evidence of the presence of th17 cells in chronic lesions of human periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol* 2009, 24: 1-6.
- 8- Saygun I, Sahin S, Özdemir A, Kurtis B, Yapar M, Kubar A, Ozcan G. Detection of human viruses and clinical parameters. *J Periodontol* 2002, 73: 1437-43.
- 9- Saygun I, Kubar A, Özdemir A, Slots J. Periodontitis lesions are a source of salivary cytomegalovirus and Epstein-Barr virus. *J Periodontal Res* 2005, 40: 187-91.
- 10- Botero JE, Parra B, Jaramillo A, Contreras A. Subgingival human cytomegalovirus correlates with increased clinical periodontal parameters and bacterial coinfection in periodontitis. *J Periodontol* 2007, 78: 2303-10.
- 11- Teughels W, Sliepen I, Quirynen M, Haake SK, Van Eldere J, Fives-Taylor P, Van Ranst M. Human cytomegalovirus enhances *A. actinomycetemcomitans* adherence to cells. *J Dent Res* 2007, 86: 175-80.
- 12- Botero JE, Vidal C, Contreras A, Parra B. Comparison of nested polymerase chain reaction (PCR), real-time PCR and viral culture for the detection of cytomegalovirus in subgingival samples. *Oral Microbiol Immunol* 2008, 23: 239-44.
- 13- Falasca K, Vecchiet F, Ucciferri C, Vignale F, Conti P, Pizzigallo A, Piattelli A, Vecchiet J. Periodontitis and cytokine patterns in HIV positive patients. *Eur J Med Res* 2008, 13: 163-8.
- 14- Saygun I, Kubar A, Sahin S, Sener K, Slots J. Quantitative analysis of association between herpesviruses and bacterial pathogens in periodontitis. *J Periodontal Res* 2008, 43: 352-9.
- 15- Dawson DR, Wang C, Danaher RJ, Lin Y, Kryscio RJ, Jacob RJ, Miller CS. Salivary levels of Epstein-Barr virus DNA correlate with subgingival levels, not severity of periodontitis. *Oral Dis* 2009, 15: 554-9.
- 16- Grenier G, Gagnon G, Grenier D. Detection of herpetic viruses in gingival crevicular fluid of patients suffering from periodontal diseases: prevalence and effect of treatment. *Oral Microbiol Immunol* 2009, 24: 506-9.
- 17- Lin YL, Li M. Human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus inhibit oral bacteria-induced macrophage activation and phagocytosis. *Oral Microbiol Immunol* 2009, 24: 243-8.

- 18- Sahin S, Saygun I, Kubar A, Slots J. Periodontitis lesions are the main source of salivary cytomegalovirus. *Oral Microbiol Immunol* 2009, 24: 340-2.
- 19- Chalabi M; Rezaie F; Moghim S; Mogharehabet A; Rezaei M; Mehraban B. Periodontopathic bacteria and herpesviruses in chronic periodontitis. *Mol Oral Microbiol* 2010, 25: 236-40.
- 20- Foglio-Bonda PL, Gabriele M, Graziani F, De Andrea M, Mondini M, Gariglio M. High prevalence of human cytomegalovirus in a population of periodontally healthy subjects. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2010, 15: 292-6.
- 21- Bader N, Ivic-Kardum M. The role of cytomegalovirus infection in the pathogenesis of periodontal diseases. *Acta Clin Croat* 2011, 50: 61-6.
- 22- Thomasini RL, Bonon SH, Durante P, Costa SCB. Correlation of cytomegalovirus and human herpesvirus 7 with and cells in chronic periodontitis patients. *J Periodontal Res* 2012, 47:114-20.
- 23- Proietti FA, Carneiro-Proietti AB, Catalan-Soares BC, Murphy EL. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene* 2005, 24: 6058-68.
- 24- Dourado I, Alcantara LC, Barreto ML, da Gloria Teixeira M, Galvão-Castro B. HTLV-I in the general population of Salvador, Brazil. A city with African ethnic and sociodemographic characteristics. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003, 34: 527-31.
- 25- Caskey MF, Morgan DJ, Porto AF, Giozza SP, Muniz AL, Orge GO, Travassos MJ, Barrón Y, Carvalho EM, Glesby MJ. Clinical manifestations associated with HTLV type I infection: A cross-sectional study. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2007, 23: 365-71.
- 26- Castro
- 27- Giozza SP, Santos SB, Martinelli M, Porto MA, Muniz AL, Carvalho EM. Salivary and lacrymal gland disorders and HTLV-1 infection. *STOMAX* 2008, 152: 1-5.
- 28- Vargens CCL, Grassi MFR, Boa-Sorte N, Rathsam-Pinheiro RH, Olavarria VN, Kruschewsky RA, Galvão-Castro B. Keratoconjunctivitis sicca of human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) infected individuals is associated with high levels of HTLV-1 proviral load. *J Clin Virol* 2011, 52: 177-80.
- 29- Araújo AQ, Andrade-Filho AS, Castro-Costa CM, Menna-Barreto M, Almeida SM. HTLV-I associated Myelopathy/Tropical spastic paraparesis in Brazil: A nationwide survey. HAM/TSP brazilian study group. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1998, 19: 536-41.



- 30- Santos S, Oliveira P, Luna T, Souza A, Nascimento M, Siqueira I, Tanajura D, Muniz AL, Glesby MJ, Carvalho EM. Overactive bladder associated with human T-cell lymphotropic virus type 1 infection. *J Med Virol* 2012, 84: 1809-17.
- 31- Santos SB, Porto AF, Muniz AL, de Jesus AR, Magalhães E, Melo A, Dutra WO, Gollob KJ, Carvalho EM. 2004. Exacerbated inflammatory cellular immune response characteristics of HAM/TSP is observed in a large proportion of HTLV-I asymptomatic carriers. *Infect Dis* 2004, 4:7.
- 32- Santos SB, Porto AF, Muniz AL, Luna T, Nascimento MC, Guerreiro JB, Oliveira-Filho J, Morgan DJ, Carvalho EM. Modulation of T cell responses in HTLV-1 carriers and in patients with myelopathy associated with HTLV-1. *Neuroimmunol* 2006, 13:145-51.
- 33- Goon PK, Igakura T, Hanon E, Mosley AJ, Asquith B, Gould KG, Taylor GP, Weber JN, Bangham CRM. High circulating frequencies of tumor necrosis factor alpha- and interleukin-2-secreting human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-specific CD4<sup>+</sup> T cells in patients with HTLV-1-associated neurological disease. *J Virol* 2003, 77: 9716–22.
- 34- Brito-Melo GE, Peruhype-Magalhães V, Teixeira-Carvalho A, Barbosa-Stancioli EF, Carneiro-Proietti AB, Catalan-Soares B, Ribas JG, Martins-Filho OA. IL-10 produced by CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells emerge as a putative immunoregulatory mechanism to counterbalance the monocyte-derived TNF-alpha and guarantee asymptomatic clinical status during chronic HTLV-I infection. *Clin Exp Immunol* 2007, 147: 35-44.
- 35- Manss A, Hisad M, La Grenade L. Human T-Linphotropic virus type I infection. *Lancet* 1999, 353: 1951-8.
- 36- Garlet GP, Giozza SP, Silveira EM, Claudino M, Santos SB, Avila-Campos MJ, Martins W Jr, Cardoso CR, Trombone AP, Campanelli AP, Carvalho EM, Silva JS. Association of human T linphotropic virus I aplification of periodontitis severity with altered cytokine expression in response to a standard periodontopathogen infection. *Clin Infect Dis* 2010, 50: 11-18.
- 37- Demontis MA, Hilburn S, Taylor GP. The clinical utility of HTLV-1 viral load measurement. *Retrovirol* 2011, 8(suppl 1): A46.
- 38- Lins L, de Carvalho VJ, de Almeida Rego FF, Azevedo R, Kashima S, Gallazi VN, Xavier MT, Galvão-Castro B, Alcantara LC. Oral health profile in patients infected with HTLV-1: Clinical findings, proviral load, and molecular analysis from HTLV-1 in saliva. *J Med Virol* 2012, 84: 1428-36.

- 39- World Health Organization. Report of the scientific group on HTLV-I and associated disease. Kagoshima, Japan, December 1988: Virus disease Human T lymphotropic virus type I (HTLV-I). *The Weekly Epidemiological Record* 1989, 49: 382-3.
- 40- Dehee A, Cesaire R, Desire N, Lezin A, Bourdonne O, Bera O, Plumelle Y, Smadja D, Nicolas JC. Quantitation of HTLV-1 proviral load by a TaqMan real-time PCR assay. *J Virol Methods* 2002, 103: 37-51.
- 41- Porto AF, Neva FA, Bittencourt H, Lisboa W, Thompson R, Alcântara L, Carvalho EM. HTLV-1 decreases Th2 type of immune response in patients with strongyloidiasis. *Parasite Immunol* 2001, 23: 503-7.
- 42- Pedral-Sampaio DB, Netto EM, Pedroso C, Brites C, Duarte M, Harrington W. Co-infection of tuberculosis and HIV/HTLV retroviruses: frequency and prognosis among patients admitted in a Brazilian hospital. *Braz J Infect Dis* 1997, 1: 31-5.
- 43- Boschi-Pinto C, Stuver S, Okayama A, Trichopoulos D, Orav EJ, Tsubouchi H, Mueller N. A follow-up Study of morbidity and mortality associated with hepatitis C virus infection and its interaction with human T lymphotropic virus type I in Miyazaki, Japan. *J Infect Dis* 2000, 181: 35-41.
- 44- 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: 167-71.
- 45- Poetker SK, Porto AF, Giozza SP, Muniz AL, Caskey MF, Carvalho EM, Glesby MJ. Clinical manifestations in individuals with recent diagnosis of HTLV type I infection. *J Clin Virol* 2011, 51: 54-58.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1.** Proviral load in PBMCs from HTLV-1 infected patients with slight (n=15), moderate (n=13) and severe (n=20) periodontitis. Statistical analysis was performed by Kruskal-Wallis test.

**Figure 2.** Proviral load in PBMCs of HTLV-1 infected patients with severe periodontitis and HAM/TSP (n=8) and severe periodontitis with no HAM/TSP (n=12). Statistical analysis was performed by Mann-Whitney test.

**Figure 3.** Spontaneous production of IFN- $\gamma$  (A) and TNF- $\alpha$  (B) by PBMCs of HTLV-1 infected patients in slight (n=22), moderate (n=17) and severe (n=32) periodontitis. Statistical analysis performed by Kruskal-Wallis test.

**Figure 4.** Spontaneous production of IFN- $\gamma$  (A) and TNF- $\alpha$  (B) in PBMCs of HTLV-1 infected patients with severe periodontitis and HAM/TSP (n=10) and no HAM/TSP (n=22). Statistical analysis was performed by Mann-Whitney test.

**Figure 5.** Spontaneous production of IL-5 (A) and IL-10 (B) by PBMCs of HTLV-1 infected patients in slight (n=22), moderate (n=17) and severe (n=32) periodontitis. Statistical analysis was performed by Kruskal-Wallis test.

**Figure 6.** Spontaneous production of IL-5 (A) and IL-10 (B) in PBMCs of HTLV-1 infected patients with severe periodontitis and HAM/TSP (n=10) and no HAM/TSP (n=22). Statistical analysis was performed by Mann-Whitney test.

## TABLES

**Table 1. Demographic characteristics of HTLV-1 infected patients with periodontitis and non-infected patients with periodontitis (Control)**

Characteristics	HTLV-1 (n= 71)	Control (n= 72)	P
<b>Age</b>			0.26 <sup>a</sup>
Mean (SD)	54.47 (11.69)	50.13 (11.65)	
<b>Gender</b>			0.34 <sup>b</sup>
Female, n (%)	43 (60.6)	49 (68.1)	
Male, n (%)	28 (39.4)	23 (31.9)	
<b>Race</b>			0.85 <sup>b</sup>
White, n (%)	16 (22.5)	19 (26.4)	
Mulatto, n (%)	0 (42.3)	25 (34.7)	
Black, n (%)	25 (35.2)	28 (38.9)	
Others	0	0	

<sup>a</sup> Mann Whitney Test.

<sup>b</sup> Chi-square Test.

**Table 2. Frequency of chronic periodontitis severity in HTLV-1 infected patients (HAM/TSP and no HAM/TSP) and control (HTLV-1 non infected patients with chronic periodontitis).**

Chronic Periodontitis	Progression of HTLV-1 infection		Control	P <sup>a</sup>
	No HAM/TSP (n= 47) n (%)	HAM/TSP (n= 24) n (%)	Non infected (n= 72) n (%)	
Slight	14 (29.8%)	8 (33.3%)	45 (62.5%) <sup>c</sup>	0.0008
Moderate	11 (23.4%)	6 (25.0%)	13 (18.1%)	0.68
Severe	22 (46.8%) <sup>b</sup>	10 (41.7%) <sup>b</sup>	14 (19.4%)	0.004

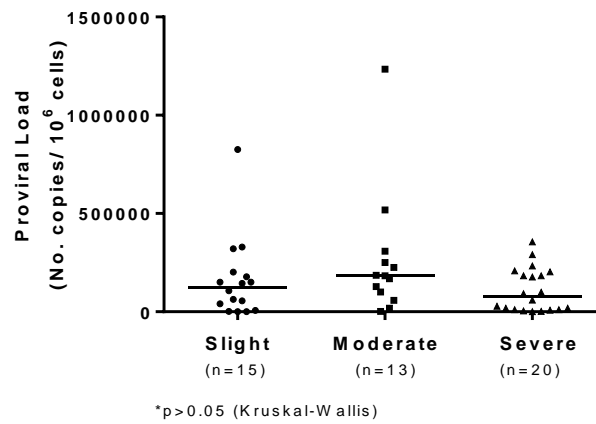
<sup>a</sup>Chi-square test.

<sup>b</sup>Statistically significant difference compared to control.

<sup>c</sup>Statistically significant difference compared to infected patients HAM/TSP and no HAM/TSP.

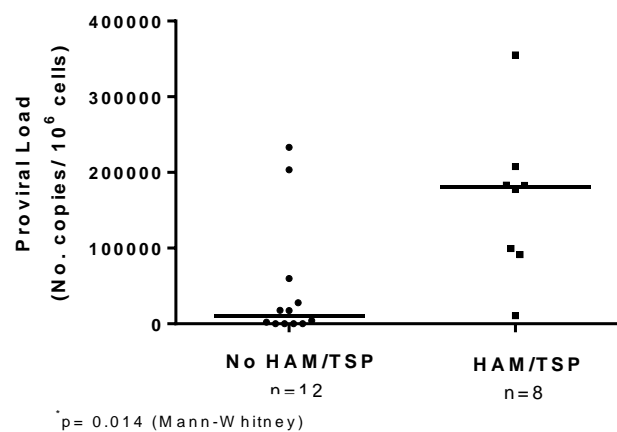
## FIGURES

**Figure 1.**



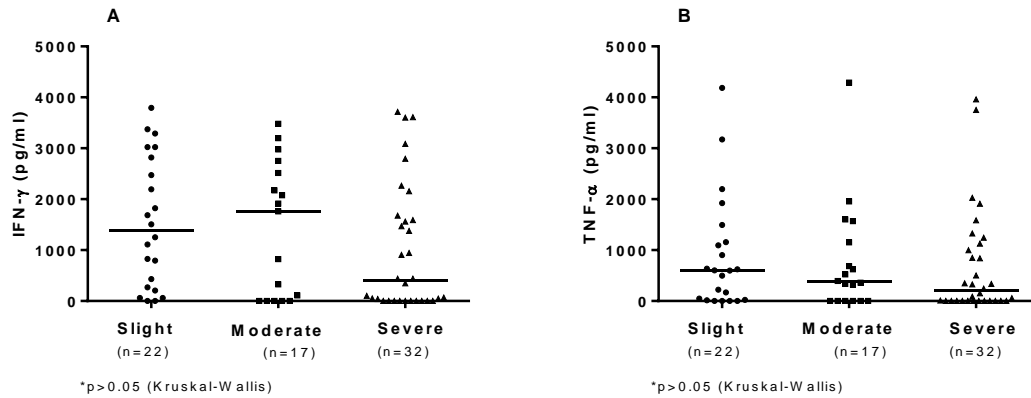
**Figure 1.** Proviral load in PBMCs from HTLV-1 infected patients with slight (n=15), moderate (n=13) and severe (n=20) periodontitis. Statistical analysis was performed by Kruskal-Wallis test.

**Figure 2.**



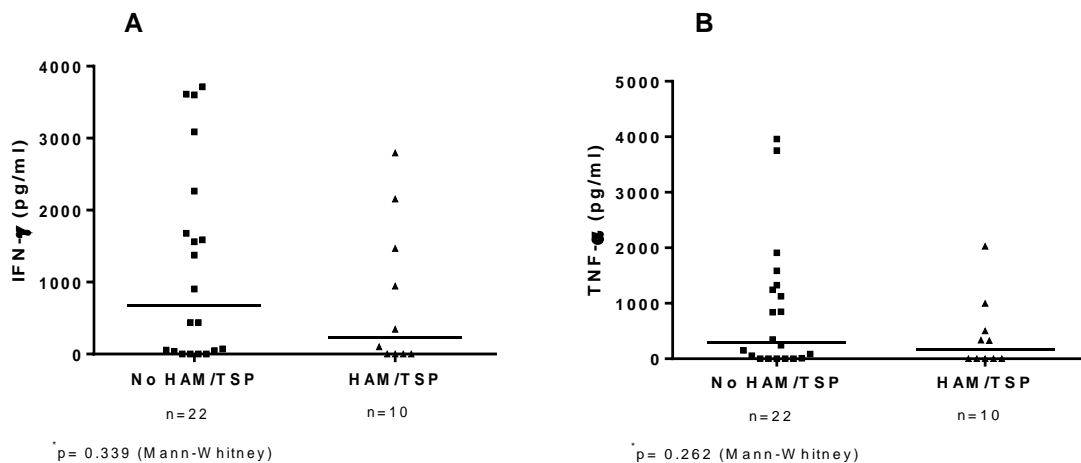
**Figure 2.** Proviral load in PBMCs of HTLV-1 infected patients with severe periodontitis and HAM/TSP (n=8) and severe periodontitis with no HAM/TSP (n=12). Statistical analysis was performed by Mann-Whitney test.

Figure 3.



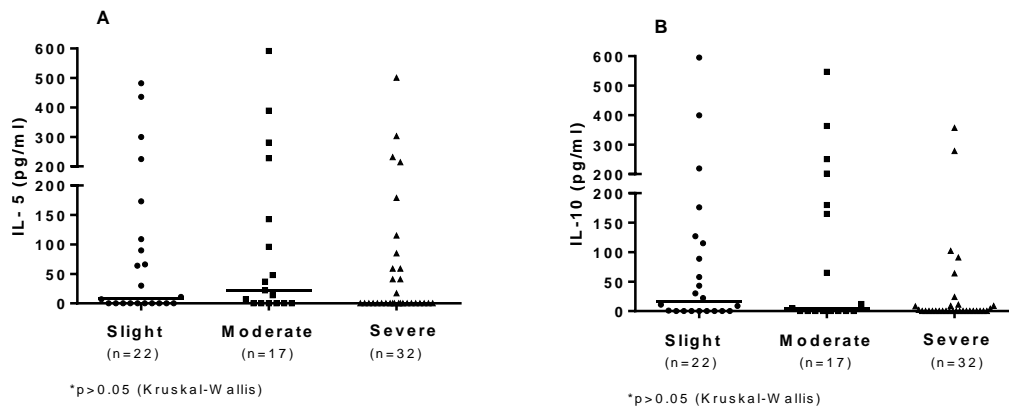
**Figure 3.** Spontaneous production of IFN- $\gamma$  (A) and TNF- $\alpha$  (B) by PBMCs of HTLV-1 infected patients in slight (n=22), moderate (n=17) and severe (n=32) periodontitis. Statistical analysis performed by Kruskal-Wallis test.

Figure 4.



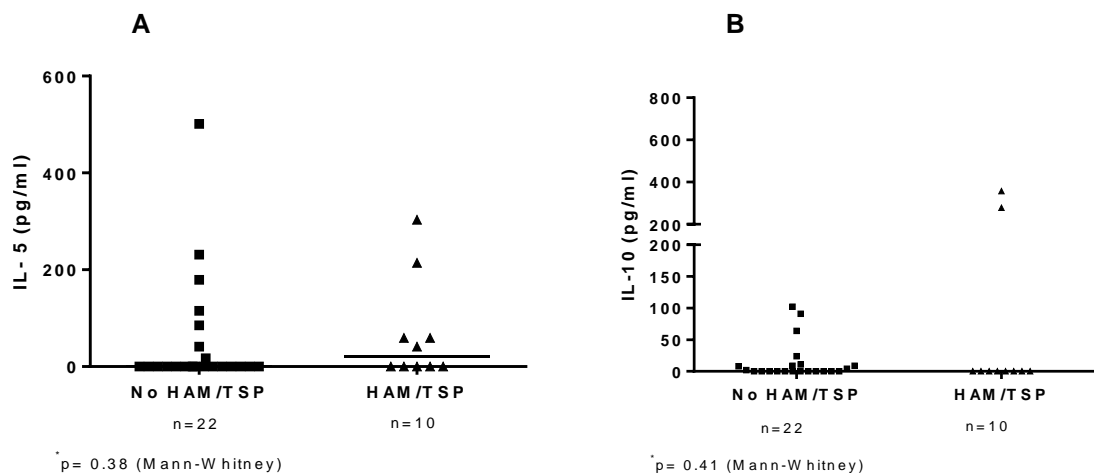
**Figure 4.** Spontaneous production of IFN- $\gamma$  (A) and TNF- $\alpha$  (B) in PBMCs of HTLV-1 infected patients with severe periodontitis and HAM/TSP (n=10) and no HAM/TSP (n=22). Statistical analysis was performed by Mann-Whitney test.

Figure 5.



**Figure 5.** Spontaneous production of IL-5 (A) and IL-10 (B) by PBMCs of HTLV-1 infected patients in slight (n=22), moderate (n=17) and severe (n=32) periodontitis. Statistical analysis was performed by Kruskal-Wallis test.

Figure 6.



**Figure 6.** Spontaneous production of IL-5 (A) and IL-10 (B) in PBMCs of HTLV-1 infected patients with severe periodontitis and HAM/TSP (n=10) and no HAM/TSP (n=22). Statistical analysis was performed by Mann-Whitney test.