



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA

MANIFESTAÇÕES ORAIS:
ASPECTOS CLÍNICOS E IMUNOLÓGICOS EM
INDIVÍDUOS PORTADORES DE HTLV-1

SILVANA PEREIRA GIOZZA

TESE DE DOUTORADO

Salvador – Bahia
2006



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**

**MANIFESTAÇÕES ORAIS:
ASPECTOS CLÍNICOS E IMUNOLÓGICOS EM
INDIVÍDUOS PORTADORES DE HTLV-1**

SILVANA PEREIRA GIOZZA

TESE DE DOUTORADO

**Salvador – Bahia
2006**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**

**MANIFESTAÇÕES ORAIS:
ASPECTOS CLÍNICOS E IMUNOLÓGICOS EM
INDIVÍDUOS PORTADORES DE HTLV-1**

SILVANA PEREIRA GIOZZA

Professor Orientador: EDGAR MARCELINO DE CARVALHO

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, como pré-requisito obrigatório para a obtenção do grau de Doutor.

**Salvador – Bahia
2006**

*Querer mais do que pode
Querer mais do que tem
Querer simplesmente!
Querer cumprir, terminar, accomplir
Querer o máximo
Apenas querer!
Apenas queira
Faça o máximo
Faça apenas
Faça simplesmente!*

Silvana

A William, Thomas e Aída

Com todo o amor que sinto por vocês!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu orientador, Dr. Edgar Marcelino de Carvalho, por sua coragem de ter apostado em mim e por sua dedicação nestes quatro anos de trabalho em conjunto.

AGRADECIMENTOS

Aos queridos pacientes do ambulatório multidisciplinar de HTLV-1, que, apesar das penas em que vivem, estão sempre dispostos a colaborar com a ciência. A todos, o meu mais sincero agradecimento;

Ao doador de sangue anônimo, que num ato de grande generosidade consentiu participar deste trabalho;

Ao meu queridíssimo grupo controle da sialometria, sem os quais este trabalho não teria sido realizado;

Ao CNPQ, pela bolsa de estudos;

Ao Dr. Roberto Meyer Nascimento, Coordenador do PPGIM, à Dra. Songeli Menezes Freire, Vice-coordenadora, e aos demais professores pela especial atenção durante todo o curso;

Ao Departamento de Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, por ter me concedido o direito de realizar este trabalho;

Ao Dr. Álvaro Cruz, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Medicina e Saúde, pela especial atenção;

Ao Dr. João Santana Silva, do Departamento de Imunologia e Bioquímica da Faculdade de Medicina da Universidade de Ribeirão Preto - USP, pela colaboração, sugestões e, sobretudo, por ter cedido seu laboratório para que uma parte importante deste trabalho fosse realizada;

Ao Dr. Gustavo Garlet, do Departamento de Imunologia e Bioquímica da Faculdade de Medicina da Universidade de Ribeirão Preto - USP, e atualmente, professor da Faculdade de Odontologia - USP - BAURU, por ter cooperado na avaliação da doença periodontal e por sua valiosa colaboração no laboratório de Imunologia e companheirismo no decorrer de todo esse tempo;

À Dra. Silvane Braga Santos, companheira de jornada, meu muito obrigada pela sua inestimável contribuição nas dosagens de citocinas e também nas áreas mais abstratas deste trabalho;

Aos meus colegas dentistas Dr. Marcos André Mattos Oliveira e Dra. Elizabeth Carvalho, por terem cedido gentilmente seus consultórios e sua experiência pessoal no atendimento clínico dos pacientes e na realização das biópsias de gengiva;

À Dra. Maria Aurélia Porto, pela inestimável colaboração;

Ao Dr. Valdir Lisboa, diretor do Serviço de Transfusão de Sangue STS, por ter permitido o acesso aos doadores de sangue; a Dra. Andréia, Lina, Marcelo e aos demais funcionários do banco de sangue STS, pela colaboração;

À Dra. Teresita Bendicho, colega do PPGIM e querida amiga, por ter me ajudado muito no início da avaliação dos doadores de sangue;

À Dra. Lívia, por ter realizado a avaliação oftalmológica dos pacientes;

À Mônica Martinelli, companheira de percalços;

Aos colegas, companheiros antigos e atuais do Ambulatório Multidisciplinar de HTLV-1:

Aurélia Porto	André Muniz
Adelmir Machado	Cláudio Bonfim
Caroline Bezerra	Daniel Morgan
Glória Orge	Jacqueline Guerreiro
Márcia Nascimento	Maria José Jóia
Marina Caskey	Mônica Martinelli
Néviton Castro	Paulo Oliveira
Silvane Santos	Tânia Luna
Thaís Reghiani	Tatiana Galvão

Aos meus professores do Serviço de Imunologia: Dra. Amélia Ribeiro de Jesus, Dr. Roque Pacheco, Dra. Maria Ilma de Araújo, Dr. Paulo Machado, pela dedicação e paciência no ensino da Imunologia, e, em particular, ao Dr. Albert Schriefer, por ter me ajudado a entender os meandros da biologia molecular, e também à Dra. Olívia Bacellar, pela sua gentileza e atenção.

Aos queridos amigos que trabalham ou trabalharam no Serviço de Imunologia: Elbe Mirtes, Lúcia Reis, Dilma Simplício, Clenildo Bispo, Orlando Sanches, Cristiano Sampaio, Dílson Monteiro, Balbina de Jesus, que sempre estiveram prontos a me ajudar com muito carinho e muita generosidade, sou-lhes infinitamente grata;

Aos demais colegas do Serviço de Imunologia e, em particular, à Ângela Giudice, amiga e ex-colega do PPGIM, pela sua extrema bondade;

Aos professores do PPGIM e, em especial, à Profa. Maria de Fátima Dias, Profa. Márcia Tosta e a Profa. Marilda Gonçalves, pelo carinho;

Agradeço a minha mãe, meus irmãos e minhas irmãs, pelo carinho e compreensão que tiveram comigo durante esse longo percurso e pelo exemplo de trabalho que norteia nossas vidas;

À lembrança de meu pai, que sempre nos incentivou a estudar, por acreditar “que o conhecimento é que nos faz ir para a frente”;

Dedico especial atenção ao meu irmão mais velho, João Pereira Leite Neto, que para mim ocupou o lugar do meu pai e nos transmite força e segurança; ao meu segundo irmão, José Lamarck Henriques Pereira, que vivenciou comigo momentos difíceis nos tempos de estudante em João Pessoa e que sempre foi generoso e solidário;

Ao meu Tio Zezito, irmão do meu Pai, pelo exemplo de vida acadêmica;

À minha irmã Germana Henriques de Sousa pela revisão cuidadosa e carinhosa do meu texto;

À Andressa, Maria Helena, Dr. Szpirglas e aos meus amigos espalhados pelo mundo.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	x
RESUMO	xiii
1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Aspectos virológicos	14
1.2. Aspectos epidemiológicos da infecção pelo HTLV-1	17
1.3. Doenças associadas ao HTLV-1	20
1.3.1. Alterações clínicas orais e a infecção pelo HTLV-1	22
1.3.2. Síndrome Seca e a infecção pelo HTLV-1	24
1.4. Imunopatogênese da infecção pelo HTLV-1	27
1.5. Doença periodontal e a infecção pelo HTLV-1	31
2. OBJETIVOS	37
2.1. Geral	37
2.2. Específicos	37
3. RESULTADOS	38
3.1. Manuscrito 1	38
3.2. Manuscrito 2	53
3.3. Manuscrito 3	68
4. DISCUSSÃO GERAL	82
5. CONCLUSÃO	96
6. SUMMARY	98
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SIGLAS

ANA	Anticorpo antinuclear
ANTI-SS-A	Auto-anticorpo relacionado à síndrome de Sjögren A
ANTI-SS-B	Auto-anticorpo relacionado à síndrome de Sjögren B
ATLL	Leucemia e Linfoma de Células T do Adulto
B7	Moléculas co-estimulatórias presentes nas células apresentadoras de antígenos
BLV	Vírus da leucemia bovina
CD40	Moléculas co-estimulatórias presentes em células apresentadoras de antígenos
CD40L	Moléculas co-estimulatórias presentes nas células T
CDR3	Receptor de células T (terceira região de complementaridade)
CMSP	Células Mononucleares do Sangue Periférico
Células Th1	Células T “helper” (auxiliadoras) do tipo 1
Células Th2	Células T “helper” (auxiliadoras) do tipo 2
CREB	Proteína ligante do elemento responsivo à Adenosina Monofosfato Cíclico (AMPc)
EBV	Vírus Epstein-Barr
ENV	Envelope
FR	Fator Reumatóide
GLUT1	Transportador ubíquo de glicose
GM-CSF	Fator estimulador de Colônias de Macrófagos e Granulócitos
HAM/TSP	Paraparesia Espástica Tropical e Mielopatia associada ao HTLV-I
HCMV	Citomegalovírus humano
HCV	Vírus da Hepatite C
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HLA-A2	Antígeno de Leucócito Humano de classe I
HLA-DR	Antígeno de Leucócito Humano de classe II
HLA	Antígeno de Leucócito Humano de classe II
HLA DR4	Antígeno de Leucócito Humano de classe II
HLA-A26	Antígeno de Leucócito Humano de classe II
HTLV-I	Vírus Linfotrópico de Células T Humanas

IFN- γ	Interferon gama
IL-1	Interleucina 1
IL-1 α	Interleucina 1 alfa
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
IL-2	Interleucina 2
IL-3	Interleucina 3
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IP-10 (CXCL10)	Quimiocina quimiotática para células T ativadas Th1 > Th2
I-TAC (CXCL11)	Quimiocina quimiotática para células T ativadas
MHC classe I	Complexo principal de histocompatibilidade classe I
MHC classe II	Complexo principal de histocompatibilidade classe II
MIG (CXCL9)	Quimiocina quimiotática para células T ativadas
MMPs	Metaloproteinases
MMP-9	Metaloproteinases
NF- κ B	Fator de ativação nuclear
ORFs I	Fase Aberta de Leitura I
ORFs II	Fase Aberta de Leitura II
OPR III	Fase Aberta de Leitura III
OPR IV	Fase Aberta de Leitura IV
OPG	Osteoprotegerina
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PPD	Derivado Protéico Purificado de Mycobacterium bovis
RANKL	Receptor ativador de NF- κ B ligante
RANK	Receptor ativador de NF- κ B
RNA _m	Ácido Ribonucléico mensageiro
Real-Time PCR	Reação de polimerase em cadeia quantitativo

SRF	Fator de resposta do soro humano
SNC	Sistema Nervoso Central
TGF- β	Fator de Crescimento e Transformação Beta
TIMPs	Inibidores teciduais de metaloproteinases
TIMP - 1	Inibidor tecidual de metaloproteinases 1
TIMP - 3	Inibidor tecidual de metaloproteinases 3
TNF - α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TAX	Ativador transcricional da região pX
LTR	Longas Seqüências Terminais Repetitivas
UDI	Usuários de drogas injetáveis
V-gene	Segmento gênico da região V

RESUMO

GIOZZA, S. P. MANIFESTAÇÕES ORAIS: ASPECTOS CLÍNICOS E IMUNOLÓGICOS EM INDIVÍDUOS PORTADORES DE HTLV-1. [Oral manifestations: Clinical and immunological aspects in HTLV-1 carriers]. Salvador, 2006. 50 p. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências da Saúde, Serviço de Imunologia, Hospital Unversitário Prof. Edgar Santos – HUPES – Universidade Federal da Bahia. Esta tese é composta de três estudos que avaliaram a repercussão da infecção pelo HTLV-1 na cavidade bucal. O primeiro avaliou o estado da saúde oral, assim como a frequência de síndrome seca numa amostra de 100 indivíduos infectados pelo HTLV-1 comparados com 100 doadores de sangue HTLV-1 soronegativos pareados por sexo e idade. O segundo avaliou, a função das glândulas salivares em indivíduos portadores de HTLV-1, em indivíduos com HAM-TSP e em indivíduos HTLV-1 soronegativos e a correlação entre os níveis de citocinas pró-inflamatórias no sangue periférico com o fluxo salivar. O terceiro avaliou a interação entre a infecção pelo HTLV-1 com doenças bacterianas, através da análise da resposta imune inflamatória *in situ* da periodontite crônica em indivíduos HTLV-1 soropositivos comparados com periodontite agressiva, periodontite crônica e periodonto sadio em indivíduos HTLV-1 soronegativos. Observou-se que a alteração mais freqüente foi boca seca, seguida por periodontite crônica e por mobilidade dental significativa. Indivíduos HTLV-1 soropositivos e soronegativos não apresentaram diferenças em relação à edentação total, má higiene oral, cárie e história de herpes labial. Xerofthalmia foi mais expressiva no grupo infectado do que xerostomia, que não mostrou diferença entre os grupos. A análise multivariada através de Regressão Logística Condicional mostrou que no grupo infectado, gengivite, periodontite, mobilidade dental e estomatite por dentadura mantiveram-se significantes após o ajuste para a má higiene oral, considerada variável confundidora. O exame clínico bucal evidenciou a presença significativa de boca seca em 75% dos pacientes com HAM-TSP e em 22% dos indivíduos portadores de HTLV-1. A proporção de indivíduos com hipossalivação foi maior no grupo com HAM-TSP (44%) do que nos indivíduos portadores de HTLV-1 (28%) $p < 0,05$. Houve associação significativa entre os sinais objetivos de boca seca e hipossalivação, confirmando a importância do exame clínico bucal. A análise da resposta imune em relação ao fluxo salivar não se mostrou significativa. A análise da expressão de citocinas em tecido gengival com e sem doença, através de Real-Time PCR mostrou que na infecção pelo HTLV-1 a resposta imune é exacerbada com a expressão de altos níveis de IFN- γ e de IL-10 e assemelha-se à resposta imune encontrada no sangue periférico. Estes resultados sugerem que o estado da saúde oral nos indivíduos infectados pelo HTLV-1 é mais pobre comparada com doadores de sangue HTLV-1 soronegativos e que no curso da infecção pelo HTLV-1 deve-se dar atenção à saúde oral a fim de preservar a integridade dos tecidos e melhorar a qualidade de vida dos indivíduos infectados.

Palavras chaves: 1. HTLV-1; 2. Síndrome seca; 3. Periodontite; 4. Xerofthalmia; 5. Xerostomia.

1 . INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos Viroológicos

O vírus linfotrópico humano de células T do tipo 1 (HTLV-1) foi o primeiro retrovírus isolado no ser humano. As primeiras descrições desse vírus ocorreram no início dos anos 80, nos Estados Unidos por Poiesz e colaboradores (1980), através de análises em linhagem de células T humanas provenientes de pacientes com uma forma de linfoma cutâneo de células T, também denominado de micose fungóide ou leucemia de células T de Sezary. Mais tarde, em 1982, foi isolado no Japão um retrovírus a partir de um paciente adulto com leucemia de células T, designado de vírus associado à leucemia de células T do adulto (ATLV) (Yoshida, Miyoshi *et al.*, 1982). Após a realização de análises comparativas de isolados do ATLTV e do HTLV percebeu-se que se tratava do mesmo vírus e a partir de então adotou-se a nomenclatura de **HTLV** para o referido agente etiológico (Gallo, Blattner *et al.*, 1982). Posteriormente, em 1985, demonstrou-se a presença de anticorpos específicos para o HTLV-1 em pacientes oriundos da Martinica com um tipo de mielopatia crônica-progressiva, referida também como paraparesia espástica tropical (**TSP**). No Japão, descrevera-se uma entidade clínica semelhante, para a qual se deu o nome de mielopatia associada ao HTLV-1 (**HAM**) (Osame, Usuku *et al.*, 1986). Como verificou-se que estas doenças representavam a mesma entidade, a mielopatia decorrente da infecção pelo HTLV-1 passou a ser chamada de HAM/TSP.

Em 1982, o vírus linfotrópico humano de células T do tipo 2 (HTLV-2) foi isolado a partir de linhagem celular de paciente com leucemia, denominada de leucemia de células pilosas (Takatsuki, 2005). Recentemente, foram identificados o

HTLV-3 e o HTLV-4 na República dos Camarões, na África Central. O HTLV-3 faz parte da linhagem filogenética do STLV-3 e o HTLV-4 pertence a uma linhagem filogenética distinta de todos os STLVs e HTLVs conhecidos (Wolfe, Heneine *et al.*, 2005). O HTLV-1 é o mais estudado destes vírus e variantes genótípicas, conhecidas como subtipos virais, têm sido documentadas. Com base na diversidade genotípica do *long terminal repeat* (LTR) viral, foram reconhecidos, inicialmente, 5 subtipos de HTLV-1, classificados de acordo com a área geográfica onde predominavam, da seguinte forma: subtipo cosmopolita, encontrado em amostras obtidas de portadores da infecção residentes em todos os continentes; subtipo japonês; subtipo da África ocidental; subtipo centro-africano e subtipo da Melanésia (Vidal, Gessain *et al.*, 1994). O subtipo cosmopolita pode ser classificado em subtipo cosmopolita A, B e C (Miura, Yamashita *et al.*, 1997).

Os vírus HTLV-1 e HTLV-2 são retrovírus complexos, classificados morfológicamente como retrovírus do tipo C. Pertencem à família *Delta Retroviridae*, particularmente à subfamília *Oncovirinae* (Coffin, 1996), juntamente com o vírus da leucemia bovina (BLV) e com outros vírus linfotrópicos do símio, como o STLV-1. Os vírus HTLV-1 e HTLV-2 compartilham similaridades estruturais genômicas, apresentando 70% de homologia genética entre si (Feuer e Green, 2005). Constituem-se de partículas virais esféricas, medindo aproximadamente 100 nanômetros de diâmetro; compostas de um core central eletrodense, que contém duas cópias de ácido ribonucléico (RNA) de fita única com 8,8 e 9 quilobases de tamanho, a enzima transcriptase reversa, as proteínas da matriz viral e o capsídeo protéico, além de um envelope externo composto de glicoproteínas (Veronesi e Focaccia, 2000). O genoma viral é constituído por vários genes essenciais *gag*, *pol* e *env*, além de uma região pX, situada na extremidade 3', que codifica genes

reguladores e acessórios, e por dois segmentos LTR situados nas extremidades 5' e 3', que contêm as regiões reguladoras da transcrição viral. O HTLV-1 codifica proteínas reguladoras a partir da região pX através de quatro *open reading frames* (OPR), sendo que a OPR IV e a OPR III codificam as proteínas reguladoras Tax e Rex, respectivamente (Kiyokawa, Seiki *et al.*, 1985; Seiki, Hikikoshi *et al.*, 1985). A proteína Tax atua como transativadora. Ela ativa o início da transcrição viral a partir de promotores virais localizados na região U3 do segmento LTR. A proteína Rex age como reguladora pós-transcricional da expressão de genes virais (Younis e Green, 2005). As ORFs I e II codificam as proteínas acessórias p12/p27 e p13/30, respectivamente, enquanto as ORFs I, II e V do HTLV-2 codificam as proteínas acessórias p10, p28 e p11, respectivamente. A função destas proteínas para a biologia do HTLV ainda não é claramente conhecida. Alguns estudos indicam, entretanto que elas são importantes para a capacidade do vírus de **infectar, persistir e se disseminar *in vivo*** (Bartoe, Albrecht *et al.*, 2000).

Apesar do HTLV-1 e 2 apresentarem propriedades patogênicas distintas *in vivo*, ambos possuem a capacidade de infectar e transformar células T cultivadas em células neoplásicas. Desconhecem-se quais são os mecanismos básicos pelos quais células T são transformadas pelo HTLV. Sabe-se, entretanto que estão relacionados com a proteína viral transativadora, Tax (Feuer e Green, 2005). Além de atuar como forte indutora de transformação leucêmica, levando ao aparecimento de ATLL e de ser indutora da replicação viral, a proteína Tax, atuando como antígeno, é o principal alvo da resposta citotóxica exacerbada dirigida contra o HTLV (Bangham, 2000). Outras funções da proteína Tax referem-se a sua capacidade de ativar a transcrição de genes, incluindo genes reguladores de várias funções celulares, como aqueles que codificam a IL-2, o receptor alfa da IL-2,

imprescindíveis para o crescimento celular (Uchiyama, Hori *et al.*, 1985) , GM-CSF, IL-3, IL-6, e TGF- β . Outros genes, como os genes envolvidos com o ciclo celular, receptor de citocinas, apoptose e diferenciação foram, igualmente, identificados (Yoshida, 2005). A proteína Tax não se liga diretamente ao DNA; sua atividade transativadora dá-se através de vias intracelulares que envolvem fatores de transcrição como *cyclic AMP-responsive element binding protein* (CREB), *serum responsive factor* (SRF) e NF-kB (Kashanchi, Duvall *et al.*, 1998; Portis, Harding *et al.*, 2001; Kashanchi e Brady, 2005).

A célula do hospedeiro infectada pelo HTLV-1 é, primariamente, a célula T CD4+, embora outros tipos de células humanas possam ser infectadas *in vitro* (Yamamoto, Yoshino *et al.*, 1982). Células T CD8+ aparentam ser o reservatório do HTLV-2 *in vivo*. Recentemente, demonstrou-se que o transportador ubíquo de glicose (GLUT1) serve como receptor celular para as glicoproteínas do envelope (Env) dos vírus HTLV-1 e 2 e exerce um papel central na infecção por estes vírus (Manel, Kim *et al.*, 2003).

1.2. Aspectos epidemiológicos da infecção pelo HTLV-1

O HTLV-1 é um vírus cosmopolita, com ampla distribuição mundial. Apresenta um padrão de infecção persistente, não se transmite facilmente, permanece no interior das famílias e regiões por longos períodos e aparenta ter sido um vírus exógeno do homem na Antigüidade. Seu modo de transmissão ocorre por via sexual, transfusão de sangue e de hemoderivados, amamentação, bem como através do uso de drogas injetáveis (Gallo, 2005).

Embora não se conheça o número exato de indivíduos infectados, estima-se que a infecção pelo HTLV atinja, aproximadamente, entre 15 a 20 milhões de pessoas (De The e Kazanji, 1996). A sua prevalência varia de forma significativa de acordo com a região geográfica, o grupo étnico e/ou racial e a população de risco (Proietti, Carneiro-Proietti *et al.*, 2005). No Japão, existem regiões, que apresentam prevalência elevada com aproximadamente 37% de soroprevalência (Yamaguchi, 1994), enquanto na França a soroprevalência entre doadores de sangue é de aproximadamente, 0,0039% (Courouce, Pillonel *et al.*, 1993).

A maior endemicidade ocorre no Japão, acima de 10% (Yamaguchi, 1994); Caribe, principalmente Jamaica e Trinidad, acima de 6% (Murphy, Figueroa *et al.*, 1991); África, em países como Benin, República dos Camarões e Guiné-Bissau, acima de 5% (Dumas, Houinato *et al.*, 1991; Gessain e De The, 1996; Sarkodie, Adarkwa *et al.*, 2001); em regiões isoladas como Iran e Melanésia, abaixo de 5% (Mueller, 1991).

Na América do Sul, a distribuição do HTLV-1 é extremamente variada. As maiores endemicidades ocorrem principalmente, em populações com ancestrais africanos, mas também, em menor grau, em populações descendentes de japoneses (Kazanji e Gessain, 2003). A mais alta prevalência se dá ao longo da costa colombiana do Pacífico, variando entre 0,9% a 4,3% em descendentes de africanos (Maloney, Ramirez *et al.*, 1989). Além da Colômbia, outras áreas que apresentam focos documentados de infecção pelo HTLV-1 são: Brasil, Peru, Chile e Argentina (Gotuzzo, Arango *et al.*, 2000; Kazanji e Gessain, 2003). Populações ameríndias também apresentaram focos de endemicidade, principalmente para o HTLV-2. Nessas populações, a endemicidade do HTLV-1 é rara (Kazanji e Gessain, 2003).

No Brasil, onde ocorre uma grande variação de características climáticas, geográficas e populacionais, e onde os descendentes de africanos estão concentrados na região nordeste, os descendentes de japoneses nas regiões sul e sudeste e os ameríndios com maior concentração na região norte do país, não existem estudos nacionais representativos destas populações. Entretanto, um estudo nacional realizado entre doadores de sangue demonstrou uma prevalência estimada de 0,41%. Neste estudo, demonstrou-se que a cidade de Salvador aparenta ser o epicentro da infecção com 1,35% dos doadores de sangue infectados (Galvão-Castro, Loures *et al.*, 1997). Outro estudo, realizado especificamente em usuários de drogas injetáveis (UDI) na cidade de Salvador, revelou uma prevalência geral de HTLV-1/2 de 35,2%, sendo 25,5% infectados somente pelo HTLV-1 e 8,8% somente pelo HTLV-2. Nesta população específica de usuários de drogas, o HTLV-1 foi identificado em 72,4% dentre os HTLV soropositivos. A prevalência de co-infecção entre o HTLV-1 e o vírus da imunodeficiência humana (HIV) foi documentada em 22,2% e 10,6% entre o HTLV-2 e o HIV (Andrade, 1998).

Recentemente, um estudo realizado entre a população geral de Salvador (Dourado, Alcantara *et al.*, 2003) revelou uma prevalência de 1,76% para o HTLV-1. Foi também documentado, que a soroprevalência foi maior em mulheres (2%) do que em homens (1,2%) e que estava relacionada com o aumento da idade, crescendo substancialmente, entre os indivíduos maiores de 51 anos (8,4%). Além disso, evidenciou-se que fatores sociais, como baixa renda e moradia insalubre pareciam associar-se com soroprevalência, embora não tenham sido estatisticamente significantes (Dourado, Alcantara *et al.*, 2003). O subtipo viral encontrado em Salvador pertence ao **HTLV-1 Cosmopolita, subtipo A**, pertencente ao subgrupo **Transcontinental**, *cluster* latino-americano. Calcula-se que existam na

cidade, aproximadamente, 40.000 pessoas infectadas (Dourado, Alcantara *et al.*, 2003).

Em áreas geográficas não endêmicas, como na Europa e nos Estados Unidos da América (EUA), a soroprevalência é baixa entre doadores de sangue: 0,01-0,03% nos EUA e Canadá (Murphy, Figueroa *et al.*, 1991) 0,002% na Noruega (Stigum, Magnus *et al.*, 2000) e 0,0056% na Grécia (Tseliou, Spanakis *et al.*, 2003). É encontrada, sobretudo, em imigrantes oriundos de áreas endêmicas, em áreas de prostituição e entre usuários de drogas injetáveis.

1.3. Doenças associadas ao HTLV-1

As principais condições clínicas relacionadas ao HTLV-1 são ATLL e HAM/TSP, presentes em todas as áreas endêmicas, apesar de apresentarem heterogeneidade geográfica significativa em relação à prevalência e à incidência (Proietti, Carneiro-Proietti *et al.*, 2005). Além destas, outras condições como uveíte e dermatite infectiva são, claramente, associadas ao HTLV-1. Outras doenças citadas, mas que necessitam de comprovação de associação de causa e efeito incluem artropatia associada ao HTLV, polimiosite, tireoidite e síndrome de Sjögren (Eguchi, Matsuoka *et al.*, 1992).

Estima-se que apenas um pequeno percentual (5%) de indivíduos infectados desenvolve doença, enquanto a grande maioria permanece assintomática. Desconhecem-se quais mecanismos ocasionam a mudança entre o estado de infecção latente e o aparecimento ou progressão da doença (Manns, Miley *et al.*, 1999a). Para a ATLL, o período de latência é de, aproximadamente, 10 a 40 anos, sendo que a infecção na infância está associada, na maioria dos casos, ao aumento

do risco de desenvolvimento de doença. Em relação à HAM/TSP, não se sabe ao certo o tempo de latência do vírus até o aparecimento da doença (Manns, 1999). Em indivíduos que se infectaram através de transfusão de sangue contaminado, o surgimento de doença ocorreu durante um período indeterminado, variando de semanas até alguns anos, após a infecção (Gout, Baulac *et al.*, 1990). A HAM/TSP é uma doença de curso indefinido caracterizada por dores lombares, parestesias, fraqueza em membros inferiores, seguida por espasticidade, dificuldade e incapacidade para deambular. Ao exame, observa-se, além de espasticidade, hiperreflexia profunda em membros inferiores, clônus e sinal de Babinski.

Além de doenças inflamatórias, a associação de HTLV-1 com doenças bacterianas é bem fundamentada na literatura, como se pode observar nos casos de dermatite infectiva (Lagrenade, Hanchard *et al.*, 1990; Lagrenade, Morgan *et al.*, 1995; Mahe, Meertens *et al.*, 2004; Primo, Brites *et al.*, 2005), uma doença cutânea crônica associada a infecção pelo *Staphylococcus aureus* que acomete crianças e adultos jovens portadores de HTLV-1, considerada como pródromo de mielopatia e também de leucemia e linfoma de células T associadas ao HTLV-1 (HAM/TSP e ATLL).

Há alguns anos, na cidade de Salvador, avaliou-se a frequência do HIV e/ou HTLV-1 em indivíduos com tuberculose e o efeito da co-infecção destes retrovírus sobre o prognóstico da doença. Detectou-se nesta amostra analisada, que o HTLV-1 era tão freqüente quanto o HIV em indivíduos com tuberculose e que ambos os retrovírus contribuíram, igualmente, para um pior prognóstico da tuberculose, com um percentual de 25% de óbito em indivíduos infectados pelo HTLV-1 (Pedral-Sampaio, Martins Netto *et al.*, 1997). Outro estudo mais recente mostrou igualmente

associação entre a soropositividade para o HTLV-1 e o primeiro diagnóstico de tuberculose (Marinho, Galvão-Castro *et al.*, 2005).

Adicionalmente, relatos na literatura reportaram a associação entre o HTLV-1 e outras doenças bacterianas como Hanseníase, assim como a redução da reatividade ao PPD em indivíduos HTLV-1 soropositivos (Tachibana, Okayama *et al.*, 1988; Hisada, Stuver *et al.*, 1999). É igualmente bem conhecida na literatura a co-infecção do HTLV-1 com ácaros, o *Sarcoptes scabiei*, e com parasitos. Dentre estes se destacam às co-infecções com *Strongiloides stercoralis* e *Schistosoma mansoni* (Porto, Neva *et al.*, 2001; Brites, Weyll *et al.*, 2002; Porto, Santos *et al.*, 2005).

1.3.1 Alterações clínicas orais e a infecção pelo HTLV-1

As doenças periodontais, são doenças correlacionadas com a presença da placa dental bacteriana, um biofilme aderido à superfície dental e em íntima associação com os tecidos periodontais. Atingem, em diferentes níveis de gravidade, quase a totalidade da população, sendo importante causa de perda dental entre adultos (Consensus report. Periodontal diseases: epidemiology and diagnosis, 1996). Ressalte-se que a manifestação e a progressão da periodontite são influenciadas por uma ampla variedade de fatores tais como: características individuais do hospedeiro, fatores sociais e comportamentais, sistêmicos, genéticos, dentários e composição microbiana da placa dental (Nunn, 2003).

O curso da periodontite pode variar consideravelmente de acordo com a idade do indivíduo. Em adolescentes e adultos jovens a doença é, caracteristicamente, agressiva e relativamente breve. Em indivíduos mais velhos o curso da doença é mais lento e associado com frequência à inflamação gengival mais marcante, com

grande acúmulo de placa dental e cálculo e quantidade maior de estímulo bacteriano. Estas observações sugerem que a periodontite agressiva em pacientes jovens requer uma quantidade menor de estímulo bacteriano para desencadear uma resposta característica de doença mais progressiva do que a forma crônica em indivíduos mais velhos (Saygun, Kubar *et al.*, 2004).

Considera-se, tanto a periodontite agressiva quanto a periodontite crônica, como um contínuo espectro de doenças, no qual a expressão clínica depende da presença de agentes específicos e da condição imune do hospedeiro (Saygun, Kubar *et al.*, 2004). Entretanto, haja vista à complexidade da microbiota patogênica e dos efeitos fisiopatológicos dos diferentes mediadores pró e antiinflamatórios, é difícil delinear os eventos patogênicos que dão início à periodontite agressiva (Socransky, Smith *et al.*, 2002; Ezzo e Cutler, 2003; Saygun, Kubar *et al.*, 2004).

A xerostomia é um dos dois sinais cardiais da síndrome de Sjögren. É definida como a sensação subjetiva de secura bucal e tem como causa mais comum a produção reduzida de saliva (hipossalivação). Entretanto, a correlação não é clara, porque nem sempre xerostomia e hipossalivação ocorrem simultaneamente (Hay, Thomas *et al.*, 1998). Além da síndrome de Sjögren, a boca seca pode ter outras causas tais como: uso de drogas com ação anticolinérgica, irradiação para tratamento de câncer de cabeça e pescoço, doença do enxerto contra o hospedeiro, aplasia das glândulas salivares, sarcoidose, fibrose cística, cirrose biliar primária, infecções por HIV e hepatite C, HTLV-1 assim como desidratação e fatores psicogênicos (Scully, 2003).

A falta de saliva dificulta a deglutição de alimentos secos, a conversação prolongada, provoca sensação de queimor e aumenta o risco de cárie, gengivite e infecção retrógrada das glândulas salivares, afetando desta forma o bem estar do

paciente (Pedersen, Bardow *et al.*, 2005). Relatos na literatura demonstram que na síndrome de Sjögren primária a hipossalivação, juntamente com alterações na composição salivar favorecem a existência de uma microflora oral mais ácida resultando no aumento da incidência de cáries e infecções fúngicas (Almstahl e Wikstrom, 1999). Embora esteja bem estabelecida na literatura a repercussão da destruição do parênquima resultante da inflamação nas glândulas salivares que ocorre na síndrome de Sjögren sobre a saúde oral, pouco se conhece sobre saúde oral e a infecção pelo HTLV-1. Por outro lado, a documentação da existência de síndrome de Sjögren em indivíduos infectados pelo HTLV-1 e a nossa observação preliminar de uma prevalência elevada de doença periodontal nos indivíduos infectados pelo HTLV-1 nos levou a formular a hipótese de que **a freqüência de patologias orais é maior em indivíduos infectados pelo HTLV-1 do que em controles sadios soronegativos**. Assim sendo, o nosso primeiro objetivo é descrever as alterações clínicas bucais, assim como determinar a freqüência das patologias orais associadas ao HTLV-1, decorrentes ou não da alteração das glândulas salivares. Este estudo, pautado na avaliação clínica oral dos indivíduos acima referidos, permitirá determinar a freqüência de alterações orais, provavelmente associadas ao HTLV-1 e, mais especificamente, a importância da relação entre estas alterações e o HTLV-1.

1.3.2 Síndrome Seca e a infecção pelo HTLV-1

Síndrome seca, síndrome sicca ou sicca síndrome é a apresentação clínica de xerostomia (queixa de boca seca) e xeroftalmia (queixa de olhos secos) resultantes do envolvimento das glândulas salivares e lacrimais (Merle, Cabre *et al.*,

1996; Merle, Cabre *et al.*, 1999). A síndrome de Sjögren é definida como uma desordem auto-imune crônica, das glândulas exócrinas associada à infiltração linfocitária das glândulas afetadas. É conhecida como síndrome de Sjögren primária quando está presente apenas a síndrome seca, e síndrome de Sjögren secundária, quando ocorre uma associação entre a síndrome seca com outras doenças auto-imunes (Fox, 1996; Fox, 2005). Estes sintomas de *secura* (*sicca*) resultam de um processo auto-imune sistêmico que pode afetar também outros órgãos, como o sistema nervoso central e periférico, a pele, as mucosas do trato respiratório superior, a vagina, o pulmão e os rins (Fox, 2005).

Relatos isolados na literatura têm mostrado a associação entre uma forma de síndrome de Sjögren e a infecção pelo HTLV-1 (Vernant, Buisson *et al.*, 1988; Eguchi, Matsuoka *et al.*, 1992; Mariette, Agbalika *et al.*, 1993; Mariette, Agbalika *et al.*, 2000). Documentou-se uma frequência de síndrome seca em pacientes portadores de HTLV-1, em 78% dos casos estudados (Hajjar, Sainte-Foie *et al.*, 1995). Em 31 pacientes com mielopatia foi encontrado um percentual de 39% (12) com síndrome de Sjögren (Izumi, Nakamura *et al.*, 1999). Cartier e colaboradores (1995) reportaram que 29.1% de pacientes com HAM/TSP apresentaram inflamação das glândulas salivares e lacrimais a qual denominaram de dacriossaladenite crônica e sugeriram que a dacriossaladenite associada ao HTLV-1 é uma doença de origem viral distinta da síndrome de Sjögren.

Além da associação com o HTLV-1 relatos na literatura associaram o desenvolvimento de uma exocrinopatia semelhante à síndrome de Sjögren em portadores de HIV (Fox, 2005). Em particular, tem sido encontrada uma prevalência importante de síndrome de Sjögren em indivíduos com hepatite C (Fox, Brennan *et*

al., 1998). Também foi reportada uma alta prevalência de síndrome de Sjögren em pacientes HTLV-1 soropositivos sem mielopatia (Terada, Katamine *et al.*, 1994).

Em biópsias de glândulas salivares labiais de japoneses com síndrome de Sjögren foram observadas alterações moderadas nos receptores de células T, sendo que, a alteração mais marcante na utilização de V-gene foi observada nas glândulas salivares de pacientes portadores de HTLV-1 (Sasaki, Nakamura *et al.*, 2000). A proliferação espontânea de linfócitos no sangue periférico é maior nos pacientes HTLV-1 soropositivos com síndrome de Sjögren do que nos indivíduos HTLV-1 soronegativos com síndrome de Sjögren (Sasaki, Nakamura *et al.*, 2000) Também foi demonstrado que a proliferação espontânea de linfócitos no sangue periférico é mais alta em pacientes com mielopatia (Santos, Porto, *et al.*, 2004). Além disso, portadores de HTLV-1, com ou sem mielopatia associada, apresentam um aumento da atividade da IL-2 e de receptores solúveis de IL-2 em sobrenadante de cultura de linfócitos no sangue periférico (Eguchi, Matsuoka *et al.*, 1992). A expansão de células T na infecção pelo HTLV-1, com conseqüente produção de IFN- γ e TNF- α , leva a uma resposta inflamatória, podendo também haver expansão de clones de células T auto-reativas. Essa alternativa poderia se constituir a base para a ocorrência de doenças infecciosas inflamatórias e auto-imunes no curso da infecção pelo vírus HTLV-1. No **Serviço de Imunologia** (SIM) - Hospital Universitário Professor Edgar Santos – HUPES – Universidade Federal da Bahia - UFBA, tem sido observado que a produção de IFN- γ e TNF- α nos pacientes com HAM/TSP é maior que nos indivíduos com infecção assintomática, sugerindo que outras doenças com base inflamatória e doenças auto-imunes sejam mais freqüentes nos pacientes com HAM/TSP do que nos indivíduos portadores de HTLV-1 (Carvalho, Bacellar *et al.*, 2001).

A maioria dos trabalhos que relatam essa associação entre o HTLV-1 e síndrome de Sjögren baseia-se em dados histológicos isolados com pouca atenção dada ao exame clínico da boca (Hajjar, Sainte-Foie *et al.*, 1995; Nakamura, Eguchi *et al.*, 1997; Nakamura, Kawakami *et al.*, 2000). Poucos trabalhos também utilizaram dados objetivos para avaliar a diminuição da produção de saliva. Finalmente não é claro se a síndrome de Sjögren é, predominantemente, associada a HAM/TSP ou se a frequência da doença é igualmente distribuída em portadores de HTLV-1 e em pacientes com HAM/TSP. **A segunda hipótese deste estudo é de que a hipossalivação é maior em indivíduos infectados pelo HTLV-1 do que em controles soronegativos e que a produção exacerbada de citocinas Th1, representada por altos níveis de IFN- γ , esteja inversamente correlacionada com a produção de saliva.** Para comprovar tal hipótese, a função das glândulas salivares foi analisada por meio da sialometria, empregando-se o teste de Saxon (g/2min) em pacientes com HAM/TSP, portadores de HTLV-1 e em controles sadios não infectados. Adicionalmente, a resposta imune sistêmica foi caracterizada em indivíduos portadores de HTLV-1 e comparada com parâmetros quantitativos da função glandular através da mensuração do fluxo salivar.

1.4. Imunopatogênese da infecção pelo HTLV-1

Os principais determinantes para o surgimento de doenças associadas ao HTLV-1 são a carga proviral (Nagai, Usuku *et al.*, 1998) e a resposta imune exacerbada (Carvalho, Bacellar *et al.*, 2001). O aumento da carga proviral, bem como altos níveis de anticorpos no soro, está associada ao início dos sinais e sintomas de HAM/TSP (Manns, Miley *et al.*, 1999a; Manns, Miley *et al.*, 1999b). A

replicação do vírus e a expansão clonal podem ser influenciadas pela resposta imune e pelo perfil genético do hospedeiro (Nakamura, Kawakami *et al.*, 2000). A carga proviral é maior no sangue periférico de pacientes com HAM-SP, uveíte, artrite reumatóide, doença mista do tecido conjuntivo associadas ao HTLV-1 comparada com portadores do HTLV-1. Adicionalmente, a carga proviral foi maior no fluido sinovial de pacientes com artrite reumatóide associada ao HTLV-1 (Yakova, Lezin *et al.*, 2005), como também no parênquima de glândulas salivares labiais de pacientes com síndrome de Sjögren associada ao HTLV-1, do que no sangue periférico (Ohyama, Nakamura *et al.*, 1998; Sasaki, Nakamura *et al.*, 2000).

Com relação à resposta imune, de acordo com Hollsberg e David (1993) existem duas hipóteses principais que explicariam os mecanismos que levam ao surgimento de doença. Na primeira hipótese, o HTLV-1 infectaria as células gliais no sistema nervoso central, desencadeando uma resposta imune citotóxica contra as células infectadas com conseqüente desmielinização. E na segunda hipótese, a infecção pelo HTLV-1 promoveria a ativação de células T auto-reativas com conseqüente indução de uma resposta auto-imune. A evidência de células T citotóxicas CD8+ reativas a proteínas do HTLV-1 num contexto restrito de MHC classe I (HLA-A2) apenas em pacientes com HAM/TSP e ausentes em carreadores do HTLV-1 ou pacientes com ATLL corrobora a primeira hipótese. Adicionalmente, ocorre uma importante proporção de células T citotóxicas CD8+ no líquor de pacientes com HAM-TSP. As lesões no SNC poderiam resultar de uma ação direta provocada por células T citotóxicas CD8+ ativadas pela ação da infecção pelo HTLV-1 ou através de células T CD4+ auto-reativas à bainha de mielina. Células T infectadas são capazes de ativar células T não infectadas através de interação celular. Estas células T podem, subseqüentemente, migrar para o SNC e causar

desmielinização, através do reconhecimento de antígenos da bainha de mielina num contexto de MHC classe II ou I ou através do reconhecimento de antígenos virais provenientes de células gliais infectadas num contexto de MHC classe I. A secreção de citocinas funcionaria como potencializador destas reações nos dois modelos. Alternativamente, no modelo auto-imune, que representa a segunda hipótese, ocorreria a ativação de células T auto-reativas, conseqüentes à infecção pelo HTLV-1 destas células, ou ainda de outras células T imunorregulatórias, de forma inespecífica, resultando na destruição da bainha de mielina mediada por células T.

Linfócitos presentes nas lesões dos nervos da medula espinhal de pacientes com HAM/TSP usam um único motivo CDR3 (Hara, Morita *et al.*, 1994), já demonstrado nas lesões cerebrais na esclerose múltipla e na encefalite auto-imune experimental (Levin e Jacobson, 1997a). Adicionalmente, anticorpos IgG foram localizados em neurônios de pacientes com HAM/TSP (Levin e Jacobson, 1997b). Esses dados indicam que pacientes com HAM/TSP têm anticorpos dirigidos a antígenos neurônio-específicos que mimetizam molecularmente a proteína Tax. Este mecanismo auto-imune, conhecido como mímica molecular, pode estar envolvido no dano tecidual que ocorre no SNC de pacientes com HAM/TSP (Levin e Jacobson, 1997b).

Em relação ao perfil genético, trabalhos que analisaram a relação do HLA com doença associada ao HTLV-1 revelaram que a freqüência dos alelos de Classe II DR1 e DR4 era maior em pacientes com HAM/TSP, e que a freqüência do alelo de Classe I, HLA-A26 era maior em pacientes com ATLL (Usuku, Sonoda *et al.*, 1988). Outros trabalhos demonstraram que a região C-terminal da proteína do envelope gp21 era reconhecida preferencialmente por alelos HLA-DRB1*0101, sugerindo que esta região seria o epitopo CD4+ reconhecida pelos alelos HLA-DRB1 de pacientes

com HAM/TSP (Yamano, Kitze *et al.*, 1997). Analisando-se a relação de risco entre alelos de Classe I que exercem um papel importante na resposta imune CTL específica e carga proviral, detectou-se que a carga proviral de portadores do HTLV-1 que possuíam alelos HLA-A*02+ correspondia a um terço daquela vista em portadores do HTLV-1 com alelos HLA-A*02-, sugerindo-se que alguns alelos HLA podem controlar a carga proviral e que o HLA-A*02 reduziria o risco de se desenvolver HAM/TSP. Sugeriu-se também que o alelo HLA-DRB1*0101 estava associado com susceptibilidade à HAM/TSP na ausência do alelo HLA-A*02 (Jeffery, Usuku *et al.*, 1999).

É bem conhecido que a expressão de citocinas Th1, IFN- γ , TNF- α e IL-6, no sangue periférico e no liquor é bem maior nos indivíduos com HAM/TSP do que em portadores de HTLV-1 e indivíduos HTLV-1 soronegativos. O mesmo ocorre com a expressão de RNAm de IL-1 β , IL-2, TNF- α e IFN- γ em linfócitos do sangue periférico (Tendler, Greenberg *et al.*, 1991), do mesmo modo que o aumento de IL-2, IFN- γ e IL-4 em CMSP isoladas de pacientes com HAM/TSP comparados com carreadores assintomáticos e com doadores de sangue sadios. Entretanto, portadores de HTLV-1 apresentaram secreção espontânea de altos níveis de citocinas Th1 e Th2 em sobrenadante de cultura de linfócitos comparados com doadores de sangue soronegativos e demonstrou-se também que grandes concentrações de IL-10 modularam a expressão de IFN- γ nestes indivíduos (Carvalho, Bacellar *et al.*, 2001). Haja vista a capacidade do HTLV-1 de induzir, no sistema imune, esta resposta linfocitária inflamatória exuberante, tem-se aventado a possibilidade de que doenças inflamatórias e doenças auto-imunes sejam mais freqüentes nestes indivíduos.

1.5 Doença periodontal e a infecção pelo HTLV-1

Atualmente, considera-se improvável que uma única classe de agentes infecciosos seja exclusivamente o causador ou o modulador de um grupo de doenças tão heterogêneo coletivamente, denominado de periodontite (Saygun, Sahin *et al.*, 2002; Saygun, Kubar *et al.*, 2004). É por essa razão que o estudo da interação entre vírus e bactérias patogênicas tem despertado tanto interesse nos últimos anos.

Estudos recentes sugerem que a presença do vírus do Herpes simples no periodonto é uma fonte antigênica importante capaz de provocar destruição do tecido periodontal (Slots e Contreras, 2000; Kamma, Contreras *et al.*, 2001; Saygun, Kubar *et al.*, 2004). A infecção herpética pode iniciar ou acelerar a destruição periodontal devido à liberação de citocinas e quimiocinas por células inflamatórias e células do hospedeiro, ou através da diminuição da defesa periodontal, tendo como consequência o aumento da virulência bacteriana da flora residente (Slots e Contreras, 2000; Slots, Kamma *et al.*, 2003). O Citomegalovírus humano (HCMV) e o Epstein-Barr vírus (EBV) são os vírus encontrados com maior frequência em sítios com periodontite agressiva (Saygun, Kubar *et al.*, 2004), embora tenham sido encontrados também em sítios com periodontite crônica (Contreras, Umeda *et al.*, 1999).

Uma vez que a maioria das bactérias patogênicas reside na bolsa periodontal, o sistema imune torna-se incapaz de eliminar eficazmente estes microrganismos, o que leva à ocorrência de uma inflamação crônica e à resposta imune contínua, resultando na destruição tecidual (Okada e Murakami, 1998). O tipo da resposta imune que ocorre na lesão periodontal é decisivo na determinação do advento de uma resposta imune protetora ou não (Gemmell, Carter *et al.*, 2002).

A propósito da microbiota periodontal, esta co-existe em um biofilme colonizado por inúmeras espécies bacterianas. Entretanto, apenas um número limitado é associado com doença. Dentre elas, algumas espécies destacam-se por seu alto potencial patogênico: *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Tannerella forsythia* (*Consensus report. Periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors*, 1996). Além destas, existem outras espécies bacterianas associadas com doença, quais sejam: *Bacteroides forsythus*, *Treponema denticola* (Lotufo, Flynn *et al.*, 1994; Offenbacher, 1996) e *Dialister pneumosintes* (Socransky, Haffajee *et al.*, 1998; Contreras, Doan *et al.*, 2000; Slots, Sugar *et al.*, 2002). *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia* foram consideradas como as três espécies bacterianas associadas com formas avançadas de periodontite crônica (Socransky, Smith *et al.*, 2002).

Reconhece-se que a presença de bactérias patogênicas *per se* é insuficiente para causar doença (Seymour e Taylor, 2004). Fatores do hospedeiro são, claramente, de fundamental importância (Seymour, 1991). Nesse contexto, a forma pela qual o hospedeiro responde ao desafio bacteriano é determinada pela natureza das respostas imunes: inata e adaptativa (Seymour e Taylor, 2004). Citocinas exercem um papel central na resposta imune e embora produzidas principalmente para ativar os mecanismos efetores contra agentes estranhos, também se associam com destruição tecidual (Gemmell e Seymour, 2004). Os fatores que regulam a produção de citocinas ainda não são de todo conhecidos, entretanto sabe-se que deficiências ou variações genéticas na resposta imune podem aumentar a probabilidade de ocorrer periodontite (Kinane e Hart, 2003). Polimorfismos genéticos que codificam a IL-1, IL-1 α e IL-1 β , foram associados com aumento da gravidade de periodontite (Kornman, Crane *et al.*, 1997; Kornman e Di Giovine, 1998; Cullinan,

Westerman *et al.*, 2001), sugerindo uma interligação entre bactérias, o hospedeiro e o meio ambiente. Foi encontrada uma associação entre o polimorfismo no gene IL1B e o aparecimento de periodontite crônica em uma amostra da população brasileira (Moreira, De Sa *et al.*, 2005).

O desenvolvimento e regulação da resposta imune são importantes para o funcionamento adequado das nossas defesas e para impedir que a resposta inflamatória seja causa de patologias. A resposta imune é regulada por vários mecanismos, incluindo células regulatórias, citocinas moduladoras, anticorpos anti-idiotipos, e pelo balanço entre citocinas Th1 e Th2. O efeito produzido por citocinas Th1, IL-2 e IFN- γ é ativar a resposta imune mediada por células, enquanto citocinas Th2, IL-4 suprimem a resposta imune mediada por células e ativam a resistência associada com a imunidade humoral (Modlin e Nutman, 1993). Em relação à doença periodontal a hipótese formulada é a de que linfócitos T são predominantes nas lesões estáveis, enquanto a proporção de linfócitos B e plasmócitos está aumentada nas lesões progressivas (Gemmell e Seymour, 2004), estabelecendo-se um padrão Th1 para as lesões estáveis ao passo que predominaria um padrão Th2 para as lesões progressivas. A hipótese vigente, entretanto, é a de que as lesões periodontais seguem um padrão misto de resposta imune inflamatória, com envolvimento de ambas as respostas, Th1 e Th2 (Taubman e Kawai, 2001; Ukai, Mori *et al.*, 2001; Teng, 2002; Garlet, Martins *et al.*, 2003), não apresentando, portanto, fisiopatologias mutuamente exclusivas. A polarização, ou a hiperprodução de determinadas citocinas derivadas das respostas Th1 ou Th2 poderia ser responsável pela destruição do tecido periodontal através das respostas imunes exacerbadas tanto humoral como celular (Okada e Murakami, 1998).

Além de citocinas, a expressão de mediadores da inflamação agindo isoladamente ou em conjunto estimulam a reabsorção óssea e a destruição do colágeno através da ação de metaloproteinases (MMPs), a principal via de reabsorção óssea e destruição do tecido conjuntivo associado com doença periodontal ativa (Zambon, 1996; Soell, Elkaim *et al.*, 2002; Garlet, Martins *et al.*, 2004). As MMPs são uma família de enzimas geneticamente distintas que degradam a matriz extra celular (MEC) e os componentes da membrana basal (MB). Atuam em processos fisiológicos, como desenvolvimento tecidual, remodelação e cicatrização de feridas (Uitto, Overall *et al.*, 2003), regulação da comunicação celular e funções moleculares e imunológicas (Sorsa, Tjaderhane *et al.*, 2004). A atividade das MMPs é controlada por inibidores endógenos, chamados de inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs). O desequilíbrio da balança MMP/TIMP tem como consequência o aparecimento de doenças como artrite, crescimento de tumores e metástases e danos neurológicos induzidos por vírus vistos na HAM/TSP e outros (Khuth, Akaoka *et al.*, 2001).

Estudos prévios demonstraram que os níveis de MMP-9 e TIMP-3 estão elevados no liquor cerebrospinal e no parênquima de pacientes com HAM/TSP comparados com carreadores de HTLV-1. Adicionalmente, a elevação dos níveis de MMPs e TIMPs ocorreram concomitantemente com a expressão de citocinas pro-inflamatórias, dando suporte à existência de uma ligação entre estas moléculas e o aparecimento de doença após infecção viral (Giraudon, Buart *et al.*, 1997; Giraudon, Szymocha *et al.*, 2000).

Uma das consequências da doença periodontal é a perda óssea. O receptor ativador de NF- κ B ligante-RANKL e seu receptor-RANK foram reconhecidos recentemente, como fatores reguladores da formação de osteoclastos (Lacey, Timms

et al., 1998; Crotti, Smith *et al.*, 2003). RANKL é expresso por osteoblastos e células do estroma, fibroblastos e células T ativadas. Citocinas pro-inflamatórias presentes no fluido crevicular de pacientes com periodontite estimulam a produção de RANKL (Crotti, Smith *et al.*, 2003).

Osteoprotegerina (OPG), um fator solúvel de necrose tumoral (TNF), é o inibidor da diferenciação dos osteoclastos. É produzido por células do ligamento periodontal e, assim como RANKL é modulado por citocinas pro-inflamatórias presentes na periodontite (Crotti, Smith *et al.*, 2003). Estudos recentes demonstraram que a interação entre OPG, RANKL, e RANK forma uma tríade regulatória intrincada na osteoporose e doenças osteolíticas como artrite, doença periodontal e metástase de tumores ósseos (Teng, Nguyen *et al.*, 2000). O equilíbrio entre RANKL/OPG tem papel crítico na regulação do desenvolvimento osteoclastogênico e ou osteoblastogênico (Theill, Boyle *et al.*, 2002).

Tendo em vista que a progressão de gengivite para periodontite deve-se a uma combinação de fatores, como a presença de bactérias patogênicas, altos níveis de citocinas inflamatórias, MMPs e Prostaglandina E₂ (PGE₂) e baixos níveis de citocinas inibidoras da inflamação (antiinflamatórias), como IL-10, TGF- β e TIMPs (Page, Offenbacher *et al.*, 1997), e que estes fatores da resposta imune estão exageradamente aumentados e/ou desregulados na infecção pelo HTLV-1, a nossa terceira hipótese é de que **a resposta imune na doença periodontal nos indivíduos infectados pelo HTLV-1 seja mais exacerbada do que em controles soronegativos.**

Para comprovar esta hipótese, a resposta imune inflamatória em indivíduos HTLV-1 soropositivos e HTLV-1 soronegativos com periodontite crônica e em tecido periodontal sadio foi avaliada através da expressão de RNAm que codificam IFN- γ ,

TNF- α , IL-10, assim como o balanço entre MMPs/TIMPs e RANKL/OPG através do teste de reação de polimerase em cadeia quantitativo (Real-Time PCR).

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Estudar a frequência de alterações bucais em indivíduos infectados pelo HTLV-1, correlacionando-as com a produção exacerbada de citocinas.

2.2. Específicos

- 2.2.1. Descrever as alterações clínicas bucais observadas em indivíduos infectados pelo HTLV-1;
- 2.2.2. Avaliar a função das glândulas salivares em portadores de HTLV-1, em pacientes com HAM-TSP e avaliar a existência de associação entre fluxo salivar e níveis de citocinas;
- 2.2.3. Caracterizar a resposta imune sistêmica *in situ* em pacientes com doença periodontal associada ao HTLV-1;
- 2.2.4. Caracterizar o padrão de expressão de proteinases (MMPs) e inibidores de proteinases (TIMPs), RANK-L e OPG *in situ* em amostras de tecido periodontal provenientes de indivíduos HTLV-1 soropositivos com periodontite;
- 2.2.5. Comparar a resposta imune de indivíduos HTLV-1 soropositivos com periodontite crônica com indivíduos HTLV-1 soronegativos com diversas formas de periodontite e sem periodontite.

3. RESULTADOS

3.1. *Manuscrito 1: Oral Health in HTLV-1 infected individuals.*

Artigo submetido ao periódico **Oral Diseases**

OBJETIVOS: O objetivo do presente estudo foi descrever o estado da saúde oral numa amostra de 100 indivíduos infectados pelo HTLV-1 comparados com 100 doadores de sangue HTLV-1 soronegativos pareados por sexo e idade.

RESULTADOS: a alteração mais freqüente foi secura da mucosa oral, presente em 22% dos indivíduos HTLV-1 soropositivos e em 4% dos indivíduos HTLV-1 soronegativos (OR 5,25 CI 1,80–15,29; $p = 0,002$), seguida por periodontite crônica, 20% e 7,5%, respectivamente (OR 3,16; CI 1,26–7,92; $p = 0,01$) e por mobilidade dental significativa, 14% e 3%, respectivamente (OR 4,83; CI 1,33–17,52; $p = 0,01$). A freqüência de edentação total, má higiene oral, cárie, história de herpes labial foi semelhante nos dois grupos. Xerofthalmia foi mais expressiva no grupo infectado, 15% e 3%, respectivamente (OR 2,8; CI 1,01–7,77; $p = 0,04$) do que xerostomia, que não mostrou diferença entre os grupos. A análise multivariada através de regressão logística condicional mostrou que gengivite, periodontite, periodontite com mobilidade dental, estomatite por dentadura e boca seca mantiveram a significância estatística após terem sido ajustadas para má higiene oral. Estes resultados sugerem que o estado da saúde oral nos indivíduos infectados pelo HTLV-1 é pior comparada com doadores de sangue HTLV-1 soronegativos.

Oral Health in Patients with HTLV-I Infection

SP Giozza^{1,2}, MA Porto¹, M Martinelli¹, J Guerreiro¹, M Caskey¹, DJ Morgan¹, MT Bendicho³, Carvalho EM¹

¹*Serviço de Imunologia, Hospital Universitário Professor Edgar Santos (HUPES), Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil;*

²*Departamento de Odontologia, Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campina Grande, Paraíba, Brazil;*

³*Imunogenética, Instituto de Ciências da Saúde (ICS), Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil*

Key words: HTLV-1, HAM/TSP, gingivitis, periodontitis, candidiasis, sicca syndrome, Sjögren's syndrome, xerostomia, xerophthalmia.

Corresponding author: **Silvana Pereira Giozza**

Address: Hospital Universitário Professor Edgar Santos (HUPES), Serviço de Imunologia, 5º andar. Universidade Federal da Bahia, UFBA. Rua João das Botas, S/N – Canela. CEP: 40 110 - 160 Salvador – Bahia- Brazil.

Fax number: 00 55 71 3245 7110

E.mail: silvanagiozza@terra.com.br; imuno@ufba.br

Abstract

OBJECTIVES: The aim of the present study was to describe the oral health status in a group of HTLV-1 infected individuals in comparison to an age and sex matched group of blood donor controls.

SUBJECTS AND METHODS: The oral health status in patients and controls was determined by the clinical examination of a sample of 100 HTLV-1 infected individuals with age range 18 - 65 years and of 100 HTLV-1 seronegative healthy volunteers blood donors aged from 18 to 65. Adjusted odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CIs) were derived from conditional logistic regression controlling for demographic and relevant confounders.

RESULTS:

HTLV-1 was significantly associated with dry mouth (OR 5.25; 95 % CI, 1.8 – 15.29; $p = 0.002$), denture stomatitis (OR 3.2; 95 % CI, 1.17 – 8.73; $p = 0.02$), gingivitis (OR 2.07; 95 % CI, 1.07 – 4.02; $p = 0.03$), chronic periodontitis (OR 3.16; 95 % CI, 1.26 – 7.92; $p = 0.01$) and significant dental mobility (OR 4.33; 95 % CI, 1.23 – 15.2; $p = 0.01$), although no significant associations were found with dental caries (OR 1.1; 95 % CI, 0.6–2.05; $p = 0.75$). Even though the history of xerophthalmia was also significantly associated with HTLV-1 infection (OR 2.80; 95 % CI 1.00 – 7.77; $p = 0.04$), history of xerostomia, herpes labialis and recurrent aphthae were not significantly found.

CONCLUSIONS: Our results indicate that abnormal oral health in HTLV-1 infection is relatively **common** compared with HTLV-1 seronegative healthy blood donors. Dry mouth is the **main** outcome in HTLV-1 infected individuals. This new finding of increased prevalence of periodontal disease suggests immunologic impairment and deserves further investigation.

Introduction

The Human T-cell Lymphotropic type 1 virus (HTLV-1) is an exogenous human retrovirus that infects 10-20 million people worldwide and is associated with adult T-cell leukemia and lymphoma (ATLL) and chronic progressive disease of the central nervous system termed HTLV-1 associated myelopathy (HAM)/ tropical spastic paraparesis (TSP) (Osame, 2002). There are large endemic areas in Caribbean, South America, Africa and Japan (Osame, 2002). Salvador, state of Bahia, presents the highest seroprevalence of HTLV-1 in Brazil, estimated in 1.7% of blood donors (Dourado et al., 2003). HTLV-1 has been shown to be associated not only with **HAM/TSP** and ATLL but also with T-lymphocytic alveolitis, polymyositis, arthritis, uveitis and sicca syndrome. The manifestations of these different clinical outcomes may reflect an individual immune response to HTLV-1 infection (Merle et al., 2002). HTLV-1 infects predominantly T cells, mediating T cell proliferation and activation. High levels of cytokines are produced even in unstimulated cultures (Santos et al., 2004). This exacerbated Th1 type immune response, with production of pro-inflammatory cytokines and, or expansion of auto-reactive T-cells, is associated with tissue damage in HTLV-1 infection (Carvalho et al., 2001).

The association between HTLV-1 infection and salivary gland disease was first reported by Vernant *et al.*, (1988). Additionally, a high rate of HTLV-1 seroprevalence has been observed among **Sjogren's** syndrome patients in Japan (Nakamura et al., 2000). Beyond sicca symptoms, there are no studies evaluating oral disease in HTLV-1 infected individuals. Additionally, other oral diseases that may be associated with the immunologic disturbances that occur with HTLV-1 infections have not been recognized. The aim of the present study was to describe the oral health status in a group of HTLV-1 infected individuals that included **HAM/TSP** patients and HTLV-1 carriers in comparison to an age and sex matched group of blood donor controls.

Patients and methods

Study population

HTLV-1 seropositive subjects aged 18 to 65 years old were recruited from the multidisciplinary HTLV-1 clinic at the Hospital Universitário Professor Edgar Santos – Universidade Federal da Bahia (Salvador–Brazil), from April 2001 to June 2004. Our inclusion criterion was a positive HTLV-1 ELISA test, confirmed by Western-Blot. The exclusion criteria were: diagnosis of diabetes mellitus (DM), evidence of HIV and/or HCV infection or unknown serology for HIV and HCV co-infection, habitual alcohol or drug use, history of smoking more than one pack of cigarettes per week, use of anticholinergic drugs. HTLV-1 seronegative individuals were selected from the same blood bank from where the HTLV-1 seropositive patients were initially referred. From the original population composed by 313 HTLV-1 seropositive individuals, 167 were excluded: 14 had no western-blot confirmation of HTLV-1 infection; 56 had unknown serology for HIV and HCV co-infection; 19 had HCV co-infection, 10 had DM; 55 were in use of xerogenic drugs, and 10 had more than 65 years old. On the other hand, 46 of the eligible seropositive individuals were not enrolled in the study because we weren't able to identify matching controls. The eligible non-enrolled seropositive individuals had Mean age \pm SEM (48.4 ± 1.6) and enrolled seropositive individuals (39.01 ± 1.1), $p = 0.0001$. Oral clinical findings were similar between the two groups. A total of 100 HTLV-1 infected individuals (48 women and 52 men) with age range from 18 - 65 years were enrolled in the study. A group composed of 100 HTLV-1

seronegative healthy volunteer blood donors (48 women and 52 men) with age range from 18 to 65 years was recruited for comparison. Informed consent from HTLV-1 infected patients and seronegative subjects were obtained. The study was approved by the Ethics committee of the Hospital Universitário Professor Edgar Santos.

Clinical evaluation

One examiner (S.P.G) conducted interviews and oral clinical examinations in patients and controls. Presence or absence of visible carious lesions with regard to chronic or acute lesions were noted, gingival and periodontal inspection and palpation to detect gingival bleeding, periodontal suppuration and significant dental mobility were performed. The use of removable dentures was recorded by intra-oral inspection. All soft tissues were examined including the palate, tongue, floor of the mouth and oral mucosa. The major salivary glands were inspected and palpated for signs of enlargement and tenderness. The questionnaire was designed to produce yes or no answers to a series of questions about symptoms of dry mouth (xerostomia), dry eyes (xerophthalmia), drugs known to induce xerostomia, periodical appearance of herpes labialis and recurrent aphthae lesions, recent tooth extraction and other medical information.

The clinical signs of dry mouth were considered based on characteristics previously described: the mucosa may have a desiccated or glossy appearance and sticks to mirror test; the tongue may be fissured and red with partial or complete papillary atrophy; saliva pooling in the floor of the mouth will not be seen and absence or little saliva after expression of the duct orifices. Oral candidiasis of the pseudomembranous or erythematous type is frequent, and angular cheilitis may be seen. Dental caries, particularly involving the tooth at the gingival margin or cuspid tips is characteristic (Fox, 1996; Szpirglas et al., 1994).

The diagnosis of denture stomatitis, characterized by inflamed mucosa, particularly under the upper denture of either partial or complete dentures wearers was based on the clinical appearance of erythematous areas under the fitting surface of a removable denture. Lichen planus and squamous cell papilloma were diagnosed based on histological examination after biopsy.

Plaque-induced gingivitis, defined as inflammation of the gingiva in the absence of clinical attachment, was characterized by the presence of any of the following clinical signs: redness and edema of the gingival tissue, bleeding upon palpation, changes in contour and consistency, presence of calculus and/or plaque. Chronic periodontitis defined as inflammation of the gingiva extending into the adjacent attachment apparatus was characterized by loss of clinical attachment due to destruction of the periodontal ligament and loss of the adjacent supporting bone. Criteria of diagnosis included clinical combinations of the following signs and symptoms: edema, erythema, gingival bleeding upon palpation and/or suppuration, adapted from criteria established by American Association of Periodontology (AAP, 1996). A full medical examination was also performed. The diagnosis of HAM/TSP was based on World Health Organization (WHO) criteria (World Health Organization, 1980). Clinical features of HAM/TSP include muscle weakness in the legs, hyperreflexia, clonus, extensor plantar responses, sensory disturbances, urinary incontinence, impotence, and low back pain. Laboratory diagnosis includes presence of the virus and its antibodies in cerebrospinal fluid, brain and spinal cord tissues (Manns et al., 1999).

Statistical methods

Comparisons between means were tested using the Student t-Test and proportions using Pearson Chi-square test. Odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CIs) were calculated by conditional logistic regression, with HTLV-1 status (HTLV-1 seropositive and seronegative) as the dependent variable. Conditional logistic regression was first used in a univariate manner, looking for association between a risk factor (HTLV-1) and oral diseases. The variables that were significantly associated with HTLV-1 infection at a 0.05 level were then adjusted for poor oral hygiene to avoid the possible confounding effect of poor oral hygiene in oral diseases. Denture stomatitis was adjusted to both poor oral hygiene and dentures wearing. Statistical routines from SPSS 9.0 and Stata 7.1 were used.

Results

Of the 100 HTLV-1 infected individuals enrolled in the study, eight (8%) had HAM/TSP; the other 92 individuals were HTLV-1 carriers. The demographic characteristics, interview findings, oral hygiene practices, dentures wearing, mucosal and dental lesions or conditions in HTLV-1 infected individuals and HTLV-1 seronegative subjects are shown in Tables 1, 2 and 3. The univariate logistic analysis identified HTLV-1 seropositive versus HTLV-1 seronegative status as a significant risk factor for xerophthalmia (OR 2.80; 95% CI 1.00 – 7.77; $p = 0.04$), denture stomatitis (OR 3.2; 95% CI, 1.17 – 8.73; $p = 0.02$), dryness of oral mucosa (OR 5.25; 95% CI, 1.8 – 15.29; $p = 0.002$), gingivitis (OR 2.07; 95% CI, 1.07 – 4.02; $p = 0.03$), chronic periodontitis (OR 3.16; 95% CI, 1.26 – 7.92; $p = 0.01$) and significant dental mobility (OR 4.33; 95% CI, 1.23 – 15.2; $p = 0.01$). No significant associations were found between HTLV-1 status and poor oral hygiene (OR 0.70; 95% CI 0.30 – 1.61; $p = 0.40$), dentures wearing (OR 0.65; 95% CI 0.34 – 1.24; $p = 0.19$), dentures related conditions (OR 0.51; 95% CI, 0.18 – 1.45; $p = 0.21$), xerostomia (OR 1.55; 95% CI, 0.67 – 3.56; $p = 0.30$), herpes labialis (OR 1.72; 95% CI 0.29 – 1.8; $p = 0.49$), recurrent aphthae (OR 0.35; 95% CI 0.13 – 0.89; $p = 0.02$) and caries (OR 1.1; 95% CI, 0.6 – 2.05; $p = 0.75$). After adjustment for poor oral hygiene, HTLV-1 status (seropositivity) was a significant risk factor for gingivitis, chronic periodontitis and significant dental mobility. Dentures stomatitis was adjusted for dentures wearing and remained significant. Oral inspection showed moderate changes of the lingual mucous membrane in the form of slight reddening, fissuring and mild papillary atrophy, which was more frequently observed in HTLV-1, infected patients than in controls. Three patients had chronic erythematous candidiasis on the dorsum of the tongue, caused by *Candida albicans* confirmed by smears and subsequent fungal culture. One patient had an erosive lichen planus of buccal mucosa confirmed by histological examination. One patient and one healthy control had a squamous papilloma lesion of the tongue and palate, respectively. Except for xerostomia, no differences were observed between HAM/TSP patients and HTLV-1 seropositive carriers regarding oral disorders.

Table 1 Demographic data and univariate odds ratios (ORs) for, *sicca* symptoms, history of aphthae and herpes labialis based on interview in 100 HTLV-1 infected patients and 100 HTLV-1 seronegative blood donors

Variables	HTLV-1 +	HTLV-1 -	<i>p value</i>	OR	95% CI
Age (\pm SD)	39 \pm 11 years	39 \pm 11 years	0.63 ¹	-	-
Male: Female ratio	48/52	48/52	1.00 ²	-	-
Xerostomia	17/87 (18%)	12/88 (12%)	0.30	1.55	0.67 – 3.56 ³
Xerophthalmia	15/85 (15%)	6/97 (06%)	0.04	2.80	1.00 – 7.77
Recurrent aphthae	08/92 (08%)	19/81 (19%)	0.02	0.35	0.13 – 0.89 ³
Herpes labialis	08/92 (08%)	11/89 (11%)	0.49	0.72	0.29 – 1.80 ³

Student t test¹

Pearson Chi Square test²

Univariate logistic regression³ *p*-value < 0.05

Table 2 Univariate odds ratios (ORs) for poor oral hygiene, dentures wearing and oral mucosal conditions in 100 HTLV-1 infected patients and 100 HTLV-1 seronegative blood donors

Characteristic	HTLV-1 +	HTLV-1 -	<i>p value</i>	OR	95 % CI
Poor oral hygiene	15/85 (15%)	11/99 (11%)	0.40	0.70	0.30 – 1.61 ³
Dentures wearing	38/62 (38%)	26/74 (26%)	0.19	0.65	0.34 – 1.24 ³
Dentures	17/83 (17%)	5/95 (5%)	0.02	3.2	1.17 – 8.73
Stomatitis					
Dentures related conditions	11/89 (11%)	6/94 (6%)	0.21	0.51	0.18 – 1.45
Dry mouth	22/78 (22%)	4/96 (04%)	0.002	5.25	1.80– 15.29

Univariate logistic regression³ *p*-value < 0.05

Table 3 Univariate odds ratios (ORs) for periodontal and dental conditions in 100 HTLV-1 infected patients and 100 HTLV-1 seronegative blood donors

Characteristic	HTLV-1 +	HTLV-1 -	<i>p</i> value	OR	CI
Caries	33/100 (33%)	31/100 (31%)	0.76	1.09	0.60– 1.98
Gingivitis	46/100 (46%)	32/61 (34%)	0.04	2.07	1.07 – 4.02
C. Periodontitis	20/75 (20%)	7/86 (7.5%)	0.01	3.32	1.33 – 8.26
S. dental mobility	13/82 (14%)	3/90 (3%)	0.01	4.83	1.33 – 17.52

Univariate conditional logistic regression³ *p*-value < 0.05
 Chronic Periodontitis
 Significant dental mobility

Table 4 Unadjusted and adjusted odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs) for association between HTLV-1 infection and oral conditions outcomes

HTLV- 1 seropositive subjects					
Outcome	Unadjusted (OR)	CI	Adjusted (OR)	CI	
D. Stomatitis	3.6	1.27-10.30	3.29	1.16 - 9.34*	
Dry mouth	5.25	1.80-15.2	5.21	1.78 - 15.22**	
Gingivitis	2.07	1.07 – 4.02	2.05	1.02 – 4.11**	
C. Periodontitis	3.32	1.33 – 8.26	3.18	1.21 – 8.32**	
S. dental mobility	4.83	1.33 – 17.52	4.22	1.17 – 15.21**	

Multivariate conditional logistic regression *p*-value < 0.05
 * OR adjusted for dentures wearing and poor oral hygiene
 ** OR adjusted for poor oral hygiene
 Chronic Periodontitis
 Significant dental mobility

Discussion

HTLV-1 infection is an important public health problem but, because the most important diseases associated with HTLV-1, HAM/TSP and ATLL are documented in only a small percentage of infected individuals, morbidity related to HTLV-1 has been considered to be low. In this study, the first to analyze oral health status in HTLV-1 infected individuals, we demonstrated an impairment of oral health in HTLV-1 infected individuals including those without HAM/TSP or ATLL. This impaired oral health was mainly represented by dry mouth, denture stomatitis, plaque induced gingivitis, chronic periodontitis and significant dental mobility.

Sjögren's syndrome is a chronic autoimmune disorder of the exocrine glands with associated lymphocytic infiltrates of the affected glands. Dryness of the mouth and eyes results from involvement of the salivary and lacrimal glands (Fox, 2005). Many studies suggested that HTLV-1 is involved in the pathogenesis of the disease in a subset of patients with Sjögren's syndrome in endemic areas, such as Japan (Eguchi et al., 1992; Terada et al., 1994; Nakamura et al., 1997) and the Caribbean (Vernant et al., 1988). Also, sicca syndrome has been described as a strong finding in HTLV-1 infection (Cartier et al., 1995a; Hajjar et al., 1995; Merle et al., 1999a; Cartier et al., 2005b). Hajjar *et al.*, (1995) found sicca syndrome in a large proportion of HTLV-1 infected individuals, half of whom presented HAM/TSP. However, in some cases, sicca syndrome has been reported to be the unique clinical manifestation of HTLV-1 infection. Thus it might represent an early event in disease progression to HAM/TSP (Beby-Defaut et al., 1999). In the present study xerophthalmia was an important symptom associated with HTLV-1 infection, although no difference was found between the two groups in regard to xerostomia. Similar to these results found in HTLV-1 infected individuals, it has been reported that ocular symptoms are more prevalent than oral symptoms in secondary Sjögren's syndrome associated with rheumatoid arthritis (Uhlir et al., 1999). Overall, there is good agreement on the ocular manifestation (Keratoconjunctivitis sicca), but the oral component (xerostomia) of the syndrome has led to much confusion (Daniels et al., 1992; Fox, 2005). All complaints of dry mouth are not indicative of salivary dysfunction. Xerostomia may result from both salivary and non-salivary causes like dehydration, cognitive alteration, oral sensory dysfunction and psychological (FOX, 1996). It must be recognized that the complaint of xerostomia is not sufficient for the diagnosis of salivary dysfunction. Conversely, the absence of a complaint of dry mouth is not a guarantee of adequacy of salivary function (FOX, 1996; Field et al., 1997).

The pathophysiology of sicca syndrome in HTLV-1 infected individuals is not completely understood and both damage associated with the exacerbated immune response as well as a direct pathological action of the virus may play a role (Eguchi et al., 1992). The salivary glands from mice transgenic for HTLV-1 tax revealed extensive proliferation of ductal epithelium, followed by lymphocytic infiltration, and then by destruction of acinus architecture (Green *et al.*, 1989). However, HTLV-1 tax gene was detected in patients with labial salivary glands involved by other inflammatory processes different from Sjögren's syndrome. The data could indicate that HTLV-1 tax gene may play a role as a co-factor in the development of Sjögren's syndrome or other diseases of oral cavity (Mariette et al., 2000). Recently data pointed out that sicca syndrome related to HTLV-1 infection differ from idiopathic Sjögren syndrome (Cartier et al., 2005) and is similar to that found in HIV and hepatitis C virus

infection (Merle et al., 2002). Indeed diagnostic criteria of Sjögren's syndrome now exclude infection with HCV, HTLV-1 or HIV (fox, 2005).

In this study, history of herpes labialis and recurrent aphthae was not associated to HTLV-1 infection. The finding regarding history of herpes virus infection was also obtained by Murphy and colleagues in a large case-control study of HTLV-1 seropositive and HTLV-1 seronegative blood donors (Murphy et al., 1997). Recurrent aphthae occurs worldwide although it appears most common in the developed world. The etiology of recurrent aphthae is not entirely clear. Despite many studies trying to identify a causal microorganism, it does not appear to be infectious. Ulcers similar to recurrent aphthae stomatitis may be seen in human immunodeficiency virus disease, in some other immune defects and with the use of certain drugs, especially non-steroidal anti-inflammatory drugs (Jurge et al., 2006).

There was no odds ratio difference in the use of dental prostheses or in poor oral hygiene practices between the two groups. Thus, we enrolled in the study both HTLV-1 seropositive subjects and controls from the same blood donation sampling frame to exclude possible confounding factors including race and socioeconomic status. Finally, denture stomatitis remained significant after adjustment for potential confounding variables including use of dental prostheses or poor oral hygiene practices. The observation that denture stomatitis both Type I and Type II (Newton's classification), which are characterized by pin-point erythematous patches or as confluent areas of erythema on the denture bearing-mucosa, respectively (Reichart et al., 2000), were associated with HTLV-1 infection was unexpected. *Candida albicans* is the causative agent in dentures stomatitis, although other non-immune based factors, including denture trauma, salivary flow, denture hygiene, denture base material, age of denture, and pH of denture plaque may be associated with the development of denture stomatitis (Vitkov et al., 1999). Regarding the immune response, HTLV-1 is characterized by an exacerbated Type I immune response, and one would not expect an increased association of infection with intracellular pathogens. Previous studies hypothesized that erythematous candidiasis is accompanied by activation of a partially reactive defense mechanism and may represent a clinical expression in response to candidal antigens (Romagnoli et al., 1997) or represent a hypersensitivity reaction to candidal antigens (Eversole et al., 1997). However it cannot be ruled out that HTLV-1 infected individuals have a decrease in defense mechanisms against *C. albicans*. Minor fungal infections were reported by previous studies, although association was found with HTLV-2 and not with HTLV-1. (Murphy et al., 1997). Evidence has been accumulating that HTLV-1 can cause a clinically important degree of immunosuppression even in the absence of malignant disease (Goon & Bangham, 2004). HTLV-I infection is known to worsen infections with various helminths and scabies (Porto et al., 2001; Bergman et al., 1999; Brites et al., 2002; Adedayo et al., 2003). The co-infection with HTLV-1 and *Strongyloides stercoralis* resulted in a higher rate of chronic strongyloidiasis carriage with an increased parasite load and a risk of more severe disease (Porto et al., 2001). Previous data showed that HTLV-1 carriers had a significantly reduced delayed-type hypersensitivity (DTH) response to purified protein derivative (PPD) skin testing (Tachibana et al., 1988; Suzuki et al., 1999). In Salvador, state of Bahia where tuberculosis and HTLV-1 are endemic, there are reports of increased prevalence of HTLV-1 seropositivity among patients with tuberculosis and also an increase of mortality

in co-infected patients (Pedral-Sampaio et al., 1997; Marinho et al., 2005). Furthermore, there has also

been evidence of an increased prevalence of clinical leprosy among co-infected patients as well as reports of increased mortality among co-infected patients compared to patients infected with *Mycobacterium leprae* only (Verdier et al., 1990; Lechat et al., 1997; Muneishi et al., 1998;

Dry mouth was mainly associated to HTLV-1 infected patients. In this study HTLV-1 infected individuals presented 5-fold higher chance to have dryness of mouth than HTLV-1 seronegative controls. Indeed in this sample, dry mouth was significantly associated with age and hyposalivation (data not shown) in HTLV-1 seropositive individuals.

Our study, the first to analyze oral conditions associated with HTLV-1 infection, indicated association between plaque induced gingivitis and chronic periodontitis with HTLV-1 infection. Periodontal diseases are chronic inflammatory diseases that lead eventually to loss of the supporting structures of the teeth, including resorption of the alveolar bone of the jaw (Baker, 2000). Disease progression is critically determined by the nature of inflammatory responses generated against the subgingival microorganisms (or biofilm) (Teng, 2006). The adaptive immune response is under the control of T-cells, which regulate B cell/plasma cell differentiation and antibody production. Clearance of bacteria by neutrophils may depend upon the presence of IFN- γ and may be further enhanced by protective antibodies, which in turn are controlled by the types of cytokines produced by T cells (Page et al., 1997; Gemmel et al., 1997; Gemmel & Seymour, 2004). Considering that in HTLV-1 infected patients there is an exacerbated Th1 type immune response that could decrease the Th2 type immune response to other infectious agents, it is possible that a deficiency in the Th2 type immune response could make hosts more prone to periodontal disease. On the other hand, experimental and *in vivo* data indicate that HTLV-1 could enhance expression of metalloproteinases (MMPs) in HAM/TSP patients despite the increase of endogenous inhibitors, TIMPs (Tominaga et al., 1999; Giraudon et al., 2000). These changes in MMP and TIMP expression were mediated by soluble factors, cytokines, secreted by activated T cells (Giraudon et al., 2000) and may play a role in tissue destruction characteristic of chronic and aggressive periodontitis (Tervahartiala et al., 2000; Garlet et al., 2004). Additionally, recent studies suggest that periodontal herpes viruses comprise an important source for triggering periodontal tissue destruction (Slots, 2000; Kamma, 2001; Saygun et al., 2004). Herpes virus productive infection may initiate or accelerate periodontal tissue destruction due to a virally mediated release of cytokines and chemokines from inflammatory and non-inflammatory host cells, or a virally induced impairment of the periodontal defense resulting in a heightened virulence of resident pathogenic bacteria (Saygun et al., 2004). Considering that in HTLV-1 there is an increase in pro-inflammatory cytokines, a perturbation of the MMP/TIMP balance, impairment in DTH and a decrease in protective antibodies, it is possible that the high frequency of significant dental mobility in HTLV-1 infected patients was not a coincidence. It allows us to hypothesize that HTLV-1 may be a factor capable of accelerating periodontal destruction similar to what occurs in herpes virus infection.

The results obtained by this case-control study suggest that HTLV-1 infection may be a predisposing factor for oral disease other than salivary glands dysfunction, which could be related to both an exacerbated inflammatory immune response or due to an antigen specific immunological defect to

other pathogens, such as periodontal bacteria. These findings, if confirmed by other epidemiological and immunological studies, would be of relevance to prevent and to treat oral conditions in HTLV-1 Infected patients.

References

1. Adedayo O, Grell G, Bellot P (2003). Hospital admissions for human T-cell lymphotropic virus type-1 (HTLV-1) associated diseases in Dominica. *Postgrad Med J* **79**: 341-344.
2. Beby-Defaux A, Frugier F, Bourgoin A, Moynet D, Hajjar C, Sainte-Foie S, Guillemain B, Agius G (1999). Nucleotide sequence analysis of human T-cell lymphotropic virus type I pX and LTR regions from patients with sicca syndrome. *J Med Virol* **59**: 245-255.
3. Brites C, Weyll M, Pedroso C, Badaro R (2002). Severe and Norwegian scabies are strongly associated with retroviral (HIV-1/HTLV-1) infection in Bahia, Brazil. *Aids* **16**: 1292-1293.
4. Bergman JN, Dodd WA, Trotter MJ, Oger JJ, Dutz J (1999). Crusted scabies in association with human T-cell lymphotropic virus 1. *J Cutan Med Surg* **3**: 148-152.
5. Carvalho EM, Bacellar O, Porto AF, Braga S, Galvão-Castro B, Neva F (2001). Cytokine profile and immunomodulation in asymptomatic human T-lymphotropic virus type 1-infected blood donors. *J Acquir Immune Defic Syndr* **27**: 1-6.
6. Cartier L, Castillo JL, Cea JG, Villagra R (1995). Chronic dacryosialadenitis in HTLV I associated myelopathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **58**: 244-246.
7. Consensus report (1996). Periodontal diseases: epidemiology and diagnosis. *Ann Periodontol* **1**: 216-22.
8. Daniels TE, Fox PC (1992). Salivary and oral components of Sjogren's syndrome. *Rheum Dis Clin North Am* **18**: 571-589.
9. Dourado I, Alcantara LC, Barreto ML, da Gloria Teixeira M, Galvão-Castro B (2003). HTLV-I in the general HTLV-1 in the general population of Salvador, Brazil: a city with African ethnic and sociodemographic characteristics. *J Acquir Immune Defic Syndr* **34**: 527-531.
10. Eguchi K, Matsuoka N, Ida H, Nakashima M, Sakai M, Sakito S, Kawakami A, Terada K, Shimada H, Kawabe Y (1992). Primary Sjogren's syndrome with antibodies to HTLV-I: clinical and laboratory features. *Ann Rheum Dis* **51**: 769-776.
11. Eversole LR, Reichart PA, Ficarra G, Schmidt-Westhausen A, Romagnoli P, Pimpinelli, N (1997). Oral keratinocyte immune responses in HIV-associated candidiasis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **84**: 372-380.
12. Field EA, Longman LP, Bucknall R, Kaye SB, Higham SM, Edgar WM (1997). The establishment of a xerostomia clinic: a prospective study. *Br J Oral Maxillofac Surg* **35**: 96-103.
13. Fox PC (1996). Differentiation of dry mouth etiology. *Adv Dent Res* **10**: 13-16.
14. Fox RI (2005). Sjogren's syndrome. *Lancet* **366**: 321-331.
15. Garlet GP, Martins WJr, Fonseca BA, Ferreira BR, Silva JS (2004). Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. *J Clin Periodontol* **31**: 671-679.

16. Gemmell E, Marshall RI, Seymour GJ (1997). Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontol 2000* **14**: 112-143.
17. Gemmell E, Seymour GJ (2004). Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease. *Periodontol 2000* **35**: 21-41.
18. Giraudon P, Szymocha R, Buart S, Bernard A, Cartier L, Belin MF, Akaoka H (2000). T lymphocytes activated by persistent viral infection differentially modify the expression of metalloproteinases and their endogenous inhibitors, TIMPs, in human astrocytes: relevance to HTLV-I-induced neurological disease. *J Immunol* **164**: 2718-2727.
19. Goon PK, Bangham CR (2004). Interference with immune function by HTLV-1. *Clin Exp Immunol* **137**: 234-236.
20. Green JE, Hinrichs SH, Vogel J, Jay G (1989). Exocrinopathy resembling Sjogren's syndrome in HTLV-1 tax transgenic mice. *Nature* **341**: 72-74.
21. Hajjar C, Sainte-Foie S, Savin J, Lacave J, Berlet F, Teron-About B, Batelier L, Guillemin B (1995). HTLV1 infection and sicca syndrome. *J Fr Ophthalmol* **18**: 597-602.
22. Jurge S, Kuffer R, Scully C, Porter SR. (2006) Number VI recurrent aphthous stomatitis. *Oral Dis* **12**: 1-21.
23. Kamma JJ, Contreras A, Slots J (2001). Herpes viruses and periodontopathic bacteria in early-onset periodontitis. *J Clin Periodontol* **28**: 879-885.
24. Lechat MF, Shrager DI, Declercq E, Bertrand F, Blattner WA, Blumberg BS (1997). Decreased survival of HTLV-I carriers in leprosy patients from the Democratic Republic of the Congo: a historical prospective study. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **15**: 387-390.
25. Manns A, Hisada M, La Grenade L (1999). Human T-lymphotropic virus type I infection. *Lancet* **353**: 1951-1958.
26. Mariette X, Agbalika F, Zucker-Franklin D, Clerc D, Janin A, Cherot P, Brouet JC (2000). Detection of the tax gene of HTLV-I in labial salivary glands from patients with Sjogren's syndrome and other diseases of the oral cavity. *Clin Exp Rheumatol* **18**: 341-347.
27. Marinho J, Galvão-Castro B, Rodrigues LC, Barreto ML (2005). Increased risk of tuberculosis with human T-lymphotropic virus-1 infection: a case-control study. *J Acquir Immune Defic Syndr* **40**: 625-628.
28. Merle H, Cabre P, Smadja D, Josset P, Landau M, Vernant J C (1999). Sicca syndrome and HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Jpn J Ophthalmol* **43**: 509-512.
29. Merle H, Cabre P, Olindo S, Merle S, Smadja D (2002). Ocular lesions in 200 patients infected by the human T-cell lymphotropic virus type 1 in Martinique (French West Indies). *Am J Ophthalmol* **134**: 190-195.
30. Murphy EL, Glynn SA, Fridey J, Sacher RA, Smith JW, Wright DJ, Newman B, Gible JW, Ameti DI, Nass CC, Schreiber GB, Nemo GJ (1997). Increased prevalence of infectious diseases and other adverse outcomes in human T lymphotropic virus types I- and II-infected blood donors. Retrovirus Epidemiology Donor Study (REDS) Study Group. *J Infect Dis.* **176**: 1468-1475.

31. Muneishi H, Taguchi H, Sawada T, Ikezoe T, Matsui S, Tanaka S, Taniguchi T, Onoue O, Miyoshi I (1998). Prevalence of HTLV-I in leprosy patients in two sanatoriums in Japan. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **17**: 380-383.
32. Nakamura H, Eguchi K, Nakamura T, Mizokami A, Shirabe S, Kawakami A, Matsuoka N, Migita K, Kawabe Y, Nagataki S (1997). High prevalence of Sjogren's syndrome in patients with HTLV-I associated myelopathy. *Ann Rheum Dis* **56**: 167-172.
33. Nakamura H, Kawakami A, Tominaga M, Hida A, Yamasaki S, Migita K, Kawabe Y, Nakamura T, Eguchi K (2000). Relationship between Sjogren's syndrome and human T-lymphotropic virus type I infection: follow-up study of 83 patients. *J Lab Clin Med* **135**: 139-144.
34. Osame, M (2002). Pathological mechanisms of human T-cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy (HAM/TSP). *J Neurovirol* **8**: 359-364.
35. Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS (1997). Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol 2000* **14**: 216-48.
36. Pedral-Sampaio DB, Martins Netto E, Alcantara AP, Souza J, Moura L, Brites C, Pedroso C, Biana JC, Badaro R (1997). Use of Standard Therapy for Tuberculosis is Associated with Increased Adverse Reactions in Patients with HIV. *Braz J Infect Dis* **1**: 123-130.
37. Porto AF, Neva FA, Bittencourt H, Lisboa W, Thompson R, Alcantara L, Carvalho EM (2001). HTLV-1 decreases Th2 type of immune response in patients with strongyloidiasis. *Parasite Immunol* **23**: 503-7.
38. Reichart PA, Samaranayake LP, Philipsen H (2000). Pathology and clinical correlates in oral candidiasis and its variants: a review. *Oral Dis* **6**: 85-91.
39. Romagnoli P, Pimpinelli N, Mori M, Reichart PA, Eversole LR, Ficarra G (1997). Immunocompetent cells in oral candidiasis of HIV-infected patients: an immunohistochemical and electron microscopical study. *Oral Dis* **3**: 99-105.
40. Santos SB, Porto AF, Muniz AL, de Jesus AR, Magalhaes 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 *BMC. Infect Dis* **4**: 7.
41. Saygun I, Sahin S, Ozdemir A, Kurtis B, Yapar M, Kubar A, Ozcan G (2002). Detection of human viruses in patients with chronic periodontitis and the relationship between viruses and clinical parameters. *J Periodontol* **73**: 1437-1443.
42. Saygun I, Kubar A, Ozdemir A, Yapar M, Slots J (2004). Herpesviral-bacterial interrelationships in aggressive periodontitis. *J Periodontal Res* **39**: 207-212.
43. Slots J, Sugar C, Kamma JJ (2002). Cytomegalovirus periodontal presence is associated with subgingival Dialister pneumosintes and alveolar bone loss. *Oral Microbiol Immunol* **17**: 369-374.
44. Slots J, Kamma JJ, Sugar C (2003). The herpesvirus-Porphyrromonas gingivalis-periodontitis axis. *J Periodontal Res* **38**: 318-323.
45. Suzuki M, Dezzutti CS, Okayama A, Tachibana N, Tsubouchi H, Mueller N, Lal RB (1999). Modulation of T-cell responses to a recall antigen in human T-cell leukemia virus type 1-infected individuals. *Clin Diagn Lab Immunol* **6**: 713-717.

46. Szpirglas H, Guedj A, Coulibaly C (1994). Xerostomia. Current data and perspectives. *Rev Stomatol Chir Maxillofac* **95**: 115-118.
47. Tachibana N, Okayama A, Ishizaki J, Yokota T, Shishime E, Murai K, Shioiri S, Tsuda K, Essex M, Mueller N (1988). Suppression of tuberculin skin reaction in healthy HTLV-I carriers from Japan. *Int J Cancer* **42**: 829-831.
48. Teng YT (2006). Protective and Destructive Immunity in the Periodontium: Part 2-T-cell-mediated Immunity in the Periodontium. *J Dent Res* **85**: 209-219.
49. Terada K, Katamine S, Eguchi K, Moriuchi R, Kita M, Shimada H, Yamashita I, Iwata K, Tsuji Y, Nagataki, S. (1994) Prevalence of serum and salivary antibodies to HTLV-1 in Sjogren's syndrome. *Lancet* **344**: 1116-1119.
50. Tervahartiala T, Pirila E, Ceponis A, Maisi P, Salo, T, Tuter G, Kallio P, Tornwall J, Srinivas R, Kontinen YT, Sorsa T. (2000) The in vivo expression of the collagenolytic matrix metalloproteinases (MMP-2, -8, -13, and -14) and matrilysin (MMP-7) in adult and localized juvenile periodontitis. *J Dent Res* **79**: 1969-1977.
51. Tominaga M, Migita K, Nakamura H, Ichinose Y, Furuya T, Origuchi T, Kawabe Y, Hida A, Nakamura T, Eguchi K (1999). Expression of metalloproteinase-2 (gelatinase A) in labial salivary glands of patients with Sjogren's syndrome with HTLV-I infection. *Clin Exp Rheumatol* **17**: 463-466.
52. Uhlig T, Kvien TK, Jensen JL, Axell T (1999). Sicca symptoms, saliva and tear production, and disease variables in 636 patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **58**: 415-22.
53. Verdier M, Denis F, Sangare A, Leonard G, Sassou-Guesseu E, Gaye A, al-Qubati Y, Rey JL, N'Gaporo I, Doua F, et al. (1990). Antibodies to human T lymphotropic virus type 1 in patients with leprosy in tropical areas. *J Infect Dis* **161**: 1309-1310.
54. Vernant JC, Buisson G, Magdeleine J, De Thore J, Jouannelle A, Neisson-Vernant C, Monplaisir N (1988). T-lymphocyte alveolitis, tropical spastic paresis, and Sjögren syndrome. *Lancet* **1**: 177.
55. Vitkov L, Weitgasser R, Lugstein A, Noack MJ, Fuchs K, Krautgartner WD (1999). Glycaemic disorders in denture stomatitis. *J Oral Pathol Med* **28**: 406-409.

3.2. Manuscrito 2: Salivary Gland Hypofunction in HTLV-I Infected Individuals

Artigo submetido ao periódico **Revue de Stomatologie et de Chirurgie Maxillo-Faciale**

OBJETIVOS: avaliar a frequência de síndrome seca, a função das glândulas salivares através da mensuração do fluxo salivar estimulado em indivíduos portadores de HTLV-1, em pacientes com HAM-TSP e em indivíduos HTLV-I soronegativos. Avaliou-se também, a existência de associação entre os níveis de citocinas pró-inflamatórias no sangue periférico com os níveis do fluxo salivar.

RESULTADOS: a frequência de xerofthalmia e xerostomia nesta amostra foi 31%, 18% e 0%, $p < 0,05$ e 69%, 27% e 0%, $p < 0.05$ nos pacientes com HAM-TSP, nos indivíduos portadores de HTLV-1 e no grupo controle respectivamente. O exame clínico oral evidenciou a presença de boca seca em 75 % dos pacientes com HAM-TSP e em 22% dos indivíduos portadores de HTLV-1. O grupo controle não apresentou evidência de boca seca. Essas diferenças foram estatisticamente significativas. Os sinais clínicos objetivos de boca seca foram: mucosa oral ressecada, colante ao odontoscópio, moderadamente eritematosa e friável. A saliva grossa, espumante, escassa ou ausente. O aspecto da língua ressecado, sem brilho e às vezes fissurada. A sialometria mostrou que os pacientes com HAM/TSP tinham hipossalivação mais marcante, $3,1 \pm 1,2$ g/2min (0.9–4.6), embora uma grande parte dos indivíduos portadores de HTLV-1 apresentassem também hipossalivação importante, 4.4 ± 1.8 g/2min (0,8 a 9,3). A média do fluxo salivar foi mais alta no grupo controle, $5,1 \pm 1.4$ g/2min (3,1–10,0). Estas diferenças foram estatisticamente significativas. A proporção de indivíduos com hipossalivação foi maior no grupo com

HAM-TSP (44%) do que nos indivíduos portadores de HTLV-1 (28%). Nesta amostra a hipossalivação não esteve associada à xerostomia, embora tenha havido uma associação entre a presença de boca seca e a hipossalivação. Verificou-se uma tendência de correlação inversa entre os níveis de IFN- γ e o fluxo salivar.

Salivary Gland Hypofunction in HTLV-I Infected Individuals

S.P. Giozza^{1,2*}, S. B. Santos¹, M.A. Porto¹, M. Martinelli¹, A. L. Muniz¹ and E.M. Carvalho^{1,3}.

¹*Serviço de Imunologia, Hospital Universitário Professor Edgar Santos (HUPES), Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil;*

²*Departamento de Odontologia, Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campina Grande, Paraíba, Brazil;*

Corresponding author:

Silvana Pereira Giozza

Address: Hospital Universitário Professor Edgar Santos (HUPES), Serviço de Imunologia, 5º andar. Universidade Federal da Bahia, UFBA. Rua João das Botas, S/N – Canela. CEP: 40 110 - 160 Salvador – Bahia- Brazil.

Fax number: 00 55 71 3245 7110

E.mail: silvanagiozza@terra.com.br; imuno@ufba.br.

COVER PAGE**HTLV-I infection and Salivary gland Hypofunction**

Key words: HTLV-1, HAM/TSP, Sjögren's syndrome, xerostomia, xerophthalmia.

Number of words in abstracts: 149 words

Number of words in abstracts and text: 2148 words

Number of tables: 01

Number of figures: 02

Number of references: 30

List of abbreviations:

ATLL	Acute T cell leukemia and Lymphoma
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
HTLV-1	Human virus lymphotropic type 1
HAM-TSP	Myelopathy/ Tropical Spastic Paraparesis
HCV	Hepatitis C Virus
IFN-γ	Interferon gamma
IL-2	Interleukin 1
IL-1β	Interleukin 1 Beta
NF-κB	Activating transcription factor
SD	Standard deviation
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
WHO	World Health Organization
TNF - α	Tumor Necrosis Factor
Th1	T "helper" Cells type 1

ABSTRACT

The human virus lymphotropic type 1 (HTLV-1) infects predominantly T cells leading to a constant activation of T cells that proliferate and secrete cytokines even in unstimulated cultures. These immunologic abnormalities are the cause of diseases associated to HTLV-I such as acute T cell leukemia and the myelopathy/ tropical spastic paraparesis - HAM-TSP. Sjögren's syndrome has been described in HAM-TSP patients, but it's not clear if asymptomatic HTLV-I carriers have salivary glands abnormalities. Chi-square analysis and Spearman correlation analysis were used for the evaluation of differences between groups. Herein it is shown that sicca symptoms and salivary gland hypofunction were more common in HAM-TSP patients than in HTLV-1 carriers and seronegative controls, but 27% of HTLV-1 carriers have decreased salivary flow similar to that observed in HAM-TSP patients. Oral disease is an important aspect of the pathology caused by HTLV-1 in HAM/TSP patients as well as in HTLV-1 carriers.

INTRODUCTION

The Human T- cell Lymphotropic type I virus (HTLV-I) is an exogenous human retrovirus that infects 10-20 million people worldwide and is associated with adult T-cell leukemia and lymphoma (ATLL) and chronic progressive disease of the central nervous system termed HTLV-I associated myelopathy (HAM) / tropical spastic paraparesis (TSP) (Gessain *et al*, 1985). There are large endemic areas in Caribbean, South America, Africa and Japan (Osame, 2002). Salvador, state of Bahia, presents the highest seroprevalence of HTLV-1 in Brazil, estimated in 1.7% of blood donors (Dourado *et al*, 2003). HTLV-I infects, predominantly, T cells, mediating T cell proliferation and activation. High levels of cytokines are produced even in unstimulated cultures (Hollberg and David, 1993). Specifically, a predominant enhancement of IFN- γ and TNF- α production in patients with HAM-TSP compared with HTLV-I carriers is observed (Santos *et al*, 2004). This exacerbated Th1 type immune response, with production of proinflammatory cytokines (Carvalho *et al*, 2001) and, or expansion of auto-reactive T-cells, are the possible mechanism for tissue damage in HTLV-I infection (Fujinami, 2005; Yamano *et al*, 2005). HTLV-1 has been shown to be associated not only with HAM/TSP and ATLL but also with T-lymphocytic alveolitis, polymyositis, arthritis, uveitis and sicca syndrome (Vernant *et al*, 1988). Although the association between sicca syndrome and Sjögren's Syndrome with HAM - TSP is well recognized (Eguchi *et al*, 1992; Terada *et al*, 1994; Mariette *et al*, 1995a; Nakamura *et al*, 1997a; Merle *et al*, 1999a; Izumi *et al*, 1999; Nakamura *et al*, 2000b; Merle *et al*, 2002b) it is not clear if these are only observed in HAM-TSP, or they can be found in asymptomatic HTLV-I carriers. Moreover, no controlled studies comparing sicca syndrome in HAM-TSP patients, HTLV-I carriers and healthy subjects have been performed. The aim of this investigation was to evaluate the frequency of xerophthalmia and xerostomia as well as the measurement of the whole stimulated salivary flow rate in HTLV-I carriers, in patients with HAM-TSP and in HTLV-I seronegative healthy controls. Moreover the occurrence of an association between salivary flow rate and levels of proinflammatory cytokines was evaluated.

MATERIAL & METHODS

Study Population

Participants of the study included 83 of 120 HTLV-I infected individuals who were admitted in the multidisciplinary HTLV-I ambulatory at the Hospital Universitário Professor Edgar Santos – Universidade Federal da Bahia (Salvador – Brazil), from April 2002 to December 2004. All patients had a positive HTLV-I ELISA test, confirmed by Western-Blot. The selection of patients was carried out according to the following exclusion criteria: positive HIV testing, diagnosis of diabetes mellitus, evidence of HCV infection, habitual alcohol or drugs users, history of smoke more than one packet of cigarettes per week and use of anticholinergic drugs. Individuals infected with HTLV-1 were further divided in two groups: patients with HAM-TSP classified by WHO criteria and HTLV-I carriers. HTLV-I seronegative healthy volunteers and blood bank donors formed the control group. Subjects were asked about xerostomia (Vitali *et al*, 2002), and an intra-oral examination was performed to detect macroscopic oral lesions. An extra-oral examination was performed to identify enlargements of salivary glands.

Determination of salivary output was measured by the Saxon test (g/2min) as previously described (Kholer and Winter, 1985). The test was performed between 9:00 a.m. and 11:00 a.m. by a single investigator. Subjects refrained from eating, drinking, and smoking and oral hygiene procedures for 1 hour before salivary collection. The salivary flow results were compared with those obtained from 29 HTLV-I seronegative healthy volunteers and blood donors. The cutoff line between normal and low output (*i.e.*, salivary gland hypofunction) was set at the lowest 10th percentile of the control group's values (Dayan *et al*, 2003). To analyze salivary output, the patients and controls were divided in three groups: group 1, HAM - TSP patients; group 2, asymptomatic HTLV-I carriers; group 3, healthy individuals. Salivary flow was also analyzed in relation to clinical and immunological responses. Informed consent from patients and healthy controls was required, and the Ethics committee of the Hospital Universitário Professor Edgar Santos approved the study.

Cytokine Determination

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained from heparinized venous blood after separation using lymphocyte separation medium. After washed in saline, cells were adjusted to 3×10^6 cells/mL in RPMI 1640 plus 10% serum AB Rh+. The cells were cultured unstimulated at 37° C in 5 % CO₂ atmosphere for 72 hours until supernatants were collected. IFN- γ and TNF- α levels were measured by sandwich ELISA technique (R & D system, Minneapolis, MN).

RESULTS

The demographic characteristics the frequency of xerostomia and xerophthalmia of the 83 patients (HTLV-I carriers and HAM – TSP) and seronegative healthy controls are shown in Table 1. Sixty seven (81%) of the HTLV-I infected individuals were HTLV-I carriers and 16 (19%) had HAM-TSP. There was no significant difference between groups in regard to gender or age ($p > 0.05$).

While 5 (31 %) of the 16 HAM-TSP patients and 12 (18 %) of the 67 HTLV-I carriers complained of xerophthalmia, none of the controls complained of dry eyes ($p < 0.05$). In regard to xerostomia, 11 (69%) of 16 HAM-TSP and 18 (27%) of the 67 HTLV-I carriers complained of dry mouth. The frequency of xerophthalmia and xerostomia was higher in both HAM-TSP patients and in HTLV-I carriers than in controls ($p < 0.05$ and $p < 0.01$) respectively. Differences between HAM-TSP patients and HTLV-I carriers in regard to xerophthalmia were not significant ($p > 0.05$).

Clinical examination of oral tissues revealed evidence of dry mouth in 12 (75 %) of HAM-TSP patients and 15 (22%) of HTLV-I carriers, and the absence of clinical alteration in health controls individuals ($p = 0.001$). Clinically, oral mucosa appeared desiccated, sticky, mildly erythematous and friable. The tongue appeared dry, coated and in some cases fissured. The saliva was scant, thick, and foamy or absent. Three patients presented a medial dorsal surface of the tongue with atrophic filiform papillae, erythematous, suggesting asymptomatic rhomboid median glossitis.

The means of whole salivary flow rate in the 3 groups are shown in Figure 1. HAM-TSP patients had lower ($p = 0.014$) salivary output, 3.1 ± 1.2 g/2min (range 0.9 – 4.6) than the HTLV-I carriers (4.4 ± 1.8 g/2min; range 0.8-9.3) and the control group ($p = 0,001$), 5.1 ± 1.4 g/2min (range 3.1 – 10.0). The cutoff point between normal and low salivary output was 3.17 g/2min, which corresponds to the lowest 10th percentile of the control group's values. Based on this cutoff, low output was detected in 7 (44 %) of the HAM-TSP patients.

of the 16 HAM – TSP, in 19 (28%) of 67 HTLV-I carriers and in 1 of the 29 (3.4%) seronegative controls. While salivary gland hypofunction was not associated with xerostomia ($p > 0.05$), there was significant association ($p < 0.05$) between oral dryness and decreasing in salivary output.

Data on INF - γ production was available in supernatant of unstimulated peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in 54 of the 83 HTLV-I infected patients. INF - γ levels were quite variable, ranging from 0 to 7835 pg/ml. There was a tendency for an inverse correlation between INF - γ and salivary output (Figure 2) although this did not reach statistical significance.

DISCUSSION

Saliva is an important body fluid which plays a vital role in protecting the oral mucosa and teeth, as well as aiding oral function and the digestion of food. The absence of saliva leads to a number of oral change, which can reduce the patient's quality of life (Sreebny, 2000). This study, performed in a multidisciplinary ambulatory clinic for HTLV-I patients, showed that salivary gland hypofunction is not only a characteristic of patients with HAM-TSP, but is also observed in a large proportion of HTLV-I carriers. Moreover, xerostomia and clinical evidence of dry mouth were more frequent in HTLV-I carriers than in seronegative controls.

The majority of HTLV-I infected individuals is asymptomatic and considered as HTLV-I carriers. Only a small proportion (less than 5%) of the infected population will develop the more severe clinical manifestations as ATLL and HAM-TSP (Jacobson, 2002). An association of sicca syndrome (xerostomia and xerophthalmia) with HAM-TSP has been previously reported. However, little is known about it in HTLV-I carriers. This study documents that a large proportion of HTLV-I carriers complained of xerostomia and had macroscopic abnormalities in the oral mucosa, characterized by oral dryness. Moreover xerostomia was significantly associated with clinical signs of oral dryness suggesting that symptoms appear when oral mucosa is dry.

The Saxon test was selected for sialometry due to simplicity; reproducibility and correlation with Schirmer's test (Kholer and Winter, 1985). In our study, the Saxon test proved to be an effective screening procedure in the research setting for sicca symptoms in HTLV-I infected patients.

An association of clinical evidence of oral dryness with salivary gland hypofunction was observed. However, the association of xerostomia with decreased salivary function was not found, as others have reported (Longman *et al*, 1997a; Hay *et al*, 1998). We explain this as a spectrum of disease with the largest group being patients with xerostomia, a portion of these with clinical evidence of dry mouth and a fraction of these with actual salivary gland hypofunction. This is an important finding and supports the theory that an assessment of oral dryness, conducted as part of routine orodental examination, could enable dental practitioners to identify patients with salivary glands hypofunction, without sialometry as suggested by Longman (Longman *et al*, 1997a; Longman *et al*, 2000b).

HAM-TSP patients demonstrates a significantly reduction in the mean of salivary output compared with HTLV-I carriers and healthy controls. However, the severity of salivary gland hypofunction in some HTLV-I carriers is comparable to that seen in HAM-TSP patients. We are investigating if the

occurrence of salivary gland hypofunction in HTLV-I carriers can be a marker of development of HAM-TSP.

There are a number of possible causes for a reduced salivary flow rate in HTLV-I infected individuals. The principal theories include infiltration of the salivary glands by the tax gene or a possible virus induced immune mechanism (Nakamura *et al*, 2000b; Green *et al*, 1989; Mariette *et al*, 2000b). The salivary glands from mice transgenic for HTLV-I tax revealed extensive proliferation of ductal epithelium, followed by lymphocytic infiltration, and then by destruction of acinus architecture (Green *et al*, 1989). HTLV-I tax gene up regulates inflammatory cytokine genes by activating transcription factor NF- κ B (Rousset *et al*, 1996). HTLV-I infected lymphocytes and macrophages are known to secrete large amounts of cytokines including IL-2, IFN- γ , and TNF- α . It has been reported that in the developmental processes of Sjögren's syndrome, mRNA expression for various cytokines, such as TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6, and IFN- γ can be detected in salivary gland tissues of humans and experimental animals (Azuma *et al*, 1997).

One of the rationales to analyze a correlation between IFN- γ and overall salivary flow is that increasing evidence indicates a close relationship between the pathogenesis of Sjögren's syndrome and the expression of cytokine genes in salivary gland tissues (Fox *et al*, 1994). The present study showed a tendency for an inverse correlation between production of IFN- γ in peripheral blood, and salivary output. Because HAM/TSP and ATLL are such severe diseases little attention has been given to other manifestations associated with HTLV-I. This study demonstrates that oral disease is an important aspect of the pathology caused by HTLV-1 in patients with HAM/TSP as well as HTLV-1 carriers. Factors involved in the development of oral pathology may involve direct viral effects or the activated T cell response producing salivary gland disease.

ACKNOWLEDGMENTS

I am extremely grateful to Dr. Edgar M. Carvalho, for his constant support and encouragement. I thank my colleague Silvane Braga Santos for her dedication in cytokines analysis; Daniel Josiah Morgan for his aid in correcting this manuscript; Dilma Simplícia da Paixão and Clenildo Bispo dos Santos for help-me during this work. This investigation was supported in part by the Brazilian Research Council (CNPQ) and in part the Fundação do Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB). Dr. Edgar M. Carvalho is senior investigator of the Brazilian Research Council (CNPQ).

REFERENCES

1. Azuma MM, Katsumi; Aota, Keiko; Hayashi, Yoshio; Sato, Mitsunobu (1997). Role of Cytokines in the Destruction of Acinar Structure in Sjögren's Syndrome Salivary Glands. *Nature Laboratory Investigation* 77(3): 269-280.
2. Carvalho EM, Bacellar O, Porto AF, Braga S, Galvão-Castro B, Neva F (2001). Cytokine profile and immunomodulation in asymptomatic human T-lymphotropic virus type 1-infected blood donors. *J Acquir Immune Defic Syndr* 27(1):1-6.
3. Dayan B, Elstein D, Zimran A, Neshet G (2003). Decreased salivary output in patients with Gaucher disease. *Qjm* 96(1): 53-60
4. Dourado I, Alcantara LC, Barreto ML, da Gloria Teixeira M, Galvão-Castro B (2003). HTLV-I in the general population of Salvador, Brazil: a city with African ethnic and sociodemographic characteristics. *J Acquir Immune Defic Syndr* 34(5): 527-31.
5. Eguchi K, Matsuoka N, Ida H, Nakashima M, Sakai M, Sakito S, Kawakami A, Terada K, Shimada H, Kawabe Y (1992). Primary Sjogren's syndrome with antibodies to HTLV-I: clinical and laboratory features. *Ann Rheum Dis* 51(6):769-76.
6. Fox RI, Kang HI, Ando D, Abrams J, Piza E (1994). Cytokine mRNA expression in salivary gland biopsies of Sjogren's syndrome. *J Immunol* 152(11): 5532-9.
7. Fujinami RS (2005). A tax on luxury: HTLV-I infection of CD4+CD25+ Tregs. *J Clin Invest* 115(5):1144-6.
8. Gessain A, Barin F, Vernant JC, Gout O, Maurs L, Calender A, de The G. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet*. 1985 Aug 24; 2(8452):407-10.
9. Green JE, Begley CG, Wagner DK, Waldmann TA, Jay G (1989). Transactivation of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and the interleukin-2 receptor in transgenic mice carrying the human T-lymphotropic virus type 1 tax gene. *Mol Cell Biol* 9(11):4731-7.
10. Hay EM, Thomas E, Pal B, Hajeer A, Chambers H, Silman AJ (1998). Weak association between subjective symptoms or and objective testing for dry eyes and dry mouth: results from a population based study. *Ann Rheum Dis* 57(1): 20-4.
11. Hollsberg PH, David A. (1993). Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston: Pathogenesis Of Diseases Induced By Human Lymphotropic Virus Type I Infection. *The New England Journal of Medicine* 328(16): 1173-1182.
12. Izumi M, Nakamura H, Nakamura T, Eguchi K (1999). Sjogren's syndrome (SS) in patients with human T cell leukemia virus I associated myelopathy: paradoxical features of the major salivary glands compared to classical SS. *J Rheumatol* 26(12):2609-14
13. Jacobson S (2002). Immunopathogenesis of human T cell lymphotropic virus type I-associated neurologic disease. *J Infect Dis* 186 Suppl 2(S187-92).
14. Kohler PF, Winter ME (1985). A quantitative test for xerostomia. The Saxon test, an oral equivalent of the Schirmer test. *Arthritis Rheum* 28(10):1128-32.
15. Longman LP, Higham SM, Bucknall R, Kaye SB, Edgar WM, Field EA (1997a). Signs and symptoms in patients with salivary gland hypofunction. *Postgrad Med J* 73(856):93

16. Longman LP, McCracken, CFM, Higham SM, Edgar WM, Field EA (2000b). The clinical assessment of oral dryness is a significant predictor of salivary gland hypofunction. *Oral diseases* 6: 366-370.
17. Mariette X, Cherot P, Cazals D, Brocheriou C, Brouet JC, Agbalika F (1995a). Antibodies to HTLV-I in Sjogren's syndrome. *Lancet* 345(8941):71.
18. Mariette X, Agbalika F, Zucker-Franklin D, Clerc D, Janin A, Cherot P, Brouet JC (2000b). Detection of the tax gene of HTLV-I in labial salivary glands from patients with Sjogren's syndrome and other diseases of the oral cavity. *Clin Exp Rheumatol* 18(3): 341-7.
19. Merle H, Cabre P, Smadja D, Josset P, Landau M, Vernant JC (1999a). Sicca syndrome and HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Jpn J Ophthalmol* 43(6):509-12.
20. Merle H, Cabre P, Olindo S, Merle S, Smadja D (2002b). Ocular lesions in 200 patients infected by the human T-cell lymphotropic virus type 1 in Martinique (French West Indies). *Am J Ophthalmol* 134(2):190-195.
21. Nakamura H, Eguchi K, Nakamura T, Mizokami A, Shirabe S, Kawakami A, Matsuoka N, Migita K, Kawabe Y, Nagataki S (1997a). High prevalence of Sjogren's syndrome in patients with HTLV-I associated myelopathy. *Ann Rheum Dis* 56(3): 167-72.
22. Nakamura H, Kawakami A, Tominaga M, Hida A, Yamasaki S, Migita K, Kawabe Y, Nakamura T, Eguchi K (2000b). Relationship between Sjogren's syndrome and human T-lymphotropic virus type I infection: follow-up study of 83 patients. *J Lab Clin Med* 135(2): 139-44.
23. Osame M (2002). Pathological mechanisms of human T-cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy (HAM/TSP). *J Neurovirol* 8(5): 359-64.
24. Rousset R, Desbois C, Bantignies F, Jalinot P (1996). Effects on NF-kappa B1/p105 processing of the interaction between the HTLV-1 transactivator Tax and the proteasome. *Nature* 381(6580): 328-31.
25. Santos SB, Porto AF, Muniz AL, de Jesus AR, Magalhaes 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. *BMC Infect Dis* 4(1):7.
26. Sreebny LM (2000). Saliva in health and disease: an appraisal and update. *Int Dent J* 50(3): 140-61.
27. Terada K, Katamine S, Eguchi K, Moriuchi R, Kita M, Shimada H, Yamashita I, Iwata K, Tsuji Y, Nagataki S (1994). Prevalence of serum and salivary antibodies to HTLV-1 in Sjogren's syndrome. *Lancet* 344(8930):1116-9.
28. Vernant JC, Buisson G, Magdeleine J, De Thore J, Jouannelle A, Neisson-Vernant C, Monplaisir N (1988). T-lymphocyte alveolitis, tropical spastic paresis, and Sjogren syndrome. *Lancet* 1(8578): 177.
29. Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, Daniels TE, Fox PC, Fox RI, Kassan SS, Pillemer SR, Talal N, Weisman MH (2002). Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis* 61(6): 554-8.

30. Yamano Y, Takenouchi N, Li HC, Tomaru U, Yao K, Grant CW, Maric DA, Jacobson S (2005). Virus-induced dysfunction of CD4+CD25+ T cells in patients with HTLV-I-associated neuroimmunological disease. *J Clin Invest* 115(5):1361-8.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Determination of salivary output was measured by the Saxon test (data expressed in g/2min) as previously described. The cutoff line between normal and low output (*i.e.*, salivary gland hypofunction) was set at the lowest 10th percentile of the control group's.

Figure 2. INF - γ levels were measured by ELISA in supernatant of unstimulated cultures (data expressed in pg/ml) and whole salivary output was determined by Saxon test Expressed by g/2min.

Table 1. Demographic characteristics and history of xerophthalmia and xerostomia in HTLV-I infected individuals

	Groups			<i>p value</i>	
	<i>HAM – TSP (1)</i>	<i>HTLV-I carriers (2)</i>	<i>Control group (3)</i>	1 x 3	2 x 3
No. Subjects	16	67	29		
Mean age (yrs)	51 ± 14 (20-76)	45 ± 11 (21-72)	43 ± 15 (21-61)	0.097 ¹	0,832 ¹
Sex					
Female	9 (56%)	42 (63%)	13 (45%)	0.825 ²	0.121 ²
Male	7 (44%)	25 (37%)	16 (55%)		
Xerophthalmia	5 (31%)	12 (18%)	0 (0%)	0,004 ³	0.033 ³
Xerostomia	11 (69%)	18 (27%)	0 (0%)	0,0001 ³	0.005 ³

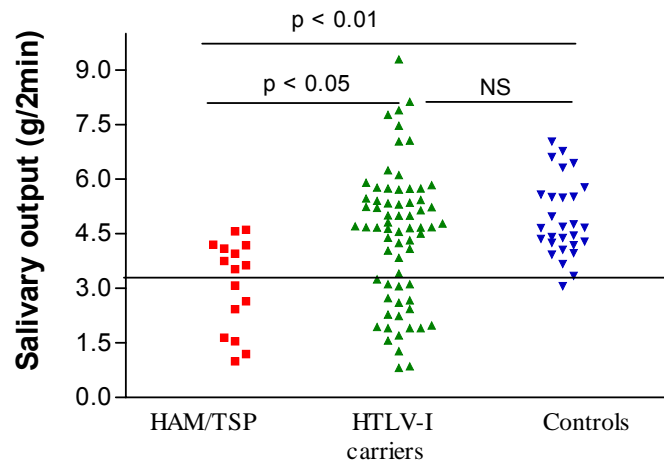
¹ One-way ANOVA after Tukey test.

² Pearson Chi Square.

³ The Fisher Exact test.

$p < 0,05$ considered significant

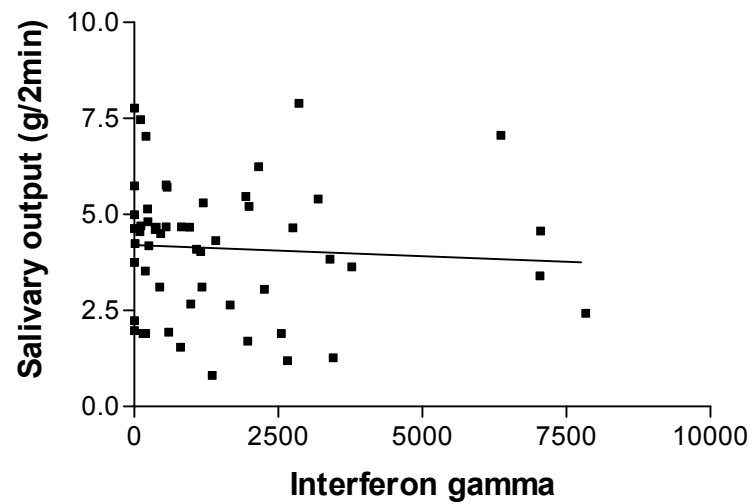
Figure 1. Salivary output (g/ 2min) in HTLV-I infected individuals and in health controls



¹ One-way ANOVA after Tukey test.

$p < 0,05$ considered significant. Cut off: 3.17 g/2min

Figure 2 Correlation between salivary output in 54 HTLV-1 seropositive subjects and INF- γ levels in peripheral blood mononuclear cells



Spearman $r = 0.14$; $p = 0.3$

3.3. *Manuscrito 3: HTLV-1 promotes over-expression of cytokines in periodontitis gingival tissue*

OBJETIVOS: avaliar a resposta imune em pacientes com periodontite crônica associada à infecção pelo HTLV-1.

RESULTADOS: os indivíduos HTLV-1 soropositivos com periodontite crônica apresentaram maior perda óssea e mais inflamação gengival do que os indivíduos HTLV-1 soronegativos com periodontite agressiva, periodontite crônica e sem periodontite. Os resultados das análises feitas por meio de Real-Time PCR mostraram que indivíduos HTLV-1 soropositivos apresentaram uma resposta imune Th1 exacerbada com altos níveis de IFN- γ nos tecidos gengivais semelhantes aos observados no sangue periférico. A expressão de IFN- γ foi igualmente, mais intensa no grupo infectado do que na periodontite agressiva e periodontite crônica em indivíduos HTLV-1 soronegativos. Resultados semelhantes foram obtidos em relação à IL-10. Em relação à expressão de MMPs e TIMPs, a expressão de RNAm para MMP2 e MMP9 foi maior no grupo infectado, embora não tenha havido diferença estatisticamente significativa. A expressão de TIMP1 foi mais intensa no grupo com HTLV-1 do que nos controles, entretanto a expressão de TIMP3 foi menos intensa no grupo com HTLV-1 do que no grupo controle com periodontite crônica e próxima daquela observada no grupo controle com periodontite agressiva, sugerindo que a infecção pelo HTLV-1 contribui para uma forma mais agressiva da doença periodontal nos indivíduos infectados.

HTLV-1 promotes over-expression of cytokines in periodontitis gingival tissue

Giozza, S.P¹², Garlet, G.P³, Silva J.S³; Braga-Santos S¹; Carvalho E⁴.; Mattos-Oliveira, M.A¹; Carvalho, E.M¹⁵.

¹²*Serviço de Imunologia, Hospital Universitário Professor Edgar Santos (HUPES), Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil; Departamento de Odontologia, Universidade Estadual da Paraíba; Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil*

³*Departamento de Imunologia e Bioquímica, Faculdade de Medicina da Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP;*

Key words: HTLV-1, HAM/TSP, gingivitis, periodontitis, MMP, TIMPs, OPG, RANKL

Corresponding author:

Silvana Pereira Giozza

Address: Hospital Universitário Professor Edgar Santos (HUPES), Serviço de Imunologia, 5º andar. Universidade Federal da Bahia, UFBA. Rua João das Botas, S/N – Canela. CEP: 40 110 - 160 Salvador – Bahia- Brazil.

Fax number: 00 55 71 3245 7110

E.mail: silvanagiozza@terra.com.br; imuno@ufba.br.

INTRODUCTION

The Human T- cell Lymphotropic type I virus (HTLV-I) is an exogenous human retrovirus that infects 10-20 million people worldwide and is associated with adult T-cell leukemia (ATL) and chronic progressive disease of the central nervous system termed HTLV-I associated myelopathy (HAM)/tropical spastic paraparesis (TSP) (Osame, 2002).

HTLV-1 has been shown to be associated not only with HAM/TSP and ATLL but also with T-lymphocytic alveolitis, polymyositis, arthritis, uveitis and sicca syndrome. The manifestations of these different clinical outcomes may reflect an individual immune response to HTLV-I infection (Manns *et al*, 1999). HTLV-I infects, predominantly, T cells, mediating T cell proliferation and activation. High levels of cytokines are produced even in unstimulated cultures. This exacerbated Th1 type immune response, with production of pro-inflammatory cytokines and, or expansion of auto-reactive T-cells, are the possible mechanism for tissue damage in HTLV-I infection (Carvalho *et al*, 2001)). An association between HTLV-1 infection and infective dermatitis, a chronic and recurrent eczematous condition of children is well documented (LaGrenade *et al*, 1990; LaGrenade *et al*, 1995; Mahe *et al*, 2004; Primo *et al*, 2005).

Human periodontal disease (*i.e.*, gingivitis, periodontitis) result from heterogeneous etiologies including complex biofilm in the subgingival microenvironment, social and behavior modulations, and genetic or epigenetic traits of the host, each of which is influenced and/or modulated by the host's immune and inflammatory responses (Teng, 2003). The type of immune response that occurs in the periodontal lesion is vital in determining whether or not a protective outcome occurs (Gemmell *et al*, 2002). T-cells are the dominant cell type, and the cytokines they produce determine the nature of specific antibody production and the outcome of the disease (Gemmell *et al*, 1997). The Th1 cytokine IFN- γ is found in sites of delayed-type hypersensitivity (DTH) reactions (Tsicopoulos *et al*, 1992), and the developing gingival lesion has been shown to follow a pattern similar to that of a controlled DTH response (Seymour *et al*, 1988), suggestive of a Th1 response. IL-10, which is produced by both Th1 and Th2 cells in the human, plays a major role in suppressing immune and inflammatory responses and is a potent inhibitor of IL-1 production (De Waal Malefyt *et al*, 1993). It has been suggested that, the balance between the expression of Th1 and Th2 type cytokines and chemokines in a mixed inflammatory immune response is a relevant factor to the outcome of the disease (Teng 2002, Taubman & Kawai 2001, Ukai *et al* 2001, Garlet *et al* 2003).

Since the majority of periodontopathic bacteria reside in periodontal pockets and do not invade the periodontal tissues biofilm protected, the immune system can never efficiently eliminate the microorganisms. This unique situation leads to a chronic inflammation and continuous/excessive host responses, resulting in tissue destruction (Okada & Murakami, 1998). Active expression of catabolic cytokines and inflammatory mediators, acting alone or together to stimulate alveolar bone resorption and collagen destruction via tissue-derived matrix metalloproteinases (MMPs), a major pathway for the breakdown of bone and soft connective tissue associated with periodontal disease activity (Tervahala *et al*, 2000; Soell, 2002; Garlet 2004).

MMPs are a family of structurally related but genetically distinct enzymes that degrade extra cellular matrix (ECM) and basement membrane (BM) components. MMPs are involved in physiological processes such as tissue development, remodeling and wound healing (Uitto *et al*, 2003), and play important roles in the regulation of cellular communication, molecular shedding and immune functions (Sorsa *et al*, 2004). MMP activity is controlled by their endogenous inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs). The MMP/TIMP imbalance results in serious diseases, such as arthritis, and tumor growth and metastasis (Khuth, *et al*, 2001) and in virally induced neural damage seen in patients suffering from tropical spastic paraparesis/human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1)-associated myelopathy (TSP/HAM) and other viral neural damage (Khuth *et al*, 2001). One of the outcomes of periodontal disease is bone loss. Bone homeostasis and immune homeostasis are intimately linked and bone remodeling is regulated by many immune factors (Baker, 2000). The TNF family molecule RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) and its receptor, RANK have been recognized recently as key factors regulating osteoclast formation (Wong *et al*, 1997; Lacey *et al*, 1998; Crotti *et al*, 2003). RANKL is expressed by osteoblast/stromal cells, fibroblasts and activated T cells. Inflammatory cytokines, such as those present in crevicular fluid of patients with periodontitis, are reported to stimulate production RANKL (Crotti *et al*, 2003).

Osteoprotegerin (OPG), a soluble tumor necrosis factor (TNF) receptor-like molecule, is the naturally occurring inhibitor of osteoclast differentiation. OPG is produced by human periodontal ligament cells and like RANKL, is modulated by inflammatory cytokines present in periodontitis (Taubman & Kawai, 2001; Crotti *et al*, 2003). The ratio of RANKL/OPG is critically involved in regulating and directing osteoclastogenic and/or osteoblastogenic development (Theill *et al*, 2002).

Recent studies suggest that periodontal herpes viruses comprise an important source for triggering periodontal tissue destruction (Slots *et al*, 2003; Kamma *et al*, 2001; Saygun *et al*, 2004). Herpes virus productive infection may initiate or accelerates periodontal tissue destruction due to a virally mediated release of cytokines and chemokines from inflammatory and non-inflammatory host cells, or a virally induced impairment of the periodontal defense resulting in a heightened virulence of resident pathogenic bacteria (Saygun *et al*, 2004). Considering that in HTLV-1 there is an increase in pro-inflammatory cytokines, it is possible that the high frequency of periodontal disease in these patients may be due to the activated immune response.

To expand our knowledge of interaction between HTLV-1 and bacterial diseases, we evaluated the local inflammatory immune response in chronic periodontitis HTLV-1 seropositive individuals, measuring the mRNA expression encoding for IFN- γ , TNF- α , IL-10 as also the balance between MMPs/TIMPs and RANKL/OPG by quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) in comparison with different clinical forms of periodontal disease (*i.e.*, aggressive periodontitis and chronic periodontitis) and periodontally health HTLV-1 seronegative individuals. Herein, we showed that HTLV-1 may play a critical role in pathogenesis of periodontal disease, although further studies are needed to confirm our results.

Patients and methods

Study population and clinical examination

Patients were selected from individuals scheduled for treatment at multidisciplinary HTLV-1 clinic of the Hospital Universitário Professor Edgar Santos, Federal University of Bahia, and from the Department of Periodontics, University of Ribeirão Preto Dental School (UNAERP).

Twelve HTLV-1 seropositive patients (five women and seven men, ages 34 -79 years) with chronic periodontitis, twenty HTLV-1 seronegative patients (eleven women and nine men, ages - 46.25 ± 8.1 years) with chronic periodontitis, sixteen HTLV-1 seronegative patients (seven women and 9 men, ages - 26 ± 4.3) with aggressive periodontitis and ten HTLV-1 seronegative periodontally healthy individuals (six women and four men, ages - 28.5 ± 12.1) participated in the study. Diagnosis of HTLV-1 infection was confirmed by Western-blot assay (HTLV blot 2, 4, Genelabs, Singapore). Exclusion criteria comprised positive HIV testing, diagnosis of diabetes mellitus, evidence of HCV infection, habitual alcohol or drugs users, history of smoke more than one packet of cigarettes per week and use of antibacterial drugs. Inclusion criteria of HTLV-1 seronegative groups comprised partially or fully dentate patients, systemically healthy with no evidence of known systemic modifiers of PD (type 1 and 2 diabetes mellitus, osteoporosis, and medications known to influence periodontal tissues). Exclusion criteria comprised patients who did not give informed consent; patients with a significant medical history indicating evidence of known systemic modifiers of PD as described above; pregnant or lactating females; and patients who had taken systemic antibiotic, anti-inflammatory, hormonal or other assisted drug therapy in the last 2 years. Smokers were not specially excluded.

Patients and controls were submitted to anamnesis and to clinical, periodontal and radiographic examination. Prior to the beginning of the study, all subjects received supragingival prophylaxis to remove gross calculus and allow probing access. All teeth, with the exception of third molars were scored for probing depth and clinical attachment level, at six sites per tooth. Measurements were made scored for probing depth and clinical attachment level at six sites per tooth, mesiobuccal, buccal, distobuccal, distolingual, lingual and mesiolingual positions. Probing was carried out using a probe calibrated in millimeters by a single calibrated investigator. Dichotomous measurement of bleeding on probing (BOP) was performed at six sites per tooth.

The diseases periodontal patients were categorized according to the classification of the American Academy of Periodontology into control, AP or CP groups. CP HTLV-1 seropositive and CP HTLV-1 seronegative patients had moderate -to- advanced PD (at least 1 tooth per sextant with probing depth > 6 mm and attachment loss > 3 mm and radiographic evidence of extensive bone loss). AP HTLV-1 seronegative patients are characterized by the aggressive and typical alveolar bone loss localized at the firsts molars and incisors (localized AP), or aggressive and extensive generalized bone loss affecting at least three other than molars and incisors (generalized AP), evidence from dental history that the onset of disease occurred when they were less than 35 years old, with a high probing depth > 6 mm and attachment loss > 3 mm), and extensive radiographic evidence of bone loss.

All HTLV-1 seropositive and HTLV-1 seronegative patients were scheduled for periodontal treatment at the Department of Periodontics, Federal University of Bahia Dental School (FOUFBA), Brazil and at the Department of Periodontics, University of Ribeirão Preto Dental School (UNAERP), respectively.

After diagnostic phase, all patients received basic periodontal therapy; which consisted in oral hygiene instruction, scaling and root planning. Biopsies of gingival tissue (comprising junctional, gingival crevicular epithelium and connective gingival tissue) were obtained during surgical therapy of the sites that exhibited persistent BOP and that showed no improvement in clinical condition (i.e. higher probing depth) 3-4 weeks after the basic periodontal therapy. One sample of gingival tissue was obtained from each one of 12 HTLV-1 seropositive, 20 HTLV-1 seronegative CP and 16 HTLV-1 seronegative AP patients.

The control group was comprised of 10 subjects presenting clinical healthy gingival tissues (low scores of BOP – under 10% of the sites; no sites with probing depth > 3mm or presenting attachment loss) from whom biopsies of gingival tissue were taken during surgical procedures for wisdom teeth removal (all the sampled sites showed no BOP and probing depths < 3 mm). The clinical features of the groups are summarized in Table 1.

RNA extraction

Total RNA from gingival tissue biopsies was extracted using the TRIZOL reagent (Gibco BRL) (Life Technologies, Rockville, MD) according to the directions supplied by the manufacturer. Briefly, Trizol (1ml/mg tissue) was added to the biopsy, shaken for 30 seconds and incubated at room temperature for 5 minutes. To each ml of the suspension 0.2 ml of chloroform (Sigma) was added, vortexed and then centrifuged at 13000 rpm by 15 minutes for 4°C. The aqueous phase was transferred for a new tube, to which the same volume of isopropanol. The sample was vortexed, incubated by 20 minutes for -20°C, and centrifuged as described. The pellet was washed in 100% ethanol and dried at room temperature. RNA samples were resuspended in 50 µl of diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated water and stored at -70°C. The concentration of RNA was determined from the optical density at a wavelength of 260 nm, using the GeneQuant (Pharmacia, USA).

Real-time- PCR reactions

Complementary DNA (cDNA) was synthesized using 3 µg of RNA through a reverse transcription reaction (Superscript II, Gibco Life Tech). Polymerase chain reactions (PCRs) were then performed in a final volume of 50 µl containing 2.5 mM MgCl₂, 2.5 U of the enzyme Taq polymerase (GIBCO Life Technologies, Grand Island, NY, USA). and specific primers at 1 µM using the PTC-100 cyclor (MJ Research, Watertown, MA). Thermocycling conditions included 30 cycles of 1 minute at 94°C for denaturation, 1 minute at 54°C for annealing and extension for 2 minutes at 72°C, plus a step of final extension of 7 minutes at 72°C, as previously described (Yamazaki *et al*, 1997). Beta-actin mRNA detection was used as positive control. Negative controls without RNA and without reverse transcriptase were also performed. The amplification products of PCR were separated by 6% polyacrilamide gel electrophoresis, and visualized as bands by 0.2% silver nitrate staining. Table 1 shows the sequences of human primers were designed based on nucleotide sequences in the GenBank database.

PCR analysis

The amplification products of PCR were separated by 6% acrylamide gel electrophoresis and visualized as bands by 0.2% silver nitrate staining. The gels were then digitalized and band intensity was calculated using the Image Tool software (University of Texas Health Science Center, San Antonio). The detection threshold to determine positivity was set at 270 arbitrary units based on positive and negative controls. The relative amount of mRNA was calculated as its ratio to beta-actin, as described by Yamazaki *et al*, 1997.

Statistical tests

Statistical testing was performed with Chi-square analysis (SPSS 9.0 statistical package; SPSS Inc, Chicago, IL, USA) for the evaluation of differences between groups. Data are presented as means and standard deviations (SD). To access differences in the intensity of mRNA expression between control subjects and patients ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison test was done (GraphPad Prism 3.0 software; GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA). *p-values* less than 0.05 were considered statistically significant.

Results

Table 1 show that, in addition to more periodontal attachment loss, the CP HTLV-1 seropositive patients exhibited significantly more gingival inflammation than the AP, CP and controls HTLV-1 seronegative patients.

In order to evaluate the inflammatory response in periodontal tissue in HTLV-1 seropositive patients we first evaluated the expression of mRNA of pro-inflammatory and regulatory cytokines, IFN- γ , TNF- α and IL-10 respectively in comparison with different forms of PD and with HTLV-1 seronegative periodontally healthy subjects.

Cytokines mRNA expression

The results of the quantitative-PCR analyses showed that HTLV-1 seropositive patients manifest an exacerbated Th1 immune response with high levels of IFN- γ in gingival tissue similar to that observed in peripheral blood mononuclear cells (PBMC), although the absence of significant correlation between the immune response in PBMC. Moreover, the expression of IFN- γ was equally prevalent in the AP and CP HTLV-1 seronegative groups (Garlet *et al*, 2004) but more intense in CP HTLV-1 seropositive patients ($p < 0.001$) than that found in gingival tissues from AP, CP HTLV-1 seronegative patients and control subjects (Figure 1). The same results were observed regarding regulatory cytokine IL-10. However, the expression of TNF- α was higher in the AP and CP HTLV-1 seronegative patients when compared with the controls, it was not significant different between HTLV-1 seronegative and CP HTLV-1 seropositive patients.

Quantitative analysis of MMPs and TIMPs mRNA expression

After characterization of the response immune profile in HTLV-1 seropositive patients regarding periodontal diseases, we then analyzed the role of MMPs and TIMPs balance in the different clinical forms of PD (Garlet *et al*, 2004) in comparison with that seen in CP HTLV-1 seropositive patients.

Figure 2 showed that the expression of MMP2 and MMP9 in CP HTLV-1 seropositive patients follows the high distribution observed in IFN- γ expression in the same group. The expression of mRNA of MMP2 and MMP9 was higher in biopsies from CP HTLV-1 seropositive patients than in those from AP and CP HTLV-1 seronegative groups, although it did not reach statistical significance. MMPs were significantly different from all periodontal diseased groups studied and the control group. Conversely, analysis of the expression of TIMPs, showed that CP HTLV-1 seropositive patients presents the mRNA expression of TIMP1 more intense than that observed in controls, AP and CP HTLV-1 seronegative groups. In contrast, the expression of TIMP3 was less intense in CP HTLV-1 seropositive patients than in CP HTLV-1 seronegative patients and near to that observed in AP patients ($p > 0.05$), leading us to suppose that HTLV-1 contribute to a more aggressive form of periodontal disease.

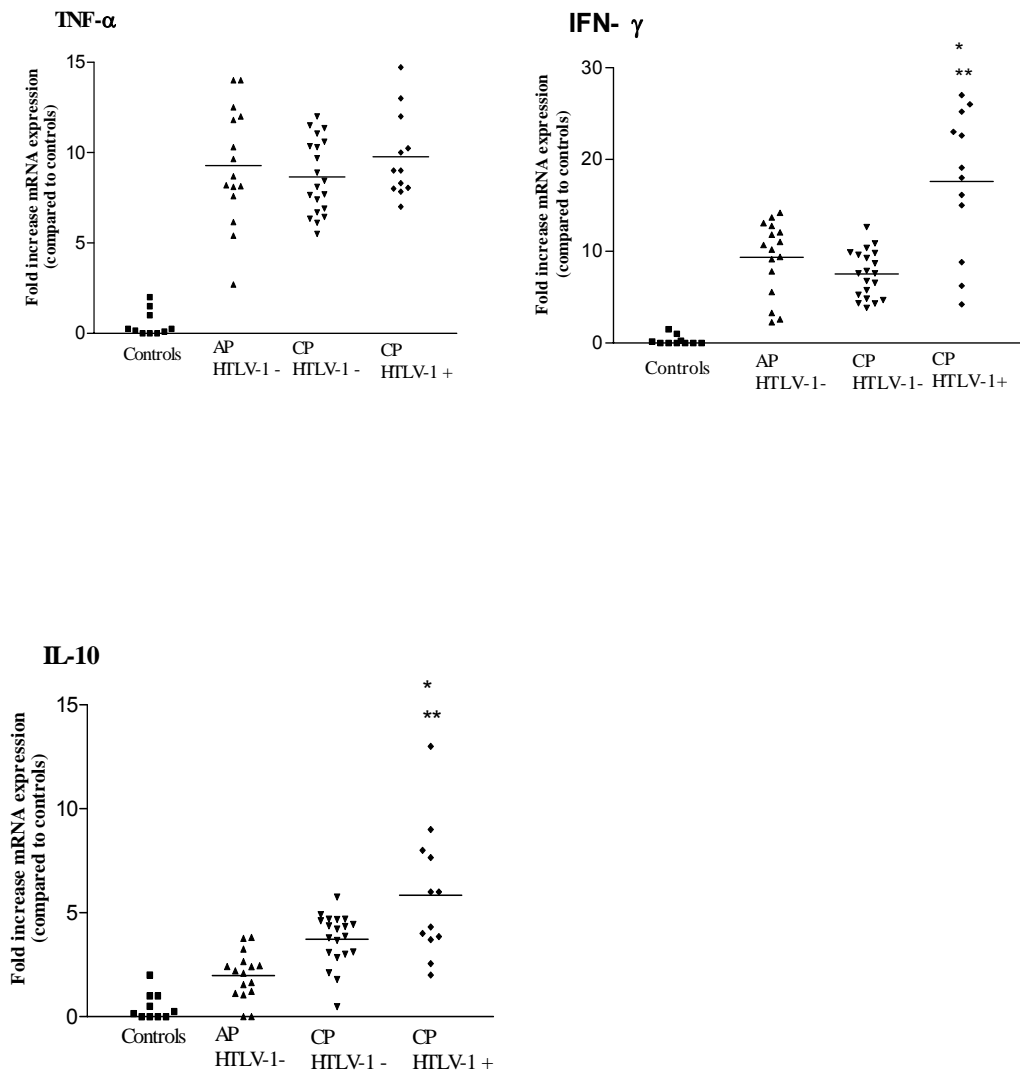
Quantitative analysis of expression of mRNA for osteoclast factors RANKL and OPG

We next asked if the expression of the osteoclastogenic factor RANKL and its antagonist, OPG, in CP HTLV-1 seropositive patients follows the same intensity showed by periodontally diseased HTLV-1 seronegative patients. It was observed that healthy controls shown low expression of RANKL and OPG compared with diseased groups ($p < 0.05$). Regardless of clinical groups, HTLV-1 seropositive patients presented expression of RANKL and OPG similar to that observed in periodontal diseased seronegative groups.

Table 1. Clinical features of the control, AP HTLV-I seronegative, CP HTLV-I seropositive and seronegative groups (mean \pm SD)

	Control	AP HTLV-	CP HTLV-1-	CP HTLV-1+
distribution	(10) 6f/4m	(16) 7f/9m	(20) 11f/9m	(12) 5f/7m
age	28.5 \pm 12.11	26 \pm 4.32	46 \pm 8.09	51 \pm 12
probing depth (mean)	1.92 \pm 0.65	3.55 \pm 1.37	3.38 \pm 1.81	2.8 \pm 1.2
probing depth (sampled site)	1.74 \pm 0.55	7.15 \pm 0.89	6.05 \pm 1.27	6.0 \pm 1.8
attachment loss (sampled site)	0	3.80 \pm 1.62	3.6 \pm 1.35	4.4 \pm 1.8
% BOP sites (mean)	4.92 \pm 3.38	52.41 \pm 12.6	57.17 \pm 10.9	100
% BOP sites (sampled sites)	0	100	100	100

AP, aggressive periodontitis; f, female; m, male; CP, chronic periodontitis; BOP, bleeding on probing.



*Fig. 1. Quantitative expression of TNF- α , IFN- γ and IL-10 in periodontal healthy, HTLV-1 seronegative controls subjects, aggressive periodontitis (AP) HTLV-1 seronegative, chronic periodontitis (CP) HTLV-1 seronegative and chronic periodontitis (CP) HTLV-1 seropositive patients. Total RNA was extracted, and levels of TNF- α , IFN- γ and IL-10 mRNA were measured quantitatively by the real-time-PCR SYBR- Green System. The results are presented as the fold increase of expression of the individual mRNAs, with normalization to β -actin, when compared with the target-internal control of normal subjects, using the cycle threshold (Ct) method. The results shown are from one experiment representative of three. All controls, except for IL-10 were significantly different from the AP and CP HTLV-1 seropositive and seronegative patients. Statistical significance comparing AP (**) and CP (*) HTLV-1- versus CP HTLV-1+ patients.*

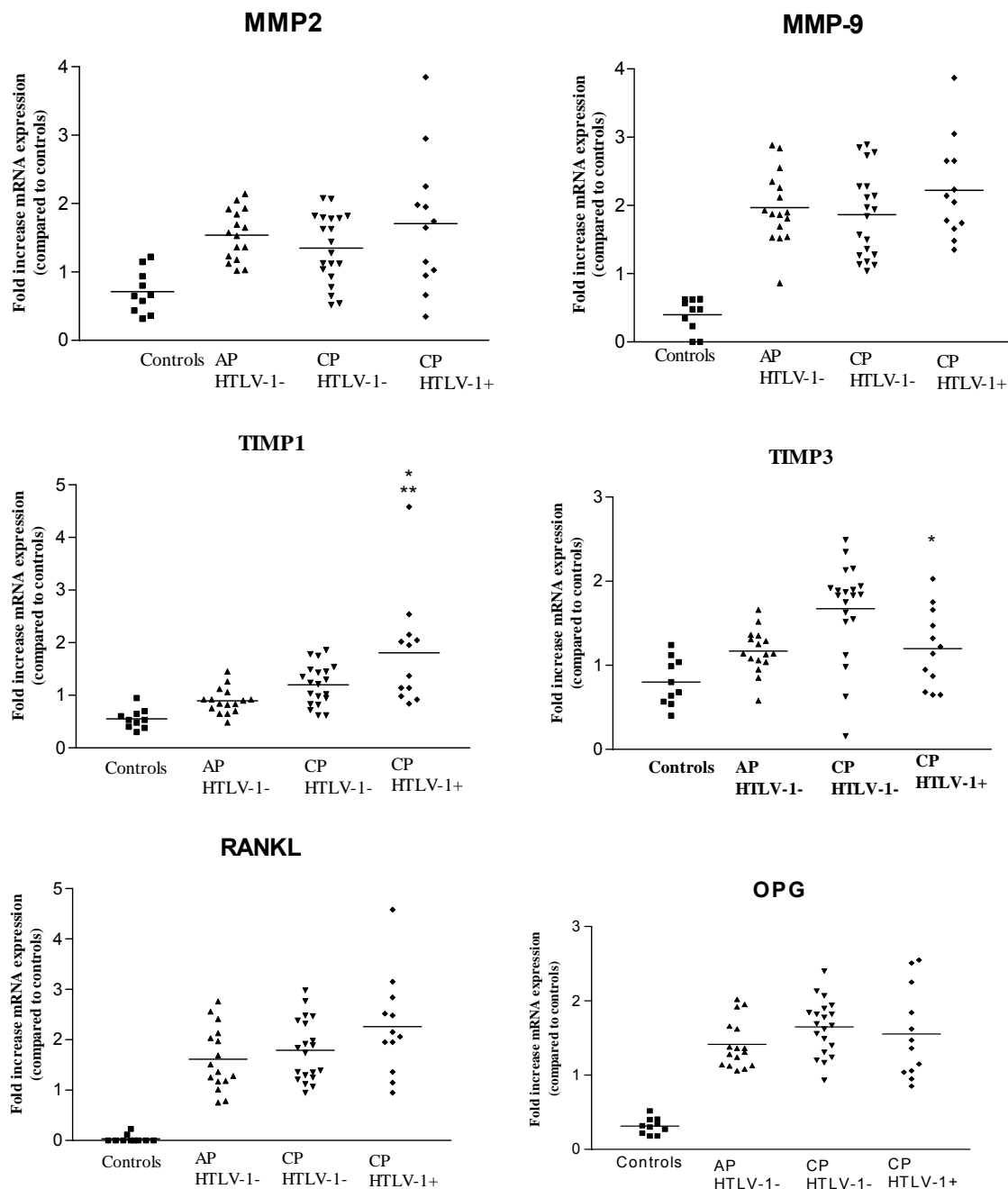


Fig.2. Quantitative expression of matrix metalloproteinases (MMPs), tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs), receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) in periodontal healthy, HTLV-1 seronegative controls subjects, aggressive periodontitis (AP) HTLV-1 seronegative, chronic periodontitis (CP) HTLV-1 seronegative and chronic periodontitis (CP) HTLV-1 seropositive patients. Total RNA was extracted, and levels of MMPs, TIMPs, and OPG mRNA were measured quantitatively by the real-time-PCR SYBR- Green System. The results are presented as the fold increase of expression of the individual mRNAs, with normalization to β -actin, when compared with the target-internal control of control subjects using the cycle threshold (Ct) method. The results shown are from one experiment representative of three. All controls, except for TIMP1 and TIMP3 were significantly different from the AP and CP HTLV-1 seropositive and seronegative patients. Statistical significance comparing AP (**) and CP (*) HTLV-1- versus CP HTLV-1+ patients.

Discussion

HTLV-1 infection is characterized by spontaneous T-cell proliferation with increasing secretion of interleukin (IL)-2 and expression of the IL-2 receptor (Popovic *et al*, 1984; Kramer *et al*, 1989; Tandler *et al*, 1990). HTLV-1 asymptomatic carriers secrete high levels of Th1 and Th2 cytokines such as IFN- γ , TNF- α , IL-5 and IL-10 compared with cells from blood donors with negative serology for HTLV-1 (Carvalho *et al*, 2001).

This study supports our hypothesis that HTLV-1 infection contribute to the severity of periodontal disease. The HTLV-1 seropositive patients present attachment loss, and gingival inflammation comparable with that observed in aggressive periodontitis. However they present simultaneously characteristics of chronic periodontitis. Indeed in our sample, edentulation was more expressive in CP HTLV-1 seropositive patients than in PD HTLV-1 seronegative groups.

In this study using real-time PCR to evaluate the expression of the cytokines IFN- γ , TNF- α and IL-10 in diseased tissues, we found that, cytokine expression in gingival tissue from HTLV-1 seropositive patients with chronic periodontitis shows similar patterns of that exacerbated inflammatory immune response seen in PBMC in HTLV-1 infection, with high levels of IFN- γ , TNF- α and IL-10 (Carvalho *et al*, 2001, Braga-Santos *et al*, 2004) although it did not reach significant correlation. The expression of IFN- γ and IL-10 in CP HTLV-1 seropositive patients was more intense than in AP, CP HTLV-1 seronegative patients and controls subjects, while expression of TNF- α was similar in both AP and CP groups.

Therefore, the expression of cytokines in periodontal HTLV-1 seronegative groups was significantly different from control group, as observed by previous studies (Okada *et al*, 1996, Kinane & Lappin, 2001, Gemmel & Seymour, 2001, Garlet *et al*, 2004).

In view that exacerbated immune response presented by HTLV-1 infection in gingival tissues of CP HTLV-1 infected patients; we then evaluated the expression of MMPs and TIMPs in the same group of patients.

There is significant evidence to show that collagenases, along with other MMPs, play an important role in the periodontal destruction (Sorsa *et al*, 2004). Increased expression of MMPs in diseased periodontal tissues thought to account for the destruction of soft and even bone that results in some of the clinical symptoms of PD (Birkedal-Hansen, 1993, Aiba *et al*, 1996, Ingman *et al*, 1996, Garlet *et al*, 2004).

Despite the lack of significance in expression of MMPs in HTLV-1 seropositive patients in comparison with AP and CP HTLV-1 seronegative groups, we can observe that MMPs, as the cytokines expression, are up regulated in HTLV-1 seropositive patients. Surprisingly, the expression of TIMP-1 was higher in CP HTLV-1 than in HTLV-1 seronegative groups, while, TIMP3 was down regulate in HTLV-1 seropositive patients. The anti-inflammatory cytokine IL-10 up-regulate TIMP-1 expression whereas pro-inflammatory cytokines, like IFN- γ , up-regulate MMP-3, MMP-9, and TIMP-3 expression (Khuth *et al*, 2001). Indeed, the data indicate that T lymphocytes activated by persistent viral infection

may disturb the concerted expression of MMPs and TIMPs in gingival tissues similarly with that occurring in neural cells in patients with HAM/TSP (Giraudon *et al*, 2000).

The imbalance of TIMPs over MMPs resulting in periodontal destruction is controversial. The significant decreases in TIMP -1 and TIMP-2 levels in diseased samples (Soell *et al*, 2002) is in conflict from other studies that found an increase of TIMP levels in gingival crevicular fluid samples from localized juvenile periodontitis affected patients when compared with adult periodontitis-affected or control patients (Ingman *et al*, 1994). However, the enhanced levels of TIMPs observed in healthy sites (Soell *et al*, 2002) support the hypothesis that tissue destruction resulted from an imbalance of MMPs over TIMPs due both to an increase in MMP levels and to a decrease in TIMP levels (Soell *et al*, 2002). Moreover, it also evident those TIMPs are not sufficient to down-regulate the pathologically elevated MMPs (Ingman *et al*, 1996). The possibility of selective MMP inhibition by synthetic inhibitors as a method to avoid or limit the periodontal tissue destruction was advanced (Sorsa *et al*, 2004).

In addition to the destruction of ECM by MMPs, the alveolar bone resorption driven by osteoclasts is another key feature of PD (Garlet *et al*, 2004). Previous studies have shown that OPG, RANK-L, and RANK interaction forms an intricate regulatory triad in osteoporosis and osteolytic diseases such as arthritis, periodontal diseases, tumor-associated bone metastasis (Teng *et al*, 2000). The change in the levels of these key regulators of osteoclast differentiation may play a major role in the bone loss seen in periodontitis (Crotti *et al*, 2003). In the present study the expression of RANKL and OPG was more intense in patients with AP and CP HTLV seronegative and in CP HTLV-1 seropositive patients than in control subjects.

These results suggest that HTLV-1 play a role in severity of inflammatory responses and/or periodontal tissue destruction. However, the establishment of HTLV-1 as a modifier of local immune response of periodontitis will require intensive studies in a large sample of patients, the knowledge of periodontal history of HTLV-1 patients, longitudinal studies to identify refractory periodontitis and the demonstration of viral infection as an agent of periodontal breakdown. Indeed, increasing evidence suggests that HTLV-I infection may be associated with immunosuppression and, as a consequence, affect the risk and expression of several other infectious diseases, of which the best studied are strongyloidiasis, tuberculosis, and leprosy (Lechat *et al*, 1997; Verdier *et al*, 1990; Tachibana *et al*, 1988; Pedral-Sampaio *et al*, 1997; Porto *et al*, 2001a; Porto *et al*, 2004b).

In tuberculosis, a decrease in delayed-type hypersensitivity to *Mycobacterium tuberculosis* has been established (Tachibana *et al*, 1988), and the clinical course of tuberculosis in HTLV-1 infected individuals was worse than in seronegative controls (Pedral-Sampaio *et al*, 1997; Marinho *et al*, 2005). In summary, our results show that infection by HTLV-1 presents an exacerbated inflammatory immune response in diseased periodontal tissues with consequently up regulation of pro-inflammatory and immunomodulatory cytokines, with high levels of IFN- γ and IL-10, suggesting a critical role for HTLV-1 in pathogenesis of periodontal disease.

REFERENCES

1. Aiba, T., Akeno, N., Kawane, T., Okamoto, H. and Horiuchi, N., *Eur J Oral Sci* **104**, 562-9, 1996.
2. Birkedal-Hansen, H., *J Periodontal Res* **28**, 500-10, 1993.
3. Brites, C., Harrington, W., Jr., Pedroso, C., Martins Netto, E. and Badaro, R., *Braz J Infect Dis* **1**, 42-47, 1997.
4. Brites, C., Weyll, M., Pedroso, C. and Badaro, R., *Aids* **16**, 1292-3, 2002.
5. Carvalho, E. M., Bacellar, O., Porto, A. F., Braga, S., Galvão-Castro, B. and Neva, F., *J Acquir Immune Defic Syndr* **27**, 1-6, 2001.
6. Crotti, T., Smith, M. D., Hirsch, R., Soukoulis, S., Weedon, H., Capone, M., Ahern, M. J. and Haynes, D., *J Periodontal Res* **38**, 380-7, 2003.
7. Fujihashi, K., Yamamoto, M., Hiroi, T., Bamberg, T. V., McGhee, J. R. and Kiyono, H., *Clin Exp Immunol* **103**, 422-8, 1996.
8. Garlet, G. P., Martins, W., Jr., Ferreira, B. R., Milanezi, C. M. and Silva, J. S., *J Periodontal Res* **38**, 210-7, 2003.
9. Garlet, G. P., Martins, W., Jr., Fonseca, B. A., Ferreira, B. R. and Silva, J. S., *J Clin Periodontol* **31**, 671-9, 2004.
10. Gemmell, E., Carter, C. L., Grieco, D. A., Sugerman, P. B. and Seymour, G. J., *J Dent Res* **81**, 303-7, 2002.
11. Gemmell, E., Marshall, R. I. and Seymour, G. J., *Periodontol 2000* **14**, 112-43, 1997.
12. Giraudon, P., Szymocha, R., Buart, S., Bernard, A., Cartier, L., Belin, M. F. and Akaoka, H., *J Immunol* **164**, 2718-27, 2000.
13. Ingman, T., Sorsa, T., Michaelis, J. and Konttinen, Y. T., *Ann N Y Acad Sci* **732**, 459-61, 1994.
14. Ingman, T., Tervahartiala, T., Ding, Y., Tschesche, H., Haerian, A., Kinane, D. F., Konttinen, Y. T. and Sorsa, T., *J Clin Periodontol* **23**, 1127-32, 1996.
15. Kinane, D. F. and Lappin, D. F., *Acta Odontol Scand* **59**, 154-60, 2001.
16. Lappin, D. F., MacLeod, C. P., Kerr, A., Mitchell, T. and Kinane, D. F., *Clin Exp Immunol* **123**, 294-300, 2001.
17. Lechat, M. F., Shrager, D. I., Declercq, E., Bertrand, F., Blattner, W. A. and Blumberg, B. S., *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **15**, 387-90, 1997.
18. Marinho, J., Galvão-Castro, B., Rodrigues, L. C. and Barreto, M. L., *J Acquir Immune Defic Syndr* **40**, 625-8, 2005.
19. Okada, H. and Murakami, S., *Crit Rev Oral Biol Med* **9**, 248-66, 1998.
20. Okada, H., Murakami, S., Kitamura, M., Nozaki, T., Kusumoto, Y., Hirano, H., Shimauchi, H., Shimabukuro, Y. and Saho, T., *Oral Dis* **2**, 87-95, 1996.
21. Pedral-Sampaio, D. B., Martins Netto, E., Pedrosa, C., Brites, C., Duarte, M. and Harrington, W., Jr., *Braz J Infect Dis* **1**, 31-35, 1997.
22. Santos, S. B., Porto, A. F., Muniz, A. L., de Jesus, A. R., Magalhaes, E., Melo, A., Dutra, W. O., Gollob, K. J. and Carvalho, E. M., *BMC Infect Dis* **4**, 7, 2004.

23. Seymour, G. J. and Gemmell, E., *Acta Odontol Scand* **59**, 167-73, 2001.
24. Seymour, G. J., Gemmell, E., Walsh, L. J. and Powell, R. N., *Clin Exp Immunol* **71**, 132-7, 1988.
25. Soell, M., Elkaim, R. and Tenenbaum, H., *J Dent Res* **81**, 174-8, 2002.
26. Sorsa, T., Tjaderhane, L. and Salo, T., *Oral Dis* **10**, 311-8, 2004.
27. Tachibana, N., Okayama, A., Ishizaki, J., Yokota, T., Shishime, E., Murai, K., Shioiri, S., Tsuda, K., Essex, M. and Mueller, N., *Int J Cancer* **42**, 829-31, 1988.
28. Taubman, M. A. and Kawai, T., *Crit Rev Oral Biol Med* **12**, 125-35, 2001.
29. Teng, Y. T., *Infect Immun* **70**, 5269-73, 2002.
30. Teng, Y. T., Nguyen, H., Gao, X., Kong, Y. Y., Gorczynski, R. M., Singh, B., Ellen, R. P. and Penninger, J. M., *J Clin Invest* **106**, R59-67, 2000.
31. Uitto, V. J., Overall, C. M. and McCulloch, C., *Periodontol 2000* **31**, 77-104, 2003.
32. Ukai, T., Mori, Y., Onoyama, M. and Hara, Y., *Arch Oral Biol* **46**, 901-8, 2001.
33. Verdier, M., Denis, F., Sangare, A., Leonard, G., Sassou-Guesseau, E., Gaye, A., al-Qubati, Y., Rey, J. L., N'Gaporo, I., Doua, F. and et al., *J Infect Dis* **161**, 1309-10, 1990.
34. Yamazaki K, Nakajima T, Kubota Y et al. Cytokine messenger RNA expression in chronic inflammatory periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol* 1997;12: 281–287.

4. DISCUSSÃO GERAL

O HTLV-1 está associado à ATLL, uma doença maligna agressiva dos linfócitos T CD4+, e à HAM/TSP, uma doença neurológica crônica progressiva. Outras destas manifestações clínicas têm sido também associadas com a infecção pelo HTLV-1, como uveíte, alveolite linfocítica, síndrome de Sjögren, dermatite infectiva, alterações do trato urinário, disfunção erétil e poli-artropatia. Até o momento, não tem sido dada ênfase ao comprometimento oral na infecção causada por esse vírus.

A resposta imune ao HTLV-1 é caracterizada pela proliferação espontânea de células T com aumento de IL-2 e expressão do receptor de IL-2. Várias anormalidades na resposta imune têm sido descritas em pacientes com HAM/TSP; a característica mais marcante da resposta imune celular nestes pacientes é o aumento do número de células T citotóxicas contra a proteína Tax e a produção de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e TNF- α (Jacobson, Shida *et al.*, 1990). Distúrbios na regulação imune podem estar associados com a patogênese de doenças neurológicas (Jacobson, Shida *et al.*, 1990; Jacobson, 2002), como também de doenças inflamatórias associadas ao HTLV-1.

Alterações da resposta imune mediadas pelas células T têm sido associadas à patologia oral e à síndrome de Sjögren, que tem como consequência a diminuição de saliva e também pode aumentar a susceptibilidade para problemas odontológicos. Por essas razões, é importante que seja determinado se a infecção pelo HTLV-1 pode ter como consequência doenças orais.

No presente trabalho, foram avaliadas as freqüências de doenças orais em indivíduos HTLV-1 soropositivos, a atividade funcional das glândulas salivares destes pacientes e sua relação com a resposta imune sistêmica, como também a

resposta imune *in situ* em pacientes com periodontite crônica infectados pelo HTLV-1. Estes achados foram comparados com os observados em controles HTLV-1 soronegativos com e sem periodontite. Este estudo resultou na elaboração de 3 manuscritos enviados para publicação: **Saúde oral em indivíduos infectados pelo HTLV-1; Hipofunção das glândulas salivares em indivíduos infectados pelo HTLV-1; Aumento da expressão de citocinas no tecido gengival de pacientes com periodontite e HTLV-1.**

O primeiro manuscrito teve por objetivo descrever as alterações clínicas orais mais frequentemente observadas nos indivíduos infectados pelo HTLV-1, bem como verificar a existência de síndrome seca em comparação com um grupo controle formado por doadores de sangue HTLV-1 soronegativos, pareados por sexo e idade, procedendo-se a ajustamentos para possíveis variáveis de confusão e/ou modificadoras de efeito. A regressão logística condicional foi a técnica de eleição para a análise dos dados, mantendo-se o pareamento inicial do estudo. Assim sendo, escolheu-se como variável de confusão principal a qualidade da higiene oral, tendo em vista que as doenças infecciosas bucais mais prevalentes, como cárie e doença periodontal, estão diretamente associadas à má higiene oral, definida com base nos índices de placa bacteriana e de cálculo dental. Outros prováveis fatores de confusão, como uso de medicações anticolinérgicas e fumo, foram excluídos desde o desenho inicial do estudo.

As alterações clínicas significativas nos indivíduos HTLV-1 soropositivos obtidas na análise logística univariada bruta foram boca seca, gengivite, periodontite, mobilidade dental e estomatite por dentadura. Em relação à síndrome seca, xeroftalmia constituiu um dado marcante, enquanto xerostomia não teve diferença significativa entre os grupos. Não houve diferença entre história de episódios

recorrentes de herpes simples e de lesões aftosas. É importante ressaltar que a significância das *odds ratios* obtidas na análise bruta foi mantida na análise multivariada, revelando que a secura da mucosa oral objetivada clinicamente é um importante achado na infecção pelo HTLV-1. Esses dados confirmam a sialadenite crônica como a mais importante alteração da saúde oral nos indivíduos infectados. A preferência do HTLV-1 pelas glândulas exócrinas tem o antecedente clínico de sua presença nas glândulas mamárias, origem e fonte da transmissão do vírus através da lactação. Observou-se em estudos experimentais que o HTLV-1 é capaz de infectar as glândulas mamárias. A glândula infectada representa a possibilidade de um reservatório para o vírus, feito que permite sua transmissão por mulheres grávidas, portadoras sãs (Cartier e Ramirez, 2005).

Semelhante aos dados demonstrados nessa amostra de indivíduos HTLV-1 soropositivos, a xeroftalmia é descrita na síndrome de Sjögren secundária à artrite reumatóide como uma alteração clínica mais prevalente do que a xerostomia e com patogênese diferente desta (Uhlig, Kvien *et al.*, 1999; Fox, 2005), ao passo que a xerostomia pode ser de origem não-salivar, e decorrer de desidratação, de alteração cognitiva, de disfunção sensorial oral e de fatores psicológicos (Fox, 1996).

Uma das primeiras avaliações da sintomatologia ocular associada ao HTLV-1 foi feita por Cartier e colaboradores (1995), e por Merle e colaboradores (1999), em séries de pacientes com HAM/TSP e ceratoconjuntivite seca. Caracterizou-se a sintomatologia ocular como moderada, causando pouca invalidez ocular, e com início dos sintomas difíceis de precisar. Em ambos os casos, os sintomas oculares foram acompanhados de infiltração linfoplasmocitária das glândulas salivares labiais e, em 80% dos casos, correspondiam aos graus 3 e 4 da classificação de Chisholm e Mason (1973). Além da inflamação das glândulas salivares, foi encontrada

alveolite linfocitária na maioria dos pacientes avaliados. Outras manifestações sistêmicas podem vir associadas à síndrome seca, em particular, uveíte, manifestações articulares e tireoidianas. Esta sintomatologia é compatível com o diagnóstico de síndrome de Sjögren, porém a pesquisa de auto-anticorpos dirigidos contra as proteínas salivares Ro e La (Anti-SSa e Anti-SS-B) não foi demonstrada. Esses resultados sugerem que o HTLV-1 pode induzir inflamação das glândulas salivares e lacrimais com repercussão funcional (Merle, Cabre *et al.*, 1999; Merle, Cabre *et al.*, 2002). Neste contexto, a doença inflamatória das glândulas exócrinas, do globo ocular, dos pulmões dos músculos e das articulações, representaria diferentes modalidades da expressão de uma doença sistêmica induzida pelo HTLV-1.

O segundo componente da síndrome seca, a xerostomia ou queixa de secura bucal, pode não refletir o estado atual e/ou a capacidade funcional das glândulas salivares (Fox, Busch *et al.*, 1987; Field, Longman *et al.*, 1997). Nem sempre a queixa de secura bucal resulta no diagnóstico de hipofunção das glândulas salivares, uma vez que alguns indivíduos com fluxo salivar muito baixo não se queixam de secura bucal, ao contrário de outros que, tendo salivação copiosa, apresentam a sensação de secura bucal (Field, Longman *et al.*, 1997). Por essa razão, exames subjetivos isolados não são adequados para firmarem-se diagnósticos ou para propósitos terapêuticos (Fox, Busch *et al.*, 1987). Existem pouquíssimos trabalhos na literatura que avaliaram fluxo salivar em indivíduos infectados pelo HTLV-1 e, salvo erro, este é o primeiro trabalho que faz uma avaliação clínica minuciosa dos tecidos intra e extra-orais, incluindo glândulas salivares maiores (dados não mostrados), complementada, quando necessário, por ultra-som e por sialometria, através do teste de Saxon.

A saliva exerce um papel crucial na manutenção e na preservação do conforto e da saúde oral (Bergdahl, 2000). A hipossalivação, que pode ser compatível com excelente saúde oral (Ship, Patton *et al.*, 1991), é apontada como fator de risco para cárie dental e para infecções oportunistas na cavidade oral (Hillman, 1996; Samaranayake, Samaranayake *et al.*, 2001; Pedersen, Bardow *et al.*, 2005). Apesar de não haver diferença entre os usuários de prótese removível nos dois grupos, a frequência de estomatite por dentadura foi maior nos casos do que nos controles. Esta condição tem sido associada ao uso de prótese, mas também à co-infecção com *Candida albicans*. Adicionalmente, alguns pacientes com hipossalivação apresentaram candidíase eritematosa crônica confirmada pelo exame micológico. As lesões eram localizadas no dorso da língua, eritematosas e bem circunscritas. Todos os casos foram tratados com terapia anti-fúngica.

Ao contrário do esperado, uma vez que a diminuição do fluxo salivar favorece o crescimento de microrganismos acidofílicos, como o *Streptococcus mutans* e espécies de *Lactobacillus*, a prevalência de cárie dental foi semelhante entre os casos e os controles. Quando o fluxo salivar está diminuído, as concentrações de bicarbonato, o pH, a capacidade tampão e a eliminação (*clearence*) de microrganismos e de açúcares da dieta geralmente caem, promovendo, dessa forma, um meio ambiente dominado por microrganismos orais patogênicos e prolongando a exposição dos dentes aos açúcares da dieta (Pedersen, Bardow *et al.*, 2005). A cárie dental é uma doença multifatorial, e ocorre como resultado de uma ação conjunta entre fator etiológico, a placa bacteriana, e fatores determinantes que incluem: fatores salivares, medicações, doenças sistêmicas e fatores comportamentais (Fejerskov, 1997). Talvez o fato de não ter sido contado o número

de dentes cariados perdidos e obturados justifique essa semelhança entre as duas populações no que diz respeito à cárie dental.

Um achado importante demonstrado neste estudo foi a associação do HTLV-1 com doença periodontal. A primeira pergunta decorrente desse achado é se as alterações clínicas encontradas no periodonto deviam-se à hipossalivação ou se havia uma relação com a resposta imune exacerbada provocada pelo HTLV-1. Relatos na literatura apontam para uma indefinição relacionada com a doença periodontal e o déficit salivar associado ou não com síndrome de Sjögren (Boutsi, Paikos *et al.*, 2000; Pedersen, Bardow *et al.*, 2005). Nessa população de indivíduos HTLV-1 soropositivos, a doença periodontal não estava associada com hipossalivação. Clinicamente, a doença periodontal foi classificada nos indivíduos HTLV-1 soropositivos de acordo com os critérios da Associação Americana de Periodontia em gengivite associada à placa bacteriana e em periodontite crônica (1999 International International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions. Papers. Oak Brook, Illinois, October 30-November 2, 1999, 1999).

Existem evidências de que indivíduos cronicamente infectados com o HTLV-1 apresentam uma maior susceptibilidade à infecção, tanto por bactérias, como por ácaros e helmintos (Goon e Bangham, 2004). Os trabalhos de PORTO e colaboradores (Porto, Neva *et al.*, 2001) sobre co-infecção de HTLV-1 com *Strongiloides stercoralis* mostram que indivíduos infectados pelo HTLV-1 apresentam formas recidivantes de estrogiloidíase, assim como o aumento da carga parasitária. Adicionalmente, a co-infecção pelo HTLV-1 diminui a eficácia terapêutica do tiabendazol, albendazol, e ivermectina, drogas indicadas no tratamento da estrogiloidíase (Porto, Santos *et al.*, 2005). Foi também

documentado que a diminuição da resposta Th2 a antígenos de *S. stercoralis* constitui a base para o aparecimento de estrogiloidíase grave em pacientes infectados pelo HTLV-1. Semelhante às observações feitas com o *S. stercoralis*, um estudo prévio mostrou uma maior prevalência da infecção pelo *S. mansoni* e também uma diminuição da eficácia de drogas esquistossomóticas em pacientes infectados pelo HTLV-1 (Porto, Santos *et al.*, 2004).

É também conhecida a associação da infecção pelo HTLV-1 com a sarna norueguesa, uma doença causada pelo ácaro *Sarcoptes scabiei* (Brites, Weyll *et al.*, 2002). Com relação à co-infecção com micobactérias, foi documentada uma diminuição da reação de hipersensibilidade tardia ao PPD em indivíduos HTLV-1 soropositivos (Tachibana, Okayama *et al.*, 1988). Do ponto de vista clínico, um estudo realizado na cidade de Salvador, Bahia, documentou que indivíduos co-infectados com HTLV-1 e *Mycobacterium tuberculosis* apresentaram maior taxa de mortalidade e de prevalência de soropositividade ao HTLV-1 em indivíduos com tuberculose do que os indivíduos infectados pelo *M. tuberculosis* sem infecção pelo HTLV-1 (Pedral-Sampaio, Martins Netto *et al.*, 1997; Marinho, Galvão-Castro *et al.*, 2005). Documentou-se igualmente uma maior prevalência de *Mycobacterium leprae* e maior mortalidade por Hanseníase nos indivíduos infectados pelo HTLV-1 (Modlin e Bloom, 1993). Estes dados suportam a hipótese de que o HTLV-1 interfere na resposta imune dirigida contra infecções bacterianas e parasitárias, ocasionando maior gravidade e /ou maior prevalência dessas doenças nos indivíduos infectados.

No Brasil, (Lenzi, Cuzzi-Maya *et al.*, 2003) compararam a freqüência de manifestações cutâneas apresentadas por pacientes com HAM/TSP, com aquelas observadas em doadores de sangue soronegativos e mostraram que xerodermia, candidíase cutânea e eritema palmar foram significativamente mais comuns nos

pacientes com HAM/TSP. Dermatofitose, dermatite seborréica, molusco contagioso e erisipela bolhosa de repetição foram igualmente descritas nos referidos pacientes. Adicionalmente, existem relatos de infecção por Herpes zoster em 2 de 15 pacientes infectados pelo HTLV-1 (Nobre, Guedes *et al.*, 2005).

No presente estudo, gengivite e periodontite crônica foram mais freqüentes em indivíduos infectados pelo HTLV-1 e estudos posteriores serão necessários para determinar se a infecção pelo HTLV-1 aumenta a susceptibilidade à infecção por *Dialister pneumosintes*, *Bacteroides forsythus*, *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Tannerella forsythia*, bactérias associadas à periodontite humana.

Simultaneamente à avaliação clínica oral dos indivíduos infectados comparados com doadores de sangue não infectados, foi realizada uma avaliação da função das glândulas salivares através da sialometria, desta vez comparando-se indivíduos HTLV-1 soropositivos com HAM/TSP, portadores de HTLV-1 e indivíduos HTLV-1 soronegativos.

A síndrome de Sjögren, conjunto de manifestações descritas em 1933 (Sjögren, 1933), foi amplamente associada à infecção pelo HTLV-1 (Eguchi, Matsuoka *et al.*, 1992; Mariette, Agbalika *et al.*, 1993; Terada, Katamine *et al.*, 1994). Sua prevalência varia de 0,5 a 2,7% na população geral. A afecção das glândulas salivares tem por consequência uma diminuição do fluxo salivar. Quando a redução do fluxo é intensa, provoca sensações subjetivas penosas e manifestações objetivas fáceis de serem identificadas.

Os resultados deste estudo baseados na anamnese, no exame clínico oral e na sialometria, indicam que os indivíduos com HAM/TSP apresentam maior prevalência de hipossalivação do que os portadores de HTLV-1. Paralelamente, os

resultados da avaliação oftalmológica, através dos testes de Schirmer e Rosa-Bengala, realizada em 10 indivíduos com xeroftalmia, mostraram que 9 dentre os 10 indivíduos examinados apresentaram ceratoconjuntivite seca. Estes resultados sugerem que o envolvimento das glândulas salivares e lacrimais nos indivíduos HTLV-1 soropositivos, resultando em redução das secreções salivares e lacrimais, seja caracterizado como síndrome seca associada ao HTLV-1 para diferir da síndrome de Sjögren idiopática. Estes dados são suportados pelo trabalho de Martinelli (2004), que demonstrou a ausência de auto-anticorpos Anti-SS-A e Anti-SS-B, bem como a ausência de Fator Reumatóide (FR) e anticorpos Anti-Núcleo (ANA) em nossa coorte de indivíduos HTLV-1 soropositivos. Por outro lado, o novo consenso internacional para o diagnóstico da síndrome de Sjögren requer a presença de sinais objetivos e sintomas de secura, incluindo o aspecto característico de amostras de biópsia de glândulas salivares labiais ou auto-anticorpos, como o Anti-SS-A. Segundo dados adicionados a esses novos critérios internacionais, as infecções pelos Vírus HIV, HCV e HTLV-1 foram considerados como fatores de exclusão para o diagnóstico da síndrome de Sjögren (Fox, 2005).

A preferência do gene Tax pelas glândulas exócrinas foi evidenciada em um estudo experimental com camundongos transgênicos carregando o gene Tax do HTLV-1. Estes animais desenvolveram uma exocrinopatia semelhante à síndrome de Sjögren humana, nos quais as células glandulares expressavam Tax e onde havia danos aos ácinos glandulares (Green, Hinrichs *et al.*, 1989). Relatos da expressão do Tax nas glândulas salivares labiais de subpopulações com síndrome de Sjögren sem evidência de infecção pelo HTLV-1 (Mariette, Agbalika *et al.*, 1993; Sumida, Yonaha *et al.*, 1994; Mariette, Agbalika *et al.*, 2000) fundamentados pelo modelo experimental de (Green, Hinrichs *et al.*, 1989), fazem crer que produtos

contendo o gene Tax do HTLV-1 podem ser candidatos a auto-antígenos ou podem levar à ativação de células T auto-reativas e assim causar a síndrome de Sjögren (Sasaki, Nakamura *et al.*, 2000). Um aumento da carga proviral é observado nas glândulas salivares de pacientes com síndrome de Sjögren associada ao HTLV-1 (Ohyama, Nakamura *et al.*, 1998), como também, um acúmulo de células T infectadas nas glândulas salivares destes pacientes. Este aspecto deve-se provavelmente à capacidade oncogênica do gene Tax que promove uma atividade anti-apoptótica das células T auto-reativas, ocasionando um maior acúmulo destas células e paradoxalmente, maior apoptose das células glandulares (Ohyama, Nakamura *et al.*, 1998; Cartier e Ramirez, 2005).

Do ponto de vista imunológico, o perfil de citocinas em cultura de linfócitos de tecido glandular de indivíduos com síndrome de Sjögren e de indivíduos com síndrome seca é desviado para Th1, sendo IFN- γ e IL-13 as citocinas mais abundantes. O IFN- γ estava correlacionado com a intensidade do infiltrado linfocítico (escore de CHISHOLM) (Mitsias, Tzioufas *et al.*, 2002). Estudos mais recentes demonstraram que a atividade de células Th1 *in situ* é maior na síndrome de Sjögren do que na síndrome seca, nesta, a atividade de células Th1 é maior no sangue periférico (Van Woerkom, Kruize *et al.*, 2005). É provável que estes resultados expliquem a falta de correlação entre os níveis de IFN- γ no sangue periférico e o fluxo salivar. O IFN- γ contribui para a infiltração linfocitária, através da indução de quimiocinas por células epiteliais, como (CXCL9), (CXCL10), (CXCL11) (Ogawa, Ping *et al.*, 2002).

Como a gengivite, a periodontite crônica e a mobilidade dental foram achados importantes em pacientes infectados pelo HTLV-1, um dos objetivos deste estudo foi avaliar a resposta imune na periodontite crônica associada ao HTLV-1, e comparar

com outras formas de periodontite observadas em indivíduos não infectados, como também com a resposta imune observada no periodonto sadio em indivíduos HTLV-1 soronegativos. Esta análise, empregando-se a técnica de real-time PCR, mostrou que a resposta imune exacerbada, vista na infecção pelo HTLV-1, foi igualmente encontrada no tecido periodontal, sugerindo que esse vírus pode interferir na resposta imune dirigida contra a invasão bacteriana. O HTLV-1 exerceria um papel na alteração do micro-ambiente periodontal, tal qual o vírus do H. simples, que tem a capacidade de iniciar ou de acelerar a destruição periodontal mediante a liberação de citocinas e quimiocinas, como também de diminuir a defesa periodontal, resultando em aumento da virulência bacteriana (Saygun, Kubar *et al.*, 2004). Conseguiu-se demonstrar neste trabalho que a resposta imune na doença periodontal de indivíduos portadores de HTLV-1 difere significativamente da resposta imune no periodonto de indivíduos HTLV-1 soronegativos com e sem doença periodontal. Os indivíduos com periodontite crônica associada ao HTLV-1 apresentaram expressão de RNAm para IFN- γ maior do que a expressão observada em indivíduos com periodontite crônica e periodontite agressiva não associada ao HTLV-1.

Evidências baseadas em estudos experimentais mostraram que tanto células Th1 quanto células Th2 e citocinas estão presentes simultaneamente no tecido periodontal infectado (Garlet, Martins *et al.*, 2003; Teng, 2006), e que células Th1 e as citocinas que elas produzem como o IFN- γ , podem mediar uma resposta inflamatória ativa associada à destruição óssea alveolar (Taubman e Kawai, 2001). As citocinas produzidas pelas células Th1 e Th2 são mutuamente inibitórias em relação às funções desempenhadas pela resposta imune. O equilíbrio entre essas citocinas pode ser importante para a resposta imune dirigida contra infecções

bacterianas (Modlin e Nutman, 1993). Apesar da maior expressão de RNA para IL-10 encontrada no periodonto dos indivíduos HTLV-1 soropositivos comparados com controles HTLV-1 soronegativos, as citocinas IL-10 não foram capazes de modular a forte resposta imune Th1 provocada pela infecção viral. Habitualmente, altos níveis de IL-10 são capazes de suprimir a resposta Th1 a patógenos infecciosos (Mcguirk, Mccann *et al.*, 2002). Por outro lado, foi reportado que, na doença periodontal, a IL-10 produzida por células T, células B e macrófagos pode contribuir também para a cronicidade da doença periodontal (Takahashi, Azuma *et al.*, 2005). No caso da infecção pelo HTLV-1, é possível que os níveis elevados de IL-10 signifiquem uma tentativa do hospedeiro em modular a forte resposta inflamatória observada nesta doença. Todavia, em células do sangue periférico, já se documentou que nem sempre a IL-10 é capaz de modular a resposta inflamatória pelo HTLV-1 (Santos, Porto *et al.*, 2004).

As doenças periodontais se caracterizam principalmente pela destruição irreversível das fibras de colágeno do ligamento periodontal e de outros componentes da matriz extracelular, causando a perda de fixação dos dentes. A remodelação do tecido conjuntivo que ocorre durante a inflamação, na reabsorção óssea, na reparação de fraturas e na cicatrização de feridas, envolve tanto a degradação da matriz extracelular quanto a síntese de novos componentes da matriz. Vários tipos de MMPs estão envolvidos nesse processo. O controle celular dessas enzimas proteolíticas ativadas é feito em várias etapas que incluem síntese e secreção, ativação e inibição por TIMPs (Sorsa, Tjaderhane *et al.*, 2004). As MMPs constituem a família mais importante das proteinases que participam da remodelação normal dos tecidos periodontais e da degradação tecidual que ocorre durante a doença periodontal. A maioria das células do tecido periodontal normal ou

inflamado sintetizam diversas MMPs que juntas têm a capacidade de iniciar e completar a degradação da matriz do tecido conjuntivo (Uitto, Overall *et al.*, 2003).

Um dos pressupostos deste estudo é que a existência de um desequilíbrio entre a expressão de RNAm para MMPs e seus reguladores TIMPs, com conseqüente aumento da expressão de MMPs em relação à expressão de TIMPs, nos tecidos gengivais inflamados de indivíduos HTLV-1 soropositivos, é bem maior do que o desequilíbrio encontrado nas diversas formas de periodontite na ausência de infecção pelo HTLV-1. As evidências encontradas na literatura mostram que uma infecção viral persistente pode perturbar a expressão harmônica entre citocinas, MMPs e de TIMPs (maiores níveis de MMPs e/ou menores níveis de TIMPs) nas células neurais de pacientes com HAM/TSP e causar dano inflamatório tecidual semelhante ao que ocorre na osteoartrite e na artrite reumatóide (Giraudon, Szymocha *et al.*, 2000), doenças que possuem algumas características semelhantes à doença periodontal, incluindo a natureza crônica da inflamação e destruição tecidual. Uma vez que linfócitos e macrófagos infectados pelo HTLV-1 secretam grande quantidade de citocinas, incluindo IL-2, IFN- γ , TGF- β , que são conhecidas como indutoras de MMP2 no murino, é provável que a infecção pelo HTLV-1 possa contribuir para o aumento da expressão de MMPs mediada por citocinas e cause maior destruição tecidual no periodonto, como já foi demonstrado ocorrer nas glândulas salivares labiais (Tominaga, Migita *et al.*, 1999) e na desmielinização do nervo corda espinhal nos pacientes com HAM/TSP (Giraudon, Szymocha *et al.*, 2000). Um dos aspectos centrais da doença periodontal é a perda óssea. O advento da doença está associado com a ação de bactérias Gram-negativas anaeróbias facultativas. Além do mais, apesar dessas bactérias patogênicas serem necessárias para causar doença periodontal, uma vez que a doença não ocorre em sua

ausência, não devem ser consideradas como causa suficiente de doença (Dangel, Mendoza *et al.*, 1994).

Dentre os vários componentes envolvidos na patogênese da doença periodontal, como o distúrbio da resposta imunológica, o aumento da produção de metaloproteinases e o aumento de substâncias relacionadas com a ação dos osteoclastos (RANK, RANK-L), o que mais se destacou na infecção pelo HTLV-1 foi o aumento da expressão de IFN- γ . Este é associado clinicamente ao desenvolvimento de maior destruição tecidual e progressão da doença, característicos de periodontite agressiva. Esse dado corrobora o achado clínico de maior mobilidade dental presente nos indivíduos HTLV-1 soropositivos comparados com controles soronegativos. Tomando-se a mobilidade dental como critério de gravidade da doença, é possível inferir que a periodontite pode ser mais grave nos indivíduos infectados pelo HTLV-1 do que nos indivíduos HTLV-1 soronegativos.

Adicionalmente, os dados obtidos neste trabalho enfatizam a importância da infecção pelo HTLV-1 no advento de doenças orais, seja através da modificação da resposta imune aos patógenos orais, resultando em infecções bacterianas e fúngicas, ou através da inflamação das glândulas salivares, ocasionando diminuição da função salivar, que é um dos fatores mais importantes na manutenção da complexa homeostase dos tecidos orais.

5. CONCLUSÃO

1. A síndrome seca é um importante distúrbio em indivíduos infectados pelo HTLV-1 e atinge tanto os portadores de HTLV-1 assintomáticos como os indivíduos com HAM/TSP.
2. A frequência de síndrome seca é maior nos indivíduos infectados pelo HTLV-1 do que em controles HTLV-1 soronegativos, e maior entre os pacientes com HAM/TSP do que entre os indivíduos portadores do HTLV-1 assintomáticos.
3. A hipofunção das glândulas salivares, objetivada pela diminuição do fluxo salivar e clinicamente pelo ressecamento da mucosa oral, é a alteração mais marcante, dentre as alterações da mucosa oral, apresentada na infecção pelo HTLV-1, sendo mais exuberante nos pacientes com HAM/TSP.
4. Os indivíduos com hipossalivação devem ser considerados como portadores de síndrome seca associada ao HTLV-1 ou de sialadenite crônica associada ao HTLV-1.
5. A doença periodontal desenvolvida na infecção pelo HTLV-1 pode ser caracterizada como gengivite induzida por placa bacteriana e periodontite crônica. Esta apresenta características de maior gravidade que inclui inflamação gengival mais intensa e maior perda óssea.
6. A resposta imune na periodontite crônica nos indivíduos infectados pelo HTLV-1 é caracterizada por uma resposta imune Th1 exacerbada com altos níveis de IFN- γ .
7. A baixa expressão de TIMP3 sugere que a infecção pelo HTLV-1 contribui para uma forma mais agressiva da doença periodontal nos indivíduos infectados.

8. Globalmente, a saúde oral na infecção pelo HTLV-1 é mais precária do que em indivíduos HTLV-1 soronegativos.

6. SUMMARY

GIOZZA, S. P. ORAL MANIFESTATIONS: CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL ASPECTS IN HTLV-1 CARRIERS. Salvador, 2006. 50 p. Thesis (P.h.D in Immunology) – Instituto de Ciências da Saúde, Serviço de Imunologia, Hospital Universitário Prof. Edgar Santos – HUPES – Universidade Federal da Bahia. This thesis is composed of three studies that evaluated the repercussion of the HTLV-1 infection in the oral health status. The first, evaluated the state of the oral health in a sample of 100 individuals infected by HTLV-1 compared with 100 blood donors HTLV-1 seronegative matched for sex and age. The second evaluated the frequency of sicca syndrome, the salivary gland's function in HTLV-1 carriers, in patients with HAM-TSP and in HTLV-I seronegative individuals, as well as the correlation among the levels of pro-inflammatory cytokines in PBMC and saliva. The third work evaluated the interaction among the HTLV-1 infection with bacterial diseases, through the analysis of the *in situ* inflammatory immune response of the chronic periodontitis in HTLV-1 seropositive individuals compared with aggressive periodontitis, chronic periodontitis and with gingival healthy tissues in HTLV-1 seronegative individuals. It was observed that the most frequent alteration was dryness of the oral mucosa, followed by chronic periodontitis and significant dental mobility. Individuals HTLV-1 seropositive and seronegative didn't present differences in relation to the total edentulism, poor oral hygiene, caries and history of herpes labialis. Xerophthalmia was more expressive in the infected group than xerostomia, which didn't show difference between groups. The conditional Logistic Regression models analysis showed that gingivitis, chronic periodontitis, significant dental mobility, denture stomatitis and xerophthalmia was significant. The oral clinical

examination evidenced the significant presence of dry mouth in 75% of the HAM-TSP patients and in 22% of the HTLV-1 carriers. The control group didn't present evidence of dry mouth. The hyposalivation proportion was larger in the HAM-TSP group (44%) than in the HTLV-1 carriers (28%). These differences were significant. There was significant association between the objective signs of dry mouth and hyposalivation, confirming the importance of the oral clinical examination. The cytokine expression analysis in gingival tissue with and without disease, by Real-Time PCR, showed that the immune response in the HTLV-1 infection is exacerbated, with the expression of high levels of IFN- γ and of IL-10 and it resembles to the immune response found in the peripheral blood. These results suggest that the oral health status in the HTLV-1 infected individuals is poorer compared with HTLV-1 seronegatives healthy blood donors. The oral health needs attention in the course of the HTLV-1 infection in order to preserve the integrity of the oral tissues and to improve the quality of the infected individuals' life.

Key Words: 1. HTLV-1; 2. Sicca syndrome; 3. Periodontitis; 4. Xerophthalmia; 5. Xerostomia.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almstahl, A. e M. Wikstrom. Oral microflora in subjects with reduced salivary secretion. J Dent Res, v.78, n.8, Aug, p.1410-6. 1999.

Andrade, T. M., I. Dourado, et al. Associations among HTLV-I, HTLV-II, and HIV in injecting drug users in Salvador, Brazil. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol, v.18, n.2, Jun 1, p.186-7. 1998.

Bangham, C. R. HTLV-1 infections. J Clin Pathol, v.53, n.8, Aug, p.581-6. 2000.

Bartoe, J. T., B. Albrecht, et al. Functional role of pX open reading frame II of human T-lymphotropic virus type 1 in maintenance of viral loads in vivo. J Virol, v.74, n.3, Feb, p.1094-100. 2000.

Bergdahl, M. Salivary flow and oral complaints in adult dental patients. Community Dent Oral Epidemiol, v.28, n.1, Feb, p.59-66. 2000.

Boutsi, E. A., S. Paikos, et al. Dental and periodontal status of Sjogren's syndrome. J Clin Periodontol, v.27, n.4, Apr, p.231-5. 2000.

Brites, C., M. Weyll, et al. Severe and Norwegian scabies are strongly associated with retroviral (HIV-1/HTLV-1) infection in Bahia, Brazil. Aids, v.16, n.9, Jun 14, p.1292-3. 2002.

Cartier, L., J. L. Castillo, et al. Chronic dacryosialadenitis in HTLV I associated myelopathy. J Neurol Neurosurg Psychiatry, v.58, n.2, Feb, p.244-6. 1995.

Cartier, L. e E. Ramirez. Presence of HTLV-I Tax protein in cerebrospinal fluid from HAM/TSP patients. Arch Virol, v.150, n.4, Apr, p.743-53. 2005.

Carvalho, E. M., O. Bacellar, et al. Cytokine profile and immunomodulation in asymptomatic human T-lymphotropic virus type 1-infected blood donors. J Acquir Immune Defic Syndr, v.27, n.1, May 1, p.1-6. 2001.

Chisholm, D. M. e D. K. Mason. Salivary gland function in Sjogren's syndrome: a review. Br Dent J, v.135, n.9, Nov 6, p.393-9. 1973.

Coffin, J. M. Retrovirus restriction revealed. Nature, v.382, n.6594, Aug 29, p.762-3. 1996.

Consensus report. Periodontal diseases: epidemiology and diagnosis. Ann Periodontol, v.1, n.1, Nov, p.216-22. 1996.

Consensus report. Periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors. Ann Periodontol, v.1, n.1, Nov, p.926-32. 1996.

Contreras, A., N. Doan, *et al.* Importance of Dialister pneumosintes in human periodontitis. Oral Microbiol Immunol, v.15, n.4, Aug, p.269-72. 2000.

Contreras, A., M. Umeda, *et al.* Relationship between herpesviruses and adult periodontitis and periodontopathic bacteria. J Periodontol, v.70, n.5, May, p.478-84. 1999.

Courouce, A. M., J. Pillonel, *et al.* Seroepidemiology of HTLV-I/II in universal screening of blood donations in France. Aids, v.7, n.6, Jun, p.841-7. 1993.

Crotti, T., M. D. Smith, *et al.* Receptor activator NF kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. J Periodontal Res, v.38, n.4, Aug, p.380-7. 2003.

Cullinan, M. P., B. Westerman, *et al.* A longitudinal study of interleukin-1 gene polymorphisms and periodontal disease in a general adult population. J Clin Periodontol, v.28, n.12, Dec, p.1137-44. 2001.

Dangel, A. W., A. R. Mendoza, *et al.* The dichotomous size variation of human complement C4 genes is mediated by a novel family of endogenous retroviruses, which also establishes species-specific genomic patterns among Old World primates. Immunogenetics, v.40, n.6, p.425-36. 1994.

- De The, G. e M. Kazanji. An HTLV-I/II vaccine: from animal models to clinical trials? J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol, v.13 Suppl 1, p.S191-8. 1996.
- Dourado, I., L. C. Alcantara, *et al.* HTLV-I in the general population of Salvador, Brazil: a city with African ethnic and sociodemographic characteristics. J Acquir Immune Defic Syndr, v.34, n.5, Dec 15, p.527-31. 2003.
- Dumas, M., D. Houinato, *et al.* Seroepidemiology of human T-cell lymphotropic virus type I/II in Benin (West Africa). AIDS Res Hum Retroviruses, v.7, n.5, May, p.447-51. 1991.
- Eguchi, K., N. Matsuoka, *et al.* Primary Sjogren's syndrome with antibodies to HTLV-I: clinical and laboratory features. Ann Rheum Dis, v.51, n.6, Jun, p.769-76. 1992.
- Ezzo, P. J. e C. W. Cutler. Microorganisms as risk indicators for periodontal disease. Periodontol 2000, v.32, p.24-35. 2003.
- Fejerskov, O. Concepts of dental caries and their consequences for understanding the disease. Community Dent Oral Epidemiol, v.25, n.1, Feb, p.5-12. 1997.
- Feuer, G. e P. L. Green. Comparative biology of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2. Oncogene, v.24, n.39, Sep 5, p.5996-6004. 2005.
- Field, E. A., L. P. Longman, *et al.* The establishment of a xerostomia clinic: a prospective study. Br J Oral Maxillofac Surg, v.35, n.2, Apr, p.96-103. 1997.
- Fox, P. C. Differentiation of dry mouth etiology. Adv Dent Res, v.10, n.1, Apr, p.13-6. 1996.
- Fox, P. C., M. Brennan, *et al.* Sjogren's syndrome: a model for dental care in the 21st century. J Am Dent Assoc, v.129, n.6, Jun, p.719-28. 1998.
- Fox, P. C., K. A. Busch, *et al.* Subjective reports of xerostomia and objective measures of salivary gland performance. J Am Dent Assoc, v.115, n.4, Oct, p.581-4. 1987.

- Fox, R. I. Sjogren's syndrome. Lancet, v.366, n.9482, Jul 23-29, p.321-31. 2005.
- Gallo, R. C. History of the discoveries of the first human retroviruses: HTLV-1 and HTLV-2. Oncogene, v.24, n.39, Sep 5, p.5926-30. 2005.
- Gallo, R. C., W. A. Blattner, *et al.* HTLV: the virus of adult T-cell leukaemia in Japan and elsewhere. Lancet, v.1, n.8273, Mar 20, p.683. 1982.
- Galvão-Castro, B., L. Loures, *et al.* Distribution of human T-lymphotropic virus type I among blood donors: a nationwide Brazilian study. Transfusion, v.37, n.2, Feb, p.242-3. 1997.
- Garlet, G. P., W. Martins, Jr., *et al.* Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease. J Periodontal Res, v.38, n.2, Apr, p.210-7. 2003.
- _____. Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. J Clin Periodontol, v.31, n.8, Aug, p.671-9. 2004.
- Gemmell, E., C. L. Carter, *et al.* P. gingivalis-specific T-cell lines produce Th1 and Th2 cytokines. J Dent Res, v.81, n.5, May, p.303-7. 2002.
- Gemmell, E. e G. J. Seymour. Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease. Periodontol 2000, v.35, p.21-41. 2004.
- Gessain, A. e G. De The. Geographic and molecular epidemiology of primate T lymphotropic retroviruses: HTLV-I, HTLV-II, STLV-I, STLV-PP, and PTLV-L. Adv Virus Res, v.47, p.377-426. 1996.
- Giraudon, P., S. Buart, *et al.* Cytokines secreted by glial cells infected with HTLV-I modulate the expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and their natural inhibitor (TIMPs): possible involvement in neurodegenerative processes. Mol Psychiatry, v.2, n.2, Mar, p.107-10, 84. 1997.

Giraudon, P., R. Szymocha, *et al.* T lymphocytes activated by persistent viral infection differentially modify the expression of metalloproteinases and their endogenous inhibitors, TIMPs, in human astrocytes: relevance to HTLV-I-induced neurological disease. *J Immunol* 2000. 2718-27 p.

Goon, P. K. e C. R. Bangham. Interference with immune function by HTLV-1. *Clin Exp Immunol*, v.137, n.2, Aug, p.234-6. 2004.

Gotuzzo, E., C. Arango, *et al.* Human T-cell lymphotropic virus-I in Latin America. *Infect Dis Clin North Am*, v.14, n.1, Mar, p.211-39, x-xi. 2000.

Gout, O., M. Baulac, *et al.* Rapid development of myelopathy after HTLV-I infection acquired by transfusion during cardiac transplantation. *N Engl J Med*, v.322, n.6, Feb 8, p.383-8. 1990.

Green, J. E., S. H. Hinrichs, *et al.* Exocrinopathy resembling Sjogren's syndrome in HTLV-1 tax transgenic mice. *Nature*, v.341, n.6237, Sep 7, p.72-4. 1989.

Hajjar, C., S. Sainte-Foie, *et al.* [HTLV1 infection and sicca syndrome]. *J Fr Ophtalmol*, v.18, n.10, p.597-602. 1995.

Hara, H., M. Morita, *et al.* Detection of human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) proviral DNA and analysis of T cell receptor V beta CDR3 sequences in spinal cord lesions of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Exp Med*, v.180, n.3, Sep 1, p.831-9. 1994.

Hay, E. M., E. Thomas, *et al.* Weak association between subjective symptoms or and objective testing for dry eyes and dry mouth: results from a population based study. *Ann Rheum Dis*, v.57, n.1, Jan, p.20-4. 1998.

Hillman, J. D. Principles of microbial ecology and their application to xerostomia-associated opportunistic infections of the oral cavity. *Adv Dent Res*, v.10, n.1, Apr, p.66-8. 1996.

Hisada, M., S. O. Stuver, *et al.* Gender difference in skin reactivity to purified protein derivative among carriers of HTLV-I in Japan. J Acquir Immune Defic Syndr, v.22, n.3, Nov 1, p.302-7. 1999.

Hollberg, P. e D. A. Hafler. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Pathogenesis of diseases induced by human lymphotropic virus type I infection. N Engl J Med, v.328, n.16, Apr 22, p.1173-82. 1993.

International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions. Ann Periodontol, v.4, n.1, Dec, p.i, 1-112. 1999.

Izumi, M., H. Nakamura, *et al.* Sjogren's syndrome (SS) in patients with human T cell leukemia virus I associated myelopathy: paradoxical features of the major salivary glands compared to classical SS. J Rheumatol, v.26, n.12, Dec, p.2609-14. 1999.

Jacobson, S. Immunopathogenesis of human T cell lymphotropic virus type I-associated neurologic disease. J Infect Dis, v.186 Suppl 2, Dec 1, p.S187-92. 2002.

Jacobson, S., H. Shida, *et al.* Circulating CD8+ cytotoxic T lymphocytes specific for HTLV-I pX in patients with HTLV-I associated neurological disease. Nature, v.348, n.6298, Nov 15, p.245-8. 1990.

Jeffery, K. J., K. Usuku, *et al.* HLA alleles determine human T-lymphotropic virus-I (HTLV-I) proviral load and the risk of HTLV-I-associated myelopathy. Proc Natl Acad Sci U S A, v.96, n.7, Mar 30, p.3848-53. 1999.

Kamma, J. J., A. Contreras, *et al.* Herpes viruses and periodontopathic bacteria in early-onset periodontitis. J Clin Periodontol, v.28, n.9, Sep, p.879-85. 2001.

Kashanchi, F. e J. N. Brady. Transcriptional and post-transcriptional gene regulation of HTLV-1. Oncogene, v.24, n.39, Sep 5, p.5938-51. 2005.

Kashanchi, F., J. F. Duvall, *et al.* The coactivator CBP stimulates human T-cell lymphotropic virus type I Tax transactivation in vitro. J Biol Chem, v.273, n.51, Dec 18, p.34646-52. 1998.

Kazanji, M. e A. Gessain. Human T-cell Lymphotropic Virus types I and II (HTLV-I/II) in French Guiana: clinical and molecular epidemiology. Cad Saude Publica, v.19, n.5, Sep-Oct, p.1227-40. 2003.

Khuth, S. T., H. Akaoka, *et al.* Morbillivirus infection of the mouse central nervous system induces region-specific upregulation of MMPs and TIMPs correlated to inflammatory cytokine expression. J Virol, v.75, n.17, Sep, p.8268-82. 2001.

Kinane, D. F. e T. C. Hart. Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease. Crit Rev Oral Biol Med, v.14, n.6, p.430-49. 2003.

Kiyokawa, T., M. Seiki, *et al.* p27x-III and p21x-III, proteins encoded by the pX sequence of human T-cell leukemia virus type I. Proc Natl Acad Sci U S A, v.82, n.24, Dec, p.8359-63. 1985.

Kornman, K. S., A. Crane, *et al.* The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. J Clin Periodontol, v.24, n.1, Jan, p.72-7. 1997.

Kornman, K. S. e F. S. Di Giovine. Genetic variations in cytokine expression: a risk factor for severity of adult periodontitis. Ann Periodontol, v.3, n.1, Jul, p.327-38. 1998.

Lacey, D. L., E. Timms, *et al.* Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. Cell, v.93, n.2, Apr 17, p.165-76. 1998.

Lagrenade, L., B. Hanchard, *et al.* Infective dermatitis of Jamaican children: a marker for HTLV-I infection. Lancet, v.336, n.8727, Dec 1, p.1345-7. 1990.

Lagrenade, L., C. Morgan, *et al.* Tropical spastic paraparesis occurring in HTLV-1 associated infective dermatitis. Report of two cases. West Indian Med J, v.44, n.1, Mar, p.34-5. 1995.

Lenzi, M. E., T. Cuzzi-Maya, *et al.* Dermatological findings of human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-I)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. Clin Infect Dis, v.36, n.4, Feb 15, p.507-13. 2003.

Levin, M. C. e S. Jacobson. Cellular and humoral immune responses associated with HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. Ann N Y Acad Sci, v.835, Dec 19, p.142-52. 1997a.

_____. HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP): a chronic progressive neurologic disease associated with immunologically mediated damage to the central nervous system. J Neurovirol, v.3, n.2, Apr, p.126-40. 1997b.

Lotufo, R. F., J. Flynn, *et al.* Molecular detection of *Bacteroides forsythus* in human periodontitis. Oral Microbiol Immunol, v.9, n.3, Jun, p.154-60. 1994.

Mahe, A., L. Meertens, *et al.* Human T-cell leukaemia/lymphoma virus type 1-associated infective dermatitis in Africa: a report of five cases from Senegal. Br J Dermatol, v.150, n.5, May, p.958-65. 2004.

Maloney, E. M., H. Ramirez, *et al.* A survey of the human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) in south-western Colombia. Int J Cancer, v.44, n.3, Sep 15, p.419-23. 1989.

Manel, N., F. J. Kim, *et al.* The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV. Cell, v.115, n.4, Nov 14, p.449-59. 2003.

Manns, A., W. J. Miley, *et al.* Prognostic significance of quantitative viral markers in adult T-cell leukemia/lymphoma. Blood, v.94, n.1, Jul 1, p.372-3. 1999.

_____. Quantitative proviral DNA and antibody levels in the natural history of HTLV-I infection. J Infect Dis, v.180, n.5, Nov, p.1487-93. 1999.

Mariette, X., F. Agbalika, *et al.* Detection of human T lymphotropic virus type I tax gene in salivary gland epithelium from two patients with Sjogren's syndrome. Arthritis Rheum, v.36, n.10, Oct, p.1423-8. 1993.

_____. Detection of the tax gene of HTLV-I in labial salivary glands from patients with Sjogren's syndrome and other diseases of the oral cavity. Clin Exp Rheumatol, v.18, n.3, May-Jun, p.341-7. 2000.

Marinho, J., B. Galvão-Castro, *et al.* Increased risk of tuberculosis with human T-lymphotropic virus-1 infection: a case-control study. J Acquir Immune Defic Syndr, v.40, n.5, Dec 15, p.625-8. 2005.

Martinelli, M.N.C. Manifestações reumatológicas associadas à infecção pelo HTLV-1. [Mestrado] Faculdade de Medicina. Pós-Graduação em Medicina e Saúde, Universidade Federal da Bahia, 2004.

Mcguirk, P., C. Mccann, *et al.* Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by *Bordetella pertussis*. J Exp Med, v.195, n.2, Jan 21, p.221-31. 2002.

Merle, H., P. Cabre, *et al.* Ocular lesions in 200 patients infected by the human T-cell lymphotropic virus type 1 in martinique (French West Indies). Am J Ophthalmol, v.134, n.2, Aug, p.190-5. 2002.

_____. Sicca syndrome and HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. Jpn J Ophthalmol, v.43, n.6, Nov-Dec, p.509-12. 1999.

_____. [Sjogren's syndrome and HTLV-I myelopathy]. Ann Med Interne (Paris), v.147, n.8, p.586-9. 1996.

Mitsias, D. I., A. G. Tzioufas, *et al.* The Th1/Th2 cytokine balance changes with the progress of the immunopathological lesion of Sjogren's syndrome. Clin Exp Immunol, v.128, n.3, Jun, p.562-8. 2002.

Miura, T., M. Yamashita, *et al.* Molecular phylogeny of human T-cell leukemia virus type I and II of Amerindians in Colombia and Chile. J Mol Evol, v.44 Suppl 1, p.S76-82. 1997.

Modlin, R. L. e B. R. Bloom. Immune regulation: learning from leprosy. Hosp Pract (Off Ed), v.28, n.11, Nov 15, p.71-4, 77-80, 83-4. 1993.

Modlin, R. L. e T. B. Nutman. Type 2 cytokines and negative immune regulation in human infections. Curr Opin Immunol, v.5, n.4, Aug, p.511-7. 1993.

Moreira, P. R., A. R. De Sa, *et al.* A functional interleukin-1 beta gene polymorphism is associated with chronic periodontitis in a sample of Brazilian individuals. J Periodontal Res, v.40, n.4, Aug, p.306-11. 2005.

Mueller, N. The epidemiology of HTLV-I infection. Cancer Causes Control, v.2, n.1, Jan, p.37-52. 1991.

Murphy, E. L., J. P. Figueroa, *et al.* Human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) seroprevalence in Jamaica. I. Demographic determinants. Am J Epidemiol, v.133, n.11, Jun 1, p.1114-24. 1991.

Nagai, M., K. Usuku, *et al.* Analysis of HTLV-I proviral load in 202 HAM/TSP patients and 243 asymptomatic HTLV-I carriers: high proviral load strongly predisposes to HAM/TSP. J Neurovirol, v.4, n.6, Dec, p.586-93. 1998.

Nakamura, H., K. Eguchi, *et al.* High prevalence of Sjogren's syndrome in patients with HTLV-I associated myelopathy. Ann Rheum Dis, v.56, n.3, Mar, p.167-72. 1997.

Nakamura, H., A. Kawakami, *et al.* Relationship between Sjogren's syndrome and human T-lymphotropic virus type I infection: follow-up study of 83 patients. J Lab Clin Med, v.135, n.2, Feb, p.139-44. 2000.

Nobre, V., A. C. Guedes, *et al.* [Dermatologic lesions in patients infected with the human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)]. Rev Soc Bras Med Trop, v.38, n.1, Jan-Feb, p.43-52. 2005.

Nunn, M. E. Understanding the etiology of periodontitis: an overview of periodontal risk factors. Periodontol 2000, v.32, p.11-23. 2003.

Offenbacher, S. Periodontal diseases: pathogenesis. Ann Periodontol, v.1, n.1, Nov, p.821-78. 1996.

Ogawa, N., L. Ping, *et al.* Involvement of the interferon-gamma-induced T cell-attracting chemokines, interferon-gamma-inducible 10-kd protein (CXCL10) and monokine induced by interferon-gamma (CXCL9), in the salivary gland lesions of patients with Sjogren's syndrome. Arthritis Rheum, v.46, n.10, Oct, p.2730-41. 2002.

Ohyama, Y., S. Nakamura, *et al.* Accumulation of human T lymphotropic virus type I-infected T cells in the salivary glands of patients with human T lymphotropic virus type I-associated Sjogren's syndrome. Arthritis Rheum, v.41, n.11, Nov, p.1972-8. 1998.

Okada, H. e S. Murakami. Cytokine expression in periodontal health and disease. Crit Rev Oral Biol Med, v.9, n.3, p.248-66. 1998.

Osame, M., K. Usuku, *et al.* HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. Lancet, v.1, n.8488, May 3, p.1031-2. 1986.

Page, R. C., S. Offenbacher, *et al.* Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. Periodontol 2000, v.14, Jun, p.216-48. 1997.

Pedersen, A. M., A. Bardow, *et al.* Salivary changes and dental caries as potential oral markers of autoimmune salivary gland dysfunction in primary Sjogren's syndrome. BMC Clin Pathol, v.5, n.1, Mar 1, p.4. 2005.

Pedral-Sampaio, D. B., E. Martins Netto, *et al.* Co-Infection of Tuberculosis and HIV/HTLV Retroviruses: Frequency and Prognosis Among Patients Admitted in a Brazilian Hospital. Braz J Infect Dis, v.1, n.1, Mar, p.31-35. 1997.

Poiesz, B. J., F. W. Ruscetti, *et al.* Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. Proc Natl Acad Sci U S A, v.77, n.12, Dec, p.7415-9. 1980.

Portis, T., J. C. Harding, *et al.* The contribution of NF-kappa B activity to spontaneous proliferation and resistance to apoptosis in human T-cell leukemia virus type 1 Tax-induced tumors. Blood, v.98, n.4, Aug 15, p.1200-8. 2001.

Porto, A. F., F. A. Neva, *et al.* HTLV-1 decreases Th2 type of immune response in patients with strongyloidiasis. Parasite Immunol, v.23, n.9, Sep, p.503-7. 2001.

Porto, A. F., S. B. Santos, *et al.* HTLV-1 modifies the clinical and immunological response to schistosomiasis. Clin Exp Immunol, v.137, n.2, Aug, p.424-9. 2004.

_____. Helminthic infection down-regulates type 1 immune responses in human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) carriers and is more prevalent in HTLV-1 carriers than in patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. J Infect Dis, v.191, n.4, Feb 15, p.612-8. 2005.

Primo, J. R., C. Brites, *et al.* Infective dermatitis and human T cell lymphotropic virus type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in childhood and adolescence. Clin Infect Dis, v.41, n.4, Aug 15, p.535-41. 2005.

Proietti, F. A., A. B. Carneiro-Proietti, *et al.* Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. Oncogene, v.24, n.39, Sep 5, p.6058-68. 2005.

Samaranayake, Y. H., L. P. Samaranayake, *et al.* Antifungal effects of lysozyme and lactoferrin against genetically similar, sequential *Candida albicans* isolates from a human immunodeficiency virus-infected southern Chinese cohort. J Clin Microbiol, v.39, n.9, Sep, p.3296-302. 2001.

Santos, S. B., A. F. Porto, *et al.* Exacerbated inflammatory cellular immune response characteristics of HAM/TSP is observed in a large proportion of HTLV-I asymptomatic carriers. BMC Infect Dis, v.4, n.1, Mar 2, p.7. 2004.

Sarkodie, F., M. Adarkwa, *et al.* Screening for viral markers in volunteer and replacement blood donors in West Africa. Vox Sang, v.80, n.3, Apr, p.142-7. 2001.

Sasaki, M., S. Nakamura, *et al.* Accumulation of common T cell clonotypes in the salivary glands of patients with human T lymphotropic virus type I-associated and idiopathic Sjogren's syndrome. J Immunol, v.164, n.5, Mar 1, p.2823-31. 2000.

Saygun, I., A. Kubar, *et al.* Herpesviral-bacterial interrelationships in aggressive periodontitis. J Periodontal Res, v.39, n.4, Aug, p.207-12. 2004.

Saygun, I., S. Sahin, *et al.* Detection of human viruses in patients with chronic periodontitis and the relationship between viruses and clinical parameters. J Periodontol, v.73, n.12, Dec, p.1437-43. 2002.

Scully, C. Drug effects on salivary glands: dry mouth. Oral Dis, v.9, n.4, Jul, p.165-76. 2003.

Seiki, M., A. Hikikoshi, *et al.* Expression of the pX gene of HTLV-I: general splicing mechanism in the HTLV family. Science, v.228, n.4707, Jun 28, p.1532-4. 1985.

Seymour, G. J. Importance of the host response in the periodontium. J Clin Periodontol, v.18, n.6, Jul, p.421-6. 1991.

Seymour, G. J. e J. J. Taylor. Shouts and whispers: An introduction to immunoregulation in periodontal disease. Periodontol 2000, v.35, p.9-13. 2004.

- Ship, J. A., L. L. Patton, *et al.* An assessment of salivary function in healthy premenopausal and postmenopausal females. J Gerontol, v.46, n.1, Jan, p.11-5. 1991.
- Sjögren H. Knowledge of Keratoconjunctivitis sicca. Acta Ophthalmol. v. 11, n.1. p. 151. 1933
- Slots, J. e A. Contreras. Herpesviruses: a unifying causative factor in periodontitis? Oral Microbiol Immunol, v.15, n.5, Oct, p.277-80. 2000.
- Slots, J., J. J. Kamma, *et al.* The herpesvirus-Porphyrromonas gingivalis-periodontitis axis. J Periodontal Res, v.38, n.3, Jun, p.318-23. 2003.
- Slots, J., C. Sugar, *et al.* Cytomegalovirus periodontal presence is associated with subgingival Dialister pneumosintes and alveolar bone loss. Oral Microbiol Immunol, v.17, n.6, Dec, p.369-74. 2002.
- Socransky, S. S., A. D. Haffajee, *et al.* Microbial complexes in subgingival plaque. J Clin Periodontol, v.25, n.2, Feb, p.134-44. 1998.
- Socransky, S. S., C. Smith, *et al.* Subgingival microbial profiles in refractory periodontal disease. J Clin Periodontol, v.29, n.3, Mar, p.260-8. 2002.
- Soell, M., R. Elkaim, *et al.* Cathepsin C, matrix metalloproteinases, and their tissue inhibitors in gingiva and gingival crevicular fluid from periodontitis-affected patients. J Dent Res, v.81, n.3, Mar, p.174-8. 2002.
- Sorsa, T., L. Tjaderhane, *et al.* Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. Oral Dis, v.10, n.6, Nov, p.311-8. 2004.
- Stigum, H., P. Magnus, *et al.* Human T-cell lymphotropic virus testing of blood donors in Norway: a cost-effect model. Int J Epidemiol, v.29, n.6, Dec, p.1076-84. 2000.

Sumida, T., F. Yonaha, *et al.* Expression of sequences homologous to HTLV-I tax gene in the labial salivary glands of Japanese patients with Sjogren's syndrome. Arthritis Rheum, v.37, n.4, Apr, p.545-50. 1994.

Tachibana, N., A. Okayama, *et al.* Suppression of tuberculin skin reaction in healthy HTLV-I carriers from Japan. Int J Cancer, v.42, n.6, Dec 15, p.829-31. 1988.

Takahashi, K., T. Azuma, *et al.* The potential role of interleukin-17 in the immunopathology of periodontal disease. J Clin Periodontol, v.32, n.4, Apr, p.369-74. 2005.

Takatsuki, K. Discovery of adult T-cell leukemia. Retrovirology, v.2, n.1, Mar 2, p.1-3. 2005.

Taubman, M. A. e T. Kawai. Involvement of T-lymphocytes in periodontal disease and in direct and indirect induction of bone resorption. Crit Rev Oral Biol Med, v.12, n.2, p.125-35. 2001.

Tandler, C. L., S. J. Greenberg, *et al.* Cytokine induction in HTLV-I associated myelopathy and adult T-cell leukemia: alternate molecular mechanisms underlying retroviral pathogenesis. J Cell Biochem, v.46, n.4, Aug, p.302-11. 1991.

Teng, Y. T. Mixed periodontal Th1-Th2 cytokine profile in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-specific osteoprotegerin ligand (or RANK-L)- mediated alveolar bone destruction in vivo. Infect Immun, v.70, n.9, Sep, p.5269-73. 2002.

_____. Protective and Destructive Immunity in the Periodontium: Part 2--T-cell-mediated Immunity in the Periodontium. J Dent Res, v.85, n.3, Mar, p.209-219. 2006.

Teng, Y. T., H. Nguyen, *et al.* Functional human T-cell immunity and osteoprotegerin ligand control alveolar bone destruction in periodontal infection. J Clin Invest, v.106, n.6, Sep, p.59-67. 2000.

- Terada, K., S. Katamine, *et al.* Prevalence of serum and salivary antibodies to HTLV-1 in Sjogren's syndrome. Lancet, v.344, n.8930, Oct 22, p.1116-9. 1994.
- Theill, L. E., W. J. Boyle, *et al.* RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. Annu Rev Immunol, v.20, p.795-823. 2002.
- Tominaga, M., K. Migita, *et al.* Expression of metalloproteinase-2 (gelatinase A) in labial salivary glands of patients with Sjogren's syndrome with HTLV-I infection. Clin Exp Rheumatol, v.17, n.4, Jul-Aug, p.463-6. 1999.
- Tseliou, P. M., N. Spanakis, *et al.* HTLV-I and -II in southwestern Greece. Transfusion, v.43, n.11, Nov, p.1641-2. 2003.
- Uchiyama, T., T. Hori, *et al.* Interleukin-2 receptor (Tac antigen) expressed on adult T cell leukemia cells. J Clin Invest, v.76, n.2, Aug, p.446-53. 1985.
- Uhlig, T., T. K. Kvien, *et al.* Sicca symptoms, saliva and tear production, and disease variables in 636 patients with rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis, v.58, n.7, Jul, p.415-22. 1999.
- Uitto, V. J., C. M. Overall, *et al.* Proteolytic host cell enzymes in gingival crevice fluid. Periodontol 2000, v.31, p.77-104. 2003.
- Ukai, T., Y. Mori, *et al.* Immunohistological study of interferon-gamma- and interleukin-4-bearing cells in human periodontitis gingiva. Arch Oral Biol, v.46, n.10, Oct, p.901-8. 2001.
- Usuku, K., S. Sonoda, *et al.* HLA haplotype-linked high immune responsiveness against HTLV-I in HTLV-I-associated myelopathy: comparison with adult T-cell leukemia/lymphoma. Ann Neurol, v.23 Suppl, p.S143-50. 1988.
- Van Woerkom, J. M., A. A. Kruize, *et al.* Salivary gland and peripheral blood T helper 1 and 2 cell activity in Sjogren's syndrome compared with non-Sjogren's sicca syndrome. Ann Rheum Dis, v.64, n.10, Oct, p.1474-9. 2005.

Vernant, J. C., G. Buisson, *et al.* T-lymphocyte alveolitis, tropical spastic paresis, and Sjogren syndrome. Lancet, v.1, n.8578, Jan 23, p.177. 1988.

Veronesi, R., Focaccia, R. Retroviroses humanas: doenças associadas ao HTLV: etiologia, patogenia, patologia clínica, tratamento, prevenção. São Paulo: Editora Atheneu, 2000.

Vidal, A. U., A. Gessain, *et al.* Phylogenetic classification of human T cell leukaemia/lymphoma virus type I genotypes in five major molecular and geographical subtypes. J Gen Virol, v.75 (Pt 12), Dec, p.3655-66. 1994.

Wolfe, N. D., W. Heneine, *et al.* Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. Proc Natl Acad Sci U S A, v.102, n.22, May 31, p.7994-9. 2005.

Yakova, M., A. Lezin, *et al.* Increased proviral load in HTLV-1-infected patients with rheumatoid arthritis or connective tissue disease. Retrovirology, v.2, n.1, Feb 1, p.4. 2005.

Yamaguchi, K. Human T-lymphotropic virus type I in Japan. Lancet, v.343, n.8891, Jan 22, p.213-6. 1994.

Yamamoto, H., T. Yoshino, *et al.* Histopathological definition of the adult and calf types of bovine leukosis. Natl Inst Anim Health Q (Tokyo), v.22, n.3, Fall, p.115-29. 1982.

Yamano, Y., B. Kitze, *et al.* Preferential recognition of synthetic peptides from HTLV-I gp21 envelope protein by HLA-DRB1 alleles associated with HAM/TSP (HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis). J Neuroimmunol, v.76, n.1-2, Jun, p.50-60. 1997.

Yoshida, M. Discovery of HTLV-1, the first human retrovirus, its unique regulatory mechanisms, and insights into pathogenesis. Oncogene, v.24, n.39, Sep 5, p.5931-7. 2005.

Yoshida, M., I. Miyoshi, *et al.* Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. Proc Natl Acad Sci U S A, v.79, n.6, Mar, p.2031-5. 1982.

Younis, I. e P. L. Green. The human T-cell leukemia virus Rex protein. Front Biosci, v.10, Jan 1, p.431-45. 2005.

Zambon, J. J. Periodontal diseases: microbial factors. Ann Periodontol, v.1, n.1, Nov, p.879-925. 1996.