



BAHIANA
ESCOLA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E SAÚDE HUMANA

Cristina de Castro Lima Vargens Sena

**Vírus Linfotrópico de Células T Humana tipo 1 (HTLV-1) e sua associação com a
Ceratoconjuntivite Seca no Município de Salvador/ Bahia**

TESE DE DOUTORADO

Salvador-BA

2015

CRISTINA DE CASTRO LIMA VARGENS SENA

**Vírus Linfotrófico de Células T Humana tipo 1 (HTLV-1) e sua associação com
Ceratconjuntivite seca no Município de Salvador/ Bahia.**

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em Medicina e Saúde Humana da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública para obtenção do título de Doutora em Medicina e Saúde Humana.

Orientadores:

Prof. Dr. Bernardo Galvão Castro Filho
Prof^a. Dra. Maria Fernanda Rios Grassi.

Salvador-Bahia

2015

**Ficha Catalográfica elaborada pela
Biblioteca Central da EBMSP**

S474 Sena, Cristina de Castro Lima Vargens

**Vírus Linfotrópico de Células T humana tipo 1 (HTLV-1) e sua
associação com a Ceratoconjuntivite seca no município de Salvador/ Bahia.
Cristina de Castro Lima Vargens Sena – Salvador. 2015.**

64f. il.

Tese (Doutorado) apresentada à Escola Bahiana de Medicina e
Saúde Pública. Programa de Pós-Graduação em Medicina e Saúde
Humana.

Orientador: Prof. Dr. Bernardo Galvão Castro Filho
Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Fernanda Rios Grassi

Inclui bibliografia

1. HTLV-1. 2. Carga Proviral. 3. Ceratoconjuntivite Seca. I. Título

CDU: 616.98

FOLHA DE APROVAÇÃO TESE DE DOUTORADO

Cristina de Castro Lima Vargens Sena. **Vírus Linfotrópico de Células T Humana tipo 1 (HTLV-1) e sua associação com Ceratoconjuntivite seca no Município de Salvador/Bahia.** Tese apresentada à Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública para obtenção do título de Doutora em Medicina.

Aprovada em: 28 de outubro de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Dayse Cury de Almeida

Prof^a. da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

Doutora em Medicina e Saúde Humana pela Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

Prof^a. Dra. Ceuci de Lima Xavier Nunes

Prof^a. da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

Doutora em Medicina Interna pela Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Eduardo Ferrari Marback

Prof. de Oftalmologia da UFBA

Doutor em Oftalmologia pela UNIFESP

Prof^a. Dra. Fernanda Pedreira Magalhães

Prof^a do Instituto Brasileiro de Oftalmologia e Prevenção a Cegueira

Doutora em Oftalmologia pela UNIFESP

Prof. Dr. Claudilson José de Carvalho Bastos

Prof. do Curso de Medicina da FTC

Doutor em Medicina e Saúde Humana pela Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

Dedico esse trabalho aos meus pais, Rogerio e Silvia, que sempre me deram as ferramentas para o meu crescimento pessoal e profissional: exemplo e oportunidade.

E a Paulo Vinicius, Leonardo e Felipe, que dão todo significado às minhas conquistas...

AGRADECIMENTOS

A Dr. Bernardo Galvão Castro Filho e a Dra. Maria Fernanda Rios Grassi, meus orientadores, que com experiência, dedicação e muita sensibilidade me conduziram no caminho desafiador, mas sempre estimulante, da pesquisa clínica.

A Dr. Ney Cristian Amaral Boa Sorte pela colaboração fundamental na análise dos dados e pelas sugestões preciosas que enriqueceram esse trabalho.

A Ramon Kruchevsky por realizar a avaliação neurológica dos pacientes, Noilson Lazaro pelo apoio técnico e Viviana Nila Olavarria pela realização das cargas pró-virais.

Aos médicos residentes do IBOPC pelo apoio no atendimento oftalmológico dos pacientes.

Aos pacientes portadores de HTLV-1 do Centro de HTLV da EBMSP, pela paciência, compreensão e disponibilidade em participar desse trabalho.

Aos colegas e professores da pós-graduação da EBMSP, agradeço pelos ensinamentos, apoio e companhia, que tornou essa jornada muito mais prazerosa.

“Agir, eis a inteligência verdadeira. Serei o que quiser. Mas tenho que querer o que for. O êxito está em ter êxito, e não em ter condições de êxito. Condições de palácio tem qualquer terra larga, mas onde estará o palácio se não o fizerem ali?”

Fernando Pessoa

INSTITUIÇÕES ENVOLVIDAS

EBMSP – Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

FBDC – Fundação Bahiana para o Desenvolvimento das Ciências

FIOCRUZ – Bahia – Fundação Oswaldo Cruz – Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz

IBOPC – Instituto Brasileiro de Oftalmologia e Prevenção à Cegueira

FONTES DE FINANCIAMENTO

FAPESB – Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

LISTA DE ABREVIATURAS

ATL: *Adult T-cell Leukemia* (Leucemia de células T do Adulto)

CCS: Ceratoconjuntivite Seca

CTL: *Cytotoxic T Lymphocytes* (Linfócitos T Citotóxicos)

CPV: Carga Proviral

DNA: Ácido Desoxirribonucléico

EBMSP: Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

FAN: Fator Antinuclear

FR: Fator Reumatóide

HAM-TSP: *HTLV Associated Myelopathy – Tropical Spastic Paraparesias* (Mielopatia Associada ao HTLV – Paraparesia Espástica Tropical)

HIV: *Human Immunodeficiency Virus* (Vírus da Imunodeficiência Humana)

HTLV: *Human T Lymphotropic Virus* (Vírus Linfotrópico de Células T humana)

IgG: Imunoglobulina G

IL: Interleucina

LLTA: Leucemia/ Linfoma de células T do Adulto

MMP: *Matrix metalloproteinase*

NK: Células *Natural Killer*

OSDI: *Ocular Surface Disease Index* (Índice de Doença da Superfície Ocular)

PBMC: *Peripheral Blood-Mononuclear Cells* (Células Mononucleares Periféricas)

RNA: Ácido Ribonucléico

UAH: Uveíte Associada ao HTLV-1

TBUT: *Tear Break Up Time* (Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal)

TNF- α : *Tumor Necrosis Factor alpha* (Fator de Necrose Tumoral alfa)

Treg: Células T regulatórias

RESUMO

Introdução: O Vírus Linfotrópico para células T tipo 1 (HTLV-1) é endêmico em várias regiões do mundo, incluindo o Brasil. Esse vírus está relacionado a algumas doenças oftalmológicas, como a uveíte associada ao HTLV-1 (UAH) e a ceratoconjuntivite seca (CCS). Doença de caráter multifatorial, a CCS causa instabilidade do filme lacrimal, com potencial dano a superfície ocular. Essa tese abordará a relação entre ceratoconjuntivite seca (CCS) e sua associação com o (HTLV-1) e será apresentada na forma de artigos científicos.

Objetivos: Essa tese tem por objetivo identificar a prevalência de CCS nos pacientes com HTLV-1, associar CCS com a carga proviral e avaliar o desempenho dos testes para diagnóstico de CCS realizados no centro de HTLV-1. **Métodos:** Em estudo de corte-transversal, foram avaliadas três amostras de pacientes com HTLV-1 em momentos diferentes. Todos os pacientes foram submetidos a um exame oftalmológico que incluiu a avaliação do filme lacrimal através do TBUT, teste de Schirmer 1 e coloração com Rosa Bengala. Foi realizada medida da carga proviral (CPV) através de PCR e avaliada sintomatologia de CCS através do questionário OSDI. **Resultados:** As prevalências de CCS nas três amostras estudadas variaram de 36,4 a 52,1%. A média da CPV nos pacientes com CCS apresentou significância estatística ($p = 0,001$) em relação à média dos pacientes sem CCS e foi demonstrado que pacientes com CPV maior que 100.000 cópias/ 10^6 PBMC têm um risco significativamente maior de desenvolver CCS. OSDI e TBUT realizados juntos mostraram uma sensibilidade de 99,5% e o teste de Schirmer 1 uma especificidade de 100%.

Conclusões: Ao final desse estudo, foi encontrada uma elevada prevalência de CCS em pacientes portadores de HTLV-1, além de uma associação positiva com a presença de Paraparesia Espástica Tropical – Mielopatia Associada ao HTLV (HAM-TSP). Além disso, a carga proviral do HTLV-1 foi maior em pacientes com CCS, podendo representar um marcador biológico dessa doença. Foi possível concluir também que, para o diagnóstico acurado de CCS, é necessário o emprego de mais de um teste positivo e há necessidade de acrescentar um questionário de sintomatologia à rotina dos pacientes.

Palavras-Chave: HTLV, ceratoconjuntivite seca, carga proviral, testes diagnósticos.

ABSTRACT

Introduction: The Human T-cell Lymphotropic Virus type 1 (HTLV-1) is associated with HTLV-1 associated uveitis (HAU) and keratoconjunctivitis sicca (KCS). KCS is a multifactorial disease that may cause damage to the ocular surface. **Propose:** The objectives of this thesis are to identify the prevalence of KCS in patients with HTLV-1 and to evaluate the association between KCS and increased HTLV proviral load. In addition, propose an algorithm for diagnose KCS in patients with HTLV-1. **Methodology:** All patients had HTLV-1 diagnose. A lacrimal film evaluation with TBUT, Schirmer test I and Rose Bengal staining was performed. The proviral load was measured and the OSDI questionnaire for dry eye symptomatology was applied. **Results:** KCS prevalence ranged from 36.4 to 52.1%. The mean of HTLV-1 proviral load in KCS patients was significantly higher than the mean of HTLV-1 proviral load in patients without KCS. Patients with a proviral load > 100,000 copies/106 PBMC had a significantly increased risk of developing KCS. OSDI and TBUT performed together showed 99.5% sensitivity and Schirmer test I 100% specificity. **Conclusion:** This study demonstrated high prevalence of KCS in patients with HTLV-1 and also positive association with the presence of paraparesis Tropical Spastic - associated myelopathy (HAM-TSP) and a proviral load of HTLV-1 over 100,000 copies. In addition, it was possible to propose an algorithm for accurate KCS diagnosis, including a symptomatology questionnaire and reserving a Rose Bengal staining for some patients.

Keywords: HTLV, keratoconjunctivitis sicca, proviral load, diagnose tests.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	14
3. REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1. O HTLV-1 e Doenças Associadas	15
3.1.1. Carga Proviral	16
3.2. A Ceratoconjuntivite Seca	17
3.2.1. O Filme Lacrimal e Suas Alterações	17
3.2.2. Prevalência	18
3.2.3. Diagnóstico e Quadro Clínico da CCS	18
3.2.4. Ceratoconjuntivite seca e HTLV-1	20
4. PACIENTES E MÉTODOS	22
4.1. Critérios de Inclusão	22
4.2. Critérios de Exclusão	22
4.3. Avaliação Oftalmológica	22
4.4. Carga Proviral	24
4.5. Critérios Diagnósticos	24
5. ÍNDICE DE ARTIGOS CIENTÍFICOS	25
6. DISCUSSÃO	49
7. LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS	53
8. CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS	56
ANEXOS	63

1. INTRODUÇÃO

Alterações oftalmológicas vêm sendo relacionadas ao vírus linfotrófico de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1) desde 1992. Nesse ano, foi descrita a primeira evidência de associação entre HTLV-1 e uveítes idiopáticas ao ser detectada, em tecidos oculares e em clones de células T no humor aquoso de pacientes infectados, a presença de DNA pró-viral e RNA de HTLV-1 (Mochizuki e col., 1992). Desde então, alguns estudos vêm apontando também a associação de Ceratoconjuntivite seca (CCS) ao HTLV-1. Em 1996, na Martinica, foi observada uma prevalência de 48,4% de CCS numa amostra de 93 pacientes com HTLV-1, dentre os quais 70 eram portadores de HAM-TSP (Merle e col., 1996).

Em Salvador, capital do estado da Bahia onde foi realizado esse estudo, foi estimado que cerca de 50.000 pessoas estivessem infectadas pelo HTLV-1, com dados de prevalência variando entre 1,8% a 1,35% da população geral (Dourado e col., 2003; Moreira Jr. e col., 1993; Galvao-Castro e col., 1997). Recentemente, alguns estudos vêm sendo desenvolvidos a fim de caracterizar as patologias oculares associadas ao HTLV-1 nessa região.

Esse estudo aborda a associação do HTLV-1 com a CCS. Essa condição apresenta sintomas de desconforto ocular, turvação visual e instabilidade do filme lacrimal com potencial dano a superfície ocular, sendo mais prevalente em mulheres acima de 50 anos (Schein e col., 1997; Schaumberg e col., 2003). A CCS é uma condição que pode limitar a capacidade produtiva, diminuir a qualidade de vida, havendo a necessidade de prevenção e apoio aos pacientes afetados (Miljanovi-ç e col., 2007). Apesar de ser uma das doenças oftalmológicas mais prevalentes (Brewitt e Sistani, 2001), a CCS se mantém desafiadora no que diz respeito ao seu diagnóstico. Embora uma gama de testes esteja disponível, não existe um padrão-ouro para essa condição e a busca por um protocolo de diagnóstico que seja acessível e eficiente se torna necessária.

O HTLV-1 está associado a um espectro de doenças, entre elas mielopatia associada ao HTLV/ paraparesia espástica tropical (HAM-TSP), Leucemia/ Linfoma de células T do Adulto (LLTA) (Yoshida e col., 1982) e a uveíte associada ao HTLV (UAH) (Mochizuki e col., 1992), porém, só uma minoria (5%) dos pacientes desenvolve alguma dessas doenças ao longo da vida (Manns e col., 1999). A associação recente entre carga proviral elevada e doenças associadas ao HTLV-1, como HAM-TSP, estimula a realização de estudos que possam identificar carga proviral como marcador prognóstico do HTLV-1. Um aumento na

carga proviral foi observado em pacientes com doenças associadas ao HTLV-1, especialmente aqueles com HAM-TSP (Nagai e col., 1998; Olindo e col., 2005; Silva e col., 2007; Grassi e col., 2011), dermatite infecciosa (Primo e col., 2009), e uveíte (Ono e col., 1995). Em Salvador, foram analisados 30 pacientes infectados pelo HTLV-1, para os quais foi observada uma média de carga proviral aumentada nos pacientes com diagnóstico de CCS (125.891 cópias/ ml), quando comparados aos pacientes com função lacrimal preservada (57.555 cópias/ ml), porém sem significância estatística (Ferraz-Chaoui e col., 2010).

O presente estudo procura avaliar o papel da carga proviral do HTLV-1 no desenvolvimento da CCS, informação que pode trazer mais luz à desconhecida patogênese da CCS nestes pacientes. Além disso, traz novos dados referentes à relação entre HTLV-1 e CCS, quanto a sua prevalência e diagnóstico em pacientes portadores atendidos no Centro Integrativo e Multidisciplinar de HTLV da EBMSP.

2. OBJETIVOS

- Identificar a prevalência de CCS em pacientes portadores de HTLV-1.
- Avaliar a associação entre CCS e elevação da carga proviral (CPV) em pacientes portadores de HTLV-1.
- Avaliar a acurácia dos testes diagnósticos para CCS (TBUT, teste de Schirmer e Rosa Bengala) realizados no centro de HTLV-1.
- Propor um algoritmo para o diagnóstico de CCS em pacientes infectados pelo HTLV-1.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. O HTLV-1 e Doenças Associadas

O HTLV-1 pertencente à família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretroviridae* e ao gênero *Deltaretrovirus* foi primeiramente identificado em uma linhagem de células linfoblastóides provenientes de um paciente com linfoma cutâneo de células T (Poiesz e col., 1980). Logo em seguida, o HTLV-2 foi isolado de células obtidas de paciente com tricoleucemia (Kalyanaraman e col., 1982).

O HTLV-1 foi detectado pela primeira vez no Brasil em imigrantes japoneses em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, em 1986 (Kitagawa e col., 1986). A maior parte das informações sobre a prevalência do HTLV-1 nas regiões brasileiras foi originada de grandes estudos envolvendo doadores de sangue. Em 1997, cinco mil doadores foram avaliados em estudo desenvolvido pelo Ministério da Saúde e que envolveu cinco capitais de quatro regiões brasileiras, tendo grande heterogeneidade nas prevalências: 0,1% em Manaus e Florianópolis, 0,33% em Recife e Rio de Janeiro e 1,35% em Salvador (Galvao-Castro e col., 1997). Um outro estudo realizado previamente já indicava Salvador como a cidade com uma das maiores prevalências no Brasil, com uma taxa de 1,8% em doadores de sangue (Moreira Jr. e col., 1993). Mais recentemente, foram avaliados doadores de sangue das vinte e sete maiores regiões metropolitanas do país, encontrando maior prevalência de infecção pelo HTLV-1 em São Luís, no Maranhão (10,0/1000 habitantes) e em Salvador (9,4/1000 habitantes) (Catalan-Soares e col., 2005).

As patologias incontestavelmente associadas ao HTLV-1 são a Paraparesia Espástica Tropical ou Mielopatia Associada ao HTLV-1 (HAM-TSP), a Leucemia/ Linfoma de células T do Adulto (LLTA) (Yoshida e col., 1982) e a Uveíte associada ao HTLV (UAH) (Mochizuki e col., 1992).

Nessa tese comparamos alguns resultados encontrados nos pacientes com diagnóstico de HAM-TSP e os assintomáticos. A paraparesia espástica tropical é uma síndrome de etiologia desconhecida descrita no Caribe desde 1956, porém só quase três décadas depois, em 1985, Gessain e colaboradores na Martinica descreveram sua associação ao HTLV-1 (Gessain e col., 1985). No Japão, Osame e colaboradores, em 1986, também associaram o HTLV-1 com uma doença neurológica crônica, similar a paraparesia espástica tropical,

denominada mielopatia associada ao HTLV-1 (HAM) (Osame e col., 1986). Em 1988, constatou-se que as duas patologias eram semelhantes (Roman e Osame, 1988).

As alterações oftalmológicas associadas ao HTLV-1 são assunto desse estudo. Classicamente o HTLV-1 está relacionado à uveíte: um processo inflamatório intra-ocular comprometendo totalmente a úvea ou uma de suas estruturas (íris, corpo ciliar e coróide). As uveítes por HTLV-1 caracterizam-se por início agudo, afetando um ou ambos os olhos, com episódios de recorrência, de localização intermediária, com vasculite retiniana e bom prognóstico visual com o uso da corticoterapia tópica e/ou sistêmica (Mochizuki e col., 1996). No Brasil, foi observada prevalência de 2,8% de uveítes em portadores de HTLV-1 (Yamamoto e col., 1999). Em 1995, Pinheiro e colaboradores estudaram 55 pacientes com uveítes idiopáticas evidenciando uma soroprevalência para HTLV-1 de 3,7% (Pinheiro e col., 1995). Em 2000, foram analisados 55 portadores assintomáticos e 17 pacientes com HAM-TSP, sendo constatada 11,8% de uveíte no grupo com HAM-TSP e nenhum caso nos portadores assintomáticos (Soares e Moraes., 2000). Além das uveítes, outras alterações oftalmológicas vêm sendo associadas ao HTLV-1, como a ceratite intersticial e a ceratoconjuntivite seca, objetivo dessa tese (Merle e col., 2001; Merle e col., 2002).

3.1.1 Carga Proviral

A carga proviral indica a proporção de células mononucleares do sangue periférico, PBMCs, que carregam uma cópia integral do DNA viral. Estudos recentes sugerem que a CPV do HTLV-1 exerça um papel importante no desenvolvimento de patologias em pacientes portadores. Foi demonstrado que a elevação da carga proviral do HTLV-1 está associada à HAM-TSP (Nagai e col., 1998; Olindo e col., 2005; Silva e col., 2007; Grassi e col., 2011) e existem evidências de que também esteja associada a outras patologias nos portadores de HTLV-1, como dermatite infecciosa (Primo e col., 2009), ATL (Okayama e col., 2004), artrite reumatóide e outras doenças do tecido conectivo (Yakova e col., 2005). Embora a carga proviral, por si só, não seja suficiente para causar doença, ela foi considerada um marcador útil no monitoramento de resposta terapêutica (Olindo e col., 2005).

3.2. A Ceratoconjuntivite Seca

3.2.1 O Filme Lacrimal e suas Alterações

O filme lacrimal recobre a superfície anterior do olho e possui três camadas: aquosa, lipídica e mucosa. As funções do filme lacrimal incluem limpeza da superfície ocular com ação antimicrobiana, lubrificação e transporte de oxigênio e nutrientes para o epitélio corneano, além de formar a superfície óptica mais anterior do olho. Sendo assim, filme lacrimal e superfície ocular formam um sistema complexo e estável do qual o olho depende para manter uma boa visão (Lemp e Foulk, 2007).

A ceratoconjuntivite seca ou síndrome do olho seco é uma doença multifatorial do filme lacrimal e superfície ocular que cursa com desconforto ocular e alteração visual, podendo levar a dano na superfície ocular (Lemp e Foulk, 2007). Essa patologia resulta da perda qualitativa ou quantitativa de qualquer uma das camadas do filme lacrimal. Sendo assim, é necessária uma quantidade suficiente de lágrima, a sua composição equilibrada, o fechamento normal das pálpebras, além do ato de piscar regular. Outros fatores, como alterações patológicas das pálpebras, córnea ou conjuntiva, também podem levar a um distúrbio da função normal do filme lacrimal (Brewitt e Sistani, 2001).

Cada vez mais a ceratoconjuntivite seca vem sendo considerada uma doença inflamatória. A hiperosmolaridade do filme lacrimal causa dano no epitélio da superfície ocular através da ativação de uma cascata de eventos inflamatórios envolvendo citocinas inflamatórias como IL-1, TNF e MMP-9 (Luo e col., 2004). Tanto a diminuição na produção aquosa (olho seco por deficiência aquosa) quanto um aumento na sua evaporação (olho seco evaporativo) podem levar ao aumento da osmolaridade da lágrima e, conseqüentemente, à inflamação da superfície ocular. A deficiência aquosa é secundária a uma falência na secreção lacrimal, e pode estar relacionada ou não à síndrome de Sjögren. A diminuição da produção aquosa pela glândula lacrimal principal geralmente resulta de doenças infiltrativas que levam à fibrose do tecido glandular. Quando a disfunção lacrimal é devido à inflamação e infiltração da glândula, mediadores inflamatórios produzidos nela vão ser depositados na superfície ocular através da lágrima (Zoukhri, 2006). A deficiência aquosa não-Sjögren geralmente se apresenta como olho seco relacionado à idade ou pode ser secundária a infiltração glandular por linfomas, neurofibromas, infecções virais e sarcoidose (Lemp e Foulk, 2007).

3.2.2 Prevalência de CCS

A CCS tem se mostrado mais prevalente em pessoas em idade mais avançada, principalmente mulheres.

Em estudo de base populacional na cidade de Salisbury, nos Estados Unidos, realizado em 2.520 pacientes acima de 65 anos, foi identificada uma prevalência de 14,6% de pacientes com sintomas freqüentes de olho seco. Extrapolando esse dado para a população americana, estima-se que cerca de 4,3 milhões de americanos sofrem com os mesmos sintomas (Schein e col., 1997).

O estudo de coorte Beaver Eye Study, nos Estados Unidos, acompanhou 2.414 indivíduos, de 48 a 91 anos, identificando uma incidência de 13,3% de CCS. A incidência aumentou com a idade, passando de 10,7% em pacientes de 48 a 59 anos para 17,9% em pacientes com 80 anos ou mais. A incidência de CCS também foi maior em mulheres (14,7%) quando comparada aos homens (11,7%), porém após o ajuste para a idade essa diferença não apresentou significância estatística ($p = 0,06$) (Moss e col., 2004).

Em 2002, foi realizado estudo com 39.876 mulheres americanas, no qual foi observada uma prevalência geral de 6,7% de CCS. A prevalência foi maior com o aumento da idade, passando de 5,7% nas mulheres com menos de 50 anos para 9,8% em mulheres com 75 anos ou mais. Baseado nesses números foi estimado a existência de 3,2 milhões de mulheres americanas com 50 anos ou mais portadoras de CCS (Schaumberg e col., 2003).

No Brasil, e particularmente em Salvador, a ausência de dados de prevalência da CCS na população geral dificulta o real dimensionamento dessa patologia em nosso meio.

3.2.3 Diagnóstico e Quadro Clínico da CCS

Nesse estudo avaliamos a acurácia dos exames que estão sendo utilizados para o diagnóstico de ceratoconjuntivite seca nos pacientes com HTLV-1. O olho seco pode ser diagnosticado através dos seguintes critérios: 1) sinais e sintomas; 2) anormalidades na dinâmica lacrimal, através do teste de Schirmer e do tempo de ruptura do filme lacrimal; 3) dano na superfície ocular, pelos testes de coloração pela fluoresceína e com o corante Rosa Bengala; e 4) medida da osmolaridade da lágrima. Embora estes elementos estejam presentes na maioria dos casos de olho seco, na prática clínica observa-se que há pacientes com

sintomas, porém com mínimo dano ocular, ou sinais de dano na ausência de sintomas. Além disso, comparando os estudos de olho seco observa-se que não há um consenso no uso desses critérios para o diagnóstico da doença (Khanal, 2008).

Questionários para avaliação da sintomatologia do olho seco têm sido desenvolvidos e, em geral, incluem perguntas quanto ao tipo de queixas vivenciadas pelo paciente (ressecamento, sensação de corpo estranho, ardor, hiperemia, dificuldade para abrir os olhos pela manhã), a frequência de ocorrência dessas queixas (raramente, algumas vezes, freqüentemente e diariamente) e quanto ao uso de lubrificantes oculares (Vitali e col., 1994; Bron, 2001). Desde que foi desenvolvido em 1997 pelo Outcomes Research Group (Allergan Inc., Irvine, CA) (Walt e col., 1997), *The Ocular Surface Disease Index (OSDI)* é um dos questionários mais utilizados em pesquisa clínica. O questionário consiste em 12 perguntas que avaliam sintomas, limitações funcionais e fatores ambientais relacionados à síndrome do olho seco. O OSDI avalia o olho seco de uma maneira simples e rápida e com um baixo custo. Embora esse instrumento tenha sido considerado confiável para avaliação do olho seco, os escores do OSDI não se correlacionam bem com os testes clínicos para olho seco. Especificamente, correlações entre o questionário OSDI e o tempo de ruptura do filme lacrimal (*Tear Break Up Time – TBUT*), teste de Schirmer, lissamina verde, e coloração com fluoresceína no pior olho variaram e nenhuma correlação foi estatisticamente significativa (Schiffman e col., 2000).

Os testes diagnósticos utilizados nesse estudo foram: TBUT, Teste de Schirmer I e a coloração pelo corante Rosa Bengala. O TBUT é ideal para avaliação da instabilidade do filme lacrimal e é feito contando o intervalo de tempo entre o último piscar e o aparecimento de um ponto seco no filme lacrimal, sendo um intervalo menor que 10 segundos considerado sugestivo de olho seco. No teste de coloração pela fluoresceína o corante irá se depositar nas áreas onde o epitélio corneano encontra-se lesionado, sendo analisadas cinco regiões da córnea (superior, inferior, nasal, temporal e central) e quatro regiões da conjuntiva (superior, inferior, nasal e temporal). Cada região é graduada em uma escala de 0 a 4, e determinado o escore total através do somatório de todas as regiões. É considerado anormal um escore maior ou igual a três. Esse teste normalmente revela uma coloração característica e está confinada a área interpalpebral exposta da superfície ocular, porém em casos mais severos, a coloração pode se estender a áreas não expostas, particularmente na conjuntiva bulbar superior (Bron, 2001; Nichols e col., 2003).

O teste de Schirmer I é o teste mais simples para avaliar produção lacrimal, embora possa estar afetado por condições ambientais, como temperatura e umidade. Pode ser realizado com ou sem a instilação de colírio anestésico, analisando respectivamente a secreção lacrimal basal e reflexa, embora se saiba que existem outros estímulos sensoriais e psicológicos envolvidos na secreção lacrimal reflexa além do estímulo conjuntival (Yamane e Camara, 1990). Embora ocorram divergências entre os autores, em geral, o teste é considerado alterado se a secreção observada for menor ou igual a 5 mm para o Schirmer I com anestésico e menor ou igual a 10 mm sem anestésico (Bron, 2001; Nichols e col., 2003).

A Rosa Bengala é um corante derivado da fluoresceína e cora células lesadas e mortas, assim como o muco, sem, no entanto, penetrar em defeitos epiteliais. A solução a 1% é instilada no fórnice conjuntival inferior, precedida de anestesia tópica. Posteriormente, o número de pontos vermelhos presentes na conjuntiva nasal e lateral e na córnea são contados e a somatória das três áreas avaliadas for superior ou igual a 4 o teste é considerado positivo (van Bijsterveld, 1969; Vitali e col., 1994; Yamane e Camara, 1990).

3.2.4. Ceratoconjuntivite seca e HTLV-1

A associação entre o vírus HTLV-1 e a CCS começou a ser descrita no final dos anos 80 em pacientes com uma síndrome tipo-Sjögren (Vernant e col., 1988; Green e col., 1989). Em um grupo de pacientes com mielopatia associada ao HTLV foi descrito um infiltrado de células mononucleares na glândula salivar, demonstrando que o HTLV-1 está envolvido na patogênese da CCS em pacientes de áreas endêmicas (Nakamura e col., 1997). Porém, a ausência de alterações imunológicas relacionadas a doenças reumatológicas faz da CCS associada ao HTLV-1 uma entidade diferente da síndrome de Sjögren primária (Merle e col., 1999; Ferraz-Chaoui e col., 2010).

Estudo de prevalência de CCS em pacientes com HTLV vem sendo realizados no Brasil e em outras regiões do mundo. Em 1999, Yamamoto e colaboradores observaram em São Paulo uma prevalência 2,8% de CCS em pacientes infectados pelo HTLV-1, porém esse estudo foi realizado em pacientes sem HAM-TSP (Yamamoto e col., 1999). Em 2002, estudo realizado na Martinica avaliando 200 indivíduos infectados pelo HTLV-1, encontrou uma prevalência de 37% de CCS (Merle e col., 2002). Em Minas Gerais, a prevalência de CCS foi de 54,5% em pacientes com HAM-TSP, 20,3% em portadores assintomáticos e 12,7% nos indivíduos-controle (Pinheiro e col., 2006).

No que diz respeito à associação entre carga proviral e alterações oftalmológicas, ainda há poucos estudos realizados. Em 1995, foi realizado estudo demonstrando que a carga proviral em portadores de uveíte secundária ao HTLV-1 era mais alta que em portadores assintomáticos (Ono e col., 1995). Confirmando esses achados, foi realizado estudo avaliando pacientes com artrite reumatóide ou doenças do tecido conectivo, incluindo a Síndrome de Sjögren, encontrando carga proviral circulante mais alta que em portadores assintomáticos e similar à dos portadores de HAM-TSP (Yakova e col., 2005). Já Olindo e colaboradores, investigando pacientes com HAM-TSP, não encontraram associação entre carga proviral alta e a presença de alterações oculares (CCS, uveítes e ceratites) ou associação com a presença de alterações nas biópsias de glândulas salivares avaliadas pela escala de Chisholm (Olindo e col., 2005; Chisholm e Mason, 1968). Em Salvador, Bahia, foi descrito que pacientes com HTLV-1 com CCS tiveram uma carga proviral mais alta do que os portadores assintomáticos, porém nenhuma significância estatística foi observada (Ferraz-Chaouí e col., 2010).

4. PACIENTES E MÉTODOS

Nesse trabalho foram avaliadas 3 amostras de pacientes em momentos diferentes entre junho de 2004 e outubro de 2013. Para o primeiro artigo foram avaliados 140 pacientes, no segundo 104 pacientes e no terceiro 96 pacientes. Os pacientes que já freqüentavam o Centro Integrativo e Multidisciplinar de HTLV e Hepatites Virais da EBMSP foram convidados por telefone para a consulta oftalmológica. Os pacientes novos no referido Centro foram convidados a participar no momento da primeira consulta. Todos foram informados sobre o projeto e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (*vide* modelo **Anexo 1**). Todos já tinham sorologia para HTLV realizada no próprio Centro com os métodos ELISA e Western Blot (este último quando necessária a confirmação). A avaliação da carga proviral foi realizada em todos os pacientes da segunda amostra.

4.1. Critérios de Inclusão

- Pacientes com sorologia positiva para HTLV, de acordo com algoritmo recomendado pelo Ministério da Saúde do Brasil (Brasil, Ministério da Saúde, 2003) e que concordaram em assinar o TCLE.

4.2. Critérios de Exclusão

- Pacientes com sorologia positiva para HIV e/ou Hepatite C;
- Pacientes portadores de CCS secundária a outras doenças diagnosticadas previamente como alterações palpebral, infecções oculares crônicas, cirurgias refrativas, doenças do colágeno e uso de lentes de contato.

4.3. Avaliação Oftalmológica

Os pacientes foram submetidos a um exame oftalmológico completo, que incluiu a avaliação do filme lacrimal. Foi realizado:

- Refração (com prescrição de lentes corretoras se necessário) e medida da Acuidade Visual
- Biomicroscopia anterior
- Tonometria de Aplanção
- Fundoscopia
- Testes específicos para diagnóstico de CCS:
 1. OSDI (*Ocular Surface Disease Index*): questionário que consiste em 12 perguntas relacionadas à presença e intensidade de sintomas de olho seco (**Anexo 2**). Para cada pergunta é estipulado um valor de 0 a 4. Posteriormente todos os valores são somados e esse subtotal é multiplicado por 25 e dividido pelo número de questões respondidas. O valor final desse cálculo é lançado em uma escala de cores que representa a intensidade dos sintomas: normal, leve, moderado e grave.
 2. Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal (*TBUT – Tear Break Up Time*): instila-se 25µl de solução de fluoresceína a 1% no fornix inferior de cada olho, solicitando ao paciente que pisque e contando o intervalo de tempo entre o piscar e o aparecimento de um ponto seco no filme lacrimal, considerando positivo um intervalo menor que 10 segundos.
 3. Teste de Schirmer I sem anestesia: realizado com a introdução de uma das extremidades de uma tira milimetrada de papel de Whartman número 41 (5 mm de largura por 35 mm de comprimento) no fórnice inferior da conjuntiva, observando-se em 5 minutos quantos milímetros do papel foram umidificados pela secreção lacrimal.
 4. Teste de coloração com Rosa Bengala: A solução a 1% é instilada no fórnice conjuntival inferior, precedida de anestesia tópica. Posteriormente, o número de pontos vermelhos presentes na conjuntiva nasal e lateral e na córnea são contados e graduados: 1+, cora esparsamente; 2+ cora densamente; e 3+ cora intensamente e de forma confluyente. Se a somatória das três áreas avaliadas for superior ou igual a 4+ o teste é considerado positivo segundo os critérios de van Bijsterveld (van Bijsterveld, 1969).

4.4. Carga Proviral

Foram coletados 02 tubos com EDTA de 5 ml de sangue periférico. Separados 50 μ l de sangue total para contagem dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. Para as técnicas moleculares foram realizadas alíquotas em 2 tubos com 10⁶ células de PBMC obtido por gradiente de centrifugação Ficoll-Histopaque, para realização da carga proviral. O material coletado para carga viral foi encaminhado para o laboratório da Fiocruz para análise técnica de PCR quantitativo em tempo real (Dehee, 2002).

O diagnóstico de HAM/TSP foi feito pelo neurologista do centro de HTLV-1.

4.5. Critérios Diagnósticos

O diagnóstico de ceratoconjuntivite seca foi definido com a positividade de pelo menos dois dos seguintes exames: Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal (*TBUT*), Teste de Schirmer e coloração com Rosa Bengala (Farris, 1983; Kansky JJ, 2003).

O diagnóstico de HTLV-1 seguiu o algoritmo recomendado pelo Ministério da Saúde do Brasil (Brasil. Ministério da Saúde, 2003): amostras de plasma repetidamente positivas em duplicata pelo ELISA (HTLV-1/HTLV-2 Ab-Capture ELISA Test System, Ortho. Clinical Diagnostic Inc. Raritan, New Jersey, USA) foram confirmadas e discriminadas entre HTLV-1 e HTLV-2 usando Western Blot (HTLV Blot 2.4; Genelabs, Singapore). Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) foi realizada em amostras com resultados indeterminados de acordo com a técnica descrita por Kashima (Kashima, 2006).

A carga proviral do HTLV-1 em PBMC foi determinada no período entre 12 meses antes ou depois do exame oftalmológico pelo método de PCR quantitativo em tempo real usando o ABI Prism 7700 (PE-Applied Biosystems), usando 10⁶ células. O gene da albumina foi utilizado como controle interno. A quantidade de pró-vírus foi calculada pelo número de cópias do HTLV-1 (pol) por 10⁶ células = [(número de cópias de pol) / (número de cópias de β -albumina/2)] 10⁶ (Dehee, 2002).

O diagnóstico de HAM/TSP foi feito de acordo com o protocolo da OMS (Osame, 1990).

5. ÍNDICE DE ARTIGOS CIENTÍFICOS

1. “Ocular lesions in HTLV-1-infected patients from Salvador, State of Bahia: the city with the highest prevalence of this infection in Brazil.”

Rathsam-Pinheiro RH, Boa-Sorte N, Castro-Lima-Vargens C, Pinheiro CA, Castro-Lima H, Galvão-Castro B.

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2009; 42(6).

2. “Keratoconjunctivitis sicca of human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) infected individuals is associated with high levels of HTLV-1 proviral load.”

Castro-Lima-Vargens C, Grassi MFR, Boa-Sorte N, Rathsam-Pinheiro RH, Olavarria VN, de Almeida-Kruschewsky R, Galvão-Castro B.

Journal of Clinical Virology. 2011; 52(3), 177-80.

3. “Proposal of an algorithm for the diagnosis of Keratoconjunctivitis sicca (KCS) in HTLV-1-infected individuals.”

Castro-Lima-Vargens C, Grassi MFR, Boa-Sorte N, Rathsam-Pinheiro RH, Galvão-Castro B.

Objetivo 1: Identificar a prevalência de CCS e outras alterações oculares em pacientes portadores de HTLV-1.

Artigo N° 1: Ocular lesions in HTLV-1infected patients from Salvador, State of Bahia: the city with the highest prevalence of this infection in Brazil.

Rathsam-Pinheiro RH, Boa-Sorte N, Castro-Lima-Vargens C, Pinheiro CA, Castro-Lima H, Galvão-Castro B.

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2009; 42(6).

O objetivo desse trabalho foi estudar oftalmologicamente os pacientes portadores de HTLV-1. Para isso, foi selecionada uma amostra de 140 pacientes, 90 (64,3%) sem sintomas neurológicos e 50 (35,7%) com HAM-TSP.

Avaliamos esses pacientes quanto às queixas oftalmológicas, sendo as principais: baixa acuidade visual (50,0%) e dor/ardor (37,7%). Vinte e dois pacientes (15,7%) não tinham queixas. Quatro pacientes (2,8%) foram diagnosticados com uveíte, desses 2 apresentavam uveíte intermediária e 2 pan-uveíte, sem apresentar diferença estatística entre os grupos com e sem HAM-TSP.

A completa avaliação do filme lacrimal foi realizada em 107 pacientes e encontramos 36,4% de prevalência de CCS, sendo mais freqüente em pacientes com HAM-TSP, quando comparado aos assintomáticos.

Apesar de já ter conhecimento da elevada prevalência de CCS em pacientes com HTLV-1, a partir desse trabalho inicial decidimos estudar melhor essa associação em nossa população do centro de HTLV-1. Em dados não publicados, avaliamos a carga proviral em 49 dos 107 pacientes, sendo 22 com CCS e 27 sem CCS. Nessa avaliação inicial, encontramos uma diferença entre as cargas provirais de $158.534,9 \pm 190.621,1$ (Média \pm DP) no grupo com CCS e $101.063,6 \pm 145.777,2$ no grupo sem CCS, porém sem significância estatística ($p = 0,112$).

Ocular lesions in HTLV-1 infected patients from Salvador, State of Bahia: the city with the highest prevalence of this infection in Brazil

Lesões oculares em pacientes infectados pelo HTLV-1 em Salvador, Estado da Bahia: a cidade com maior prevalência desta infecção no Brasil

Regina Helena Rathsam-Pinheiro^{1,2}, Ney Boa-Sorte², Cristina Castro-Lima-Vargens¹, Carlos Aldir Pinheiro^{1,2}, Humberto Castro-Lima^{1,2,†} and Bernardo Galvão-Castro^{2,3}

ABSTRACT

In order to determine the prevalence of ocular lesions in HTLV-1 infected patients in Salvador Bahia, a transversal study was conducted on 140 HTLV-1 infected patients (90 asymptomatic and 50 tropical spastic paraparesis/HTLV-1-associated myelopathy) between June 2004 and November 2005. The ophthalmological examination included visual acuity measurement, ocular motility, biomicroscopy of the anterior and posterior chambers, intraocular pressure and evaluation of lachrymal secretion. Observation verified 4 (2.8%) out of 140 patients with uveitis (two patients had intermediate uveitis and two had pan-uveitis) and 39 (36.4%) out of 107 patients with keratoconjunctivitis sicca. The prevalence of Keratoconjunctivitis sicca was significantly higher among the TSP/HAM patients (OR age adjusted=3.64; 95%CI 1.59-8.32). Uveitis and corneal opacities were also important findings, indicating the strong need for periodic ophthalmological follow-up in all HTLV-1 subjects.

Key-words: HTLV-1. Ocular lesions. Uveitis. Keratoconjunctivitis sicca. Corneal opacities.

RESUMO

Com o objetivo de determinar a prevalência de lesões oculares, em portadores de HTLV-1 em Salvador, Bahia, foi realizado um estudo transversal em 140 pacientes (90 assintomático e 50 com paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao vírus linfotrópico de células T humanas) entre junho de 2004 e novembro de 2005. O exame oftalmológico incluiu medida da acuidade visual, exame da motilidade ocular, biomicroscopia anterior e posterior, pressão intraocular e avaliação do filme lacrimal. Observamos 4,0 (2,8%) pacientes com uveíte (dois com uveíte intermediária e dois com panuveíte) e 39 (36,4%) pacientes com ceratoconjuntivite seca. A prevalência de Ceratoconjuntivite seca foi significativamente mais elevada entre os pacientes com TSP/HAM (RC ajustada para idade = 3,64; IC 95% 1,59-8,32). As uveítes e opacidades corneanas foram também, patologias importantes, indicando a necessidade de acompanhamento oftalmológico periódico nos portadores de HTLV-1.

Palavras-chaves: HTLV-1. Lesões oculares. Uveítes. Ceratoconjuntivite seca. Opacidades corneanas.

Human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) was identified in 1980³¹. Transmission occurs through sexual contact, blood transfusion and sharing of injection equipment, as well as vertically from mother to child, mainly through breast-feeding^{16,32}. HTLV-1 infection is prevalent in Japan, Melanesia, the Caribbean Islands, Central and South America, as well in some regions of Africa, and it is estimated that 20 million people carry the virus worldwide^{5,24}. This virus is etiologically linked with adult T cell

leukemia (ATL), tropical spastic paraparesis/HTLV-1-associated myelopathy (TSP/HAM), infective dermatitis and uveitis (HTLV-1-associated uveitis [HAU])^{10,15,21,23,29,36}. Many other diseases have been associated with HTLV-1, such as polymyositis, sinusitis, thyroiditis, bronchial alveolar pneumonia, Sjögren's Syndrome, indicating a multisystemic involvement in this infection^{6,32}. Moreover, other ocular lesions can also be associated with HTLV-1, such as keratoconjunctivitis sicca (KCS), corneal lesions and retinal vasculitis^{3,8,17,19,20,30}. Controversial results exist concerning the prevalence of HAU in different parts of the world. For instance, in Japan a 35.4% of HAU prevalence was observed, while in Martinique, the prevalence was 14.5%^{12,18}. In Brazil, the prevalence rate (1.9% to 2.8%) of HAU is lower than that reported in Japan^{30,35}.

Salvador, the capital of the State of Bahia located in the Northeast of Brazil, has the highest prevalence of HTLV-1 in the country⁹. The prevalence of HTLV-1 was 1.7% in a population based study and it was estimated that 40,000 people could be

1. Instituto Brasileiro de Oftalmologia e Prevenção da Cegueira (IBOPC), Salvador-BA.
2. Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP), Salvador, BA. 3. Laboratório Avançado de Saúde Pública, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz (LASP/CPqGM/OFTOCRUZ), Salvador-BA. †Deceased.

Suporte financeiro parcial: CNPq.

Address to: Dr. Bernardo Galvão-Castro. Centro Integrativo e Multidisciplinar de HTLV e Hepatites Virais/Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública. Av. Dom João VI 274, Brotas, 40290-000 Salvador, BA.

Tel: 55 71 3276-8281; Fax: 55 71 3276-8290

e-mail: bgalvao@bahiana.edu.br

Recebido em 30/10/2008

Aceito em 14/10/2009

infected by HTLV-1 in the city⁴. HTLV-1 associated pathologies, such as TSP/HAM ATL and infective dermatitis, have been widely identified in patients from Salvador^{11 27}. However, there have been no studies concerning ocular lesions associated with HTLV-1 infection in this city. Therefore, it is of paramount importance to determine the prevalence of ocular diseases in order to estimate the magnitude of this health problem in Salvador.

MATERIAL AND METHODS

Study design and population. An out-patient cross-sectional study was conducted between June 2004 and November 2005 at the Integrative and Multidisciplinary Center for HTLV and Viral Hepatitis (*Centro Integrativo e Multidisciplinar de HTLV e Hepatites Virais*), Bahia School of Medicine and Public Health (*Escola Babiana de Medicina e Saúde Pública, ECMSP*), Salvador, Bahia, Brazil, where an interdisciplinary project including medical care, laboratory diagnosis, psychological assistance and physiotherapy is being conducted. At the time of the realization of this project 385, HTLV-1 infected patients were well characterized regarding their sociodemographic profile, laboratory diagnosis and clinical status. Most of them were women from low social classes and 110 (30.2%) had TSP/HAM²⁶. All the patients were invited to participate and 140 of them accepted and were enrolled in the study. All the volunteers provided written

informed consent before entering the research protocol. The Ethics Committee of EBMSP approved this study.

Laboratory, clinical and ophthalmologic diagnosis. HTLV-1 infection was assessed according to the algorithm recommended by the Brazilian Ministry of Health²³. Briefly, plasma samples repeatedly positive in duplicate by ELISA (HTLV-1/HTLV-2 Ab-Capture ELISA Test System, Ortho. Clinical Diagnostic Inc. Raritan, New Jersey, USA) were confirmed and discriminated between HTLV-1 and HTLV-2 using Western Blot (HTLV Blot 2.4; Genelabs, Singapore). Polymerase Chain Reaction (PCR) analysis was performed in samples with undetermined results according to the technique described elsewhere¹³. The diagnosis of HAM/TSP was determined according to the WHO guidelines²⁸

A full ophthalmologic examination was performed, including visual acuity measurement by Snellen eye chart, with optical correction, optical motility, applanation tonometry, biomicroscopy of the anterior and posterior chambers, binocular indirect ophthalmoscopy with or without depression, in both eyes and intraocular pressure. Evaluation of tear secretion was performed by BUT (break-up time), Rose Bengal and Schirmer I Tests. The Rose Bengal test was performed with 0.1% solution Rose Bengal staining and was considered pathological when the total score was higher than three points (Van-Bijsterveld score)¹⁴. Scores of ≤ 10 seconds for break-up time and ≤ 5 mm for Schirmer I test were defined as abnormal. Diagnosis of KCS was based upon the presence of symptoms and at least two out of three positive tests²⁴.

Diagnosis of uveitis was defined by the presence of inflammatory cells in any segment of the uveal tract, active or episodes in the past²⁷. The anatomic classification determined

by the International Uveitis Study Group, which classifies uveitis in anterior, intermediate, posterior and panuveitic was used¹⁴. Each uveitis patient underwent serological evaluation for toxoplasmosis, syphilis, cytomegalovirus and HIV. These patients were also examined for signs of sarcoidosis, Behçet's disease and tuberculosis by clinical and X-ray evaluation for differential diagnosis. To confirm conjunctiva, corneal and lens alterations, anterior biomicroscopy was performed, while fundus manifestations were analyzed using posterior biomicroscopy and retinal evaluations.

Statistical analysis. The results were expressed as proportions for categorical variables and means \pm standard deviation (SD) for continuous variables. The statistical tests included the Student t test for independent variables and Pearson chi square or the Fisher Exact test, for comparison of the ocular lesions and sociodemographic data between TSP/HAM patients and asymptomatic HTLV-1 carriers. Symptoms analysis was performed taking into account the patient's median age to verify age effects. Logistic regression was used to adjust the effect of age and gender on the relationship between CCS (dependent variable) and the presence of TSP/HAM (principal independent variable). Differences of $p < 0.05$ were considered statistically significant. All the data were stored and analyzed with Epi Info for Windows®, version 3.2.2.

RESULTS

After informed consent, 140 HTLV-1 positive individuals were enrolled in this study. According to the WHO guidelines²⁸ 50 (35.7%) out 140 had been diagnosed with TSP/HAM and 90 (64.3%) were asymptomatic. The sociodemographic and clinical data are shown in **Table 1**. Most patients described themselves as mulatto (52.2%) or black (31.9%). The majority (64.2%) had not finished primary school and only 35.8% had finished middle school. Regarding their origin and marital status, 85.7% of the patients were from Salvador and 40.3% were single and 38.8% married. Most of the patients were women (65%), aged from 6 to 81 years-old, with a mean of 47.5 (± 14.9) years-old. All of them were submitted to a completed ophthalmologic examination. Concerning the main ocular complaint, 70 (50%) patients reported visual blurring, 52 (37.7%) felt pain/burning, 33 (23.6%) itching, 27 (19.3%) tear flow, 18 (12.9%) foreign body sensation, 9 (6.4%) flying flies and 22 (15.7%) had no ocular complaints. The main ocular complaints were analyzed in both groups of patients stratified by median age (47 years-old). Only the sensation of a foreign body was twice as frequent in patients who were over 47 years of age (17.4% versus 8.5%; $p=0.11$). **Table 2** shows all ocular lesions in HTLV-1 patients. Other adnexal findings included hyperemia, pterygium, pinguecula and conjunctival nevus in 39 (27.9%) patients. Corneal lesions were present in 17.1% of patients with 17 (12.1%) presenting corneal opacities.

Four (2.8%) individuals had anterior chamber alterations, such as fibrin, shallow anterior chamber and iridium pigments, 6 (4.3%) had mild lens opacification, 7 (5%) had pseudophakia, 1 (0.7%) with iris atrophy, 2 (1.4%) with corectopia, and 1 (0.7%) with peripheral iridotomy.

TABLE 1

Sociodemographic and clinical features of the 140 HTLV-1 infected patients recruited for the study, Salvador, Bahia, 2005-2006.

Variables	Number	Percentage
Age* (years)	47.5 ± 14.9	6.81
Clinical Status		
asymptomatic	90	64.3
TSP/HAM	50	35.7
Skin color (self-identified)		
white	22	15.7
mulatto	72	51.4
black	44	31.4
not informed	02	1.5
Education		
≤ 8 years	88	62.9
>8 years	49	35.0
not informed	03	2.1
Marital status		
single	54	38.6
married	52	37.1
divorced	12	8.6
widow	16	11.4
not informed	06	4.3
Place of birth		
Bahia State		
Salvador City	129	85.7
Other cities	19	13.6
Other State	01	0.7
Sex		
male	49	35
female	91	65

TSP/HAM: tropical spastic paraparesis/HTLV-1-associated myelopathy. * expressed by mean ± standard deviation (minimum – maximum).

TABLE 2

Distribution of the ocular lesions of 140 patients examined between June 2004 and November 2005 in the HTLV-1 Center.

Ocular lesions	Number	Percentage
Anterior segment		
conjunctiva	39	27.9
cornea	24	17.1
anterior chamber	5	3.6
lens	13	9.3
Posterior segment		
retina	12	8.6
vitreous	4	2.8
Diagnosis		
keratoconjunctivitis sicca	39	36.4
uveitis	4	2.86
corneal opacities	22	15.7

Concerning the posterior chamber, the following were verified: 1 (0.7%) vitreous cell from a probable sequel of intermediate uveitis, 1 (0.7%) vitreous organization from a probable sequel of panuveitis and 2 (1.4%) posterior vitreous detachment (PVD). Retinal pathologies were seen in 10 (7.1%) patients, 2 (1.4%)

sequelae from chorioretinitis, 2 exudates in patients with diabetic retinopathy and 10 (7.1%) with druses, macular edema, macular pigments and scarce retinal epithelium.

Uveitis was diagnosed in 4 (2.8%) patients, including two with intermediate uveitis and two with panuveitis. No significant differences were determined between the TSP/HAM and asymptomatic groups (Table 3).

Complete tear film evaluation was performed in 107 subjects leading to 39 (36.4%) diagnoses of keratoconjunctivitis sicca (KCS). KCS was more frequent among TSP/HAM patients than in non-TSP/HAM patients (OR=3.88; 95%CI 1.68-8.97). This association remained significant even after adjustment for age and sex (OR=3.35; 95%CI 1.42-7.91).

TABLE 3

Comparison of demographic characteristics and ocular lesions among patients with and without TSP/HAM.

Characteristics	With TSP/HAM n = 50	Without TSP/HAM n = 90	p value
Female	29/50 (58.0%)	62/90 (68.9%)	0.196
Median age	49.9 ± 10.3	46.2 ± 16.8	0.106
Uveitis	1/50 (2.0%)	3/90 (3.3%)	1.00*
KCS**	22/39 (56.4%)	17/68 (25.0%)	0.001

*Fisher Exact Test, **out of 140 patients, 107 were examined for Keratoconjunctivitis sicca, TSP/HAM: tropical spastic paraparesis/HTLV-1-associated myelopathy.

DISCUSSION

In this study, a full ophthalmologic examination was performed on the 140 patients, which verified that 2.8% were suffering from uveitis, 36.4% from KCS and numerous ophthalmologic complaints were reported, confirming previous data^{18,30}. Analysis

the sociodemographic characteristics of these HTLV-1 patients revealed that the great majority had incomplete primary education, were female and were over 40 years-old. This reflects the profile of the population of the HTLV-1 center and the main characteristics of the infection in Salvador, as described previously^{4,26}.

Concerning the ophthalmologic complaints, the most frequent were: visual blurring (50%), pain/burning (37.1%) and itching (23.6%). Foreign body sensation was twice as frequent in patients over 47 years-old (17.4% versus 8.5%; p=0.114). These results are similar to those obtained in previous Brazilian studies and in other geographic regions, such as Martinique and Japan^{18,19,30}. Unfortunately, the lesions in these studies were not quantified and therefore no comparisons can be made.

Regarding uveitis (2 intermediate and 2 panuveitis), the 2.8% prevalence observed is very similar to that found in other regions of Brazil, but much lower than in Japan^{12,30,35}. Additionally, no difference in frequency was observed between patients with and without TSP/HAM, corroborating previous results. Indeed, prevalences of 1.93% and 1.82% in asymptomatic and HAM/TSP individuals, respectively, were observed in the City of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, in the Southeast region of the country³⁰. Only one study reported a prevalence of 11.8% of

uveitis in TSP/HAM patients from Rio de Janeiro, also located in the same geographic region³⁴. However, in this article, only the anterior uveitis was reported, in disagreement with most studies in Brazil and other countries where intermediate uveitis predominates^{20, 30, 35}. In contrast to the prevalence estimates obtained here, Merle et al¹⁸ and Mochizuki et al²³ reported higher prevalence of uveitis in Martinique and Japan, respectively. This conflicting result could be explained by genetic and/or environmental factors. However, it has been demonstrated that even in Japan, the prevalences of both HTLV-1 and HAU vary from the North to the Southwest^{12, 23}.

The 36.4% (39/107) prevalence of KCS in HTLV-1 patients observed in Salvador is similar to the values detected in Minas Gerais, Brazil and Martinica^{18, 30}. However, in São Paulo, Yamamoto et al³⁵ observed a KCS prevalence of 2.8% in infected carriers. This contradictory result could be explained by the fact that these HTLV-1 infected individuals did not have TSP/HAM. Herein, a positive association between the KCS and TSP/HAM was verified, corroborating previous data³⁰. In fact, Pinheiro et al³⁰ demonstrated that KCS prevalence was three times higher in TSP/HAM patients. Moreover, the significant association between KCS and TSP/HAM was maintained even after the adjusting for age and sex. Taken together, these results strongly suggest that HTLV-1 infection is associated with KCS and that the presence of TSP/HAM could influence the frequency of KCS.

We are aware that certain limitations exist in the present work, such as the absence of a HTLV-1 negative control. However, previous data have shown that in relation to KCS, a significant difference exists between HTLV-1 infected and non-infected individuals³¹. Additionally, sampling bias due to nonrandom sample selection could lead to an overestimation of the prevalence determined in this work. Further studies are required to elucidate these geographic differences, as well as the pathogenic mechanisms of KCS.

Finally, based on the results obtained, it is strongly recommend that HTLV-1 patients undergo periodic ophthalmologic examination for early diagnosis and prevention of ocular diseases.

ACKNOWLEDGEMENTS

This article is part of the Masters (MSc) thesis of Regina Helena Rathsam Pinheiro, EBMSP, Postgraduate Course in Medicine and Human Health. The study was partially supported by National Research Council (CNPq).

REFERENCES

- Barbosa HS, Bittencourt AL, Barreto de Araújo I, Perera Filho CS, Furlan R, Pedrosa C, Lessa G, Harrington W Jr, Galvão Castro B. Adult T-cell leukemia/lymphoma in northeastern Brazil: a clinical, histopathologic, and molecular study. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 21:65-71, 1999.
- Bloch-Michel E, Nussenblatt RB. International Uveitis Study Group Recommendation for the evaluation of intraocular inflammatory disease. *American Journal of Ophthalmology* 3:305-308, 2001.
- Buggage RR, Levy-Clarke GA, Smith JA. New corneal findings in human T-cell lymphotropic virus type 1 infection. *American Journal of Ophthalmology* 131: 309-313, 2001.
- Dourado I, Alcântara LC, Barreto ML, Teixeira MG, Galvão-Castro B. HTLV-1 in the general population of Salvador, Brazil: a city with African ethnic and sociodemographic characteristics. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 34:527-531, 2003.
- Edlich RE, Arnette JA, Williams FM. Global epidemic of human T-cell lymphotropic virus type-1 (HTLV-1). *The Journal of Emergency Medicine* 18: 109-119, 2000.
- Eguchi K, Matsuoka N, Ida H, Nakashima M, Sakai M, Sakito S, Kawakami A, Terada K, Shimada H, Kawabe Y, Fukuda T, Sawada T, Nagataki S. Primary Sjogren's syndrome with antibodies to HTLV-1: clinical and laboratory features. *Annals of the Rheumatic Diseases* 51: 769-576, 1992.
- Farris RL, Gilbard JP, Stuchell RN, Mandel ID. Diagnostic Tests in Keratoconjunctivitis Sicca. *The CLAO Journal* 9:23-28, 1983.
- Ferraz-Chaoui AK, Alta AM, Galvão-Castro B, Santiago MB. Study of autoantibodies in patients with keratoconjunctivitis sicca infected by the human T cell lymphotropic virus type 1. *Rheumatology International* 2009 Jul 29. [Epub ahead of print].
- Galvão-Castro B, Loures L, Rodrigues LG, Sereno A, Ferreira Júnior OC, Franco LG, Muller M, Sampalo DA, Santana A, Passos LM, Proietti F. Distribution of human T-lymphotropic virus type 1 among blood donors: a nationwide Brazilian study. *Transfusion* 37:242-243, 1997.
- Gessain A, Barin E, Vernant JC, Gout O, Maurs L, Calender A. Antibodies to human T-lymphotropic virus type 1 in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet* 2:407-410, 1985.
- Gomes I, Melo A, Proietti FA, Moreno-Carvalho O, Loures LA, Dazza MC, Said G, Larouze B, Galvão-Castro B. Human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) infection in neurological patients in Salvador, Bahia, Brazil. *Journal of the Neurological Sciences* 165:84-89, 1999.
- Ikeda E, Ono A, Hikita N, Arima K, Mochizuki M, Yamaguchi K, Tajima K, Kiyokawa H. Estimated prevalence rate of HTLV-1 uveitis in Chikugo. *Nippon Ganka Gakkaï Zasshi* 102:327-332, 1998.
- Kashima S, Alcântara LC, Takayanagi OM, Cunha MA, Castro BG, Pombo-de-Oliveira MS, Zago MA, Covas DT. Distribution of human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) subtypes in Brazil: genetic characterization of LTR and tax region. *AIDS Research and Human Retroviruses* 22:953-959, 2006.
- Kanski JJ. *Clinical Ophthalmology. A Systematic Approach*. 5th edition. Philadelphia: Butterworth Heinemann 5:270-308, 2003.
- La Grenade L, Hanchard B, Fletcher V, Cranston B, Blattner W. Infective dermatitis of Jamaican children: a marker for HTLV-1 infection. *Lancet* 336: 1345-1347, 1990.
- Lestne PH, Blattner WA. The epidemiology of diseases associated with HTLV-1 and HTLV-II. *Infectious Disease Clinics of North America*. 1:501-510, 1987.
- Levy-Clarke G, Buggage R, Shen DF, Vaughn LO, Chan GC, Davis JL. Human T-cell lymphotropic virus type-1 associated T-cell leukemia-lymphoma masquerading as necrotizing retinal vasculitis. *Ophthalmology* 109: 1717-1722, 2002.
- Merle H, Cabre P, Olindo S, Merle S, Smadja D. Ocular lesions in 200 patients infected by the Human T-cell lymphotropic virus type 1 in Martinique (French West Indies). *American Journal of Ophthalmology* 134:190-195, 2002.
- Merle H, Donnio A, Gonin C, Jean-Charles A, Panelatti G, Plumelle Y. Retinal vasculitis caused by adult T-cell leukemia/lymphoma. *Japanese Journal of Ophthalmology* 49:41-45, 2005.
- Merle H, Smadja D, Le Hoang P, Bera O, Cabre P, Landau M, Vernant JC. Ocular manifestations in patients with HTLV-1 associated infection: a clinical study of 93 cases. *Japanese Journal of Ophthalmology* 40:260-270, 1996.
- Mochizuki M. Human T-lymphotropic virus type 1 and its ocular manifestations. *International Ophthalmology Clinics* 107-120, 1995.
- Mochizuki M, Ono A, Ikeda E, Hikita N, Watanabe T, Yamaguchi K, Sagawa K, Ito K. HTLV-1 uveitis. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology* 13 (Suppl 1):S50-56, 1996.
- Mochizuki M, Watanabe T, Yamaguchi K, Takatsuki K, Shirao M, Yoshimura K, Nakashima S, Mori S, Araki S, Myata N. HTLV-1 uveitis: a distinct clinical entity caused by HTLV-1. *Japanese Journal of Cancer Research* 83:236-239, 1992.
- Mueller N. The epidemiology of HTLV-1 infection. *Cancer Causes Control* 2:37-52, 1991.

-
25. Nakao K, Ohba N, Matsumoto M. Noninfectious anterior uveitis in patients infected with human T lymphotropic virus type I. *Japanese Journal of Ophthalmology* 33:472-478, 1989.
 26. Nunes C, Mascarenhas-Batista AV, Malhães D, Brandão JCD, Ferreira TS, Seabra AML. Características Clínicas-Epidemiológicas de 385 pacientes portadores de HTLV na Bahia. In: IX Simpósio Internacional sobre HTLV no Brasil; 2006 Set 19-22, Belo Horizonte, Brasil; *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 39 :71,2006.
 27. Oliveira M de F, Brites C, Ferraz N, Magalhães P, Almeida F, Bittencourt AL. Infective dermatitis associated with the human T cell lymphotropic virus type I in Salvador, Bahia, Brazil. *Clinical Infectious Diseases* 40:90-96, 2005.
 28. Osame M. Review of WHO Kagoshima meeting and diagnostic guidelines for HAM/TSP. In: Blattner W (ed) *Human Retrovirology: HTLV 1st edition*. Raven Press: New York p. 191-197, 1990
 29. Osame M, Matsumoto M, Usuku K, Izumo S, Ijichi N, Amitani H, Tara M, Igata A. HTLV-1 associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet* 1:1031-1032, 1986.
 30. Pinheiro SR, Martins-Filho OA, Ribas JG, Catalan-Soares BC, Proietti FA, Nemen-Lopes S, Brito-Melo GE, Carneiro-Proietti AB, Interdisciplinary HTLV-1/II Research Group (GIPH). **Immunologic markers, uveitis, and keratoconjunctivitis sicca associated with Human T-Cell lymphotropic virus type I.** *American Journal of Ophthalmology* 20: 1-5, 2006.
 31. Polesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. Detection and isolation of type-C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77:7415-7419, 1980.
 32. Proietti FA, Carneiro-Proietti ACE, Catalan-Soares BC, Murphy EL. **Global epidemiology of HTLV-1 infection and associated diseases.** *Oncogene* 24:6058-6068, 2005.
 33. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia do manejo clínico do HTLV (Série A. Normas e Manuais Técnicos n.º 3) Programa Nacional de DST e Aids. – Brasília: Ministério da Saúde, 2003.
 34. Soares R, Moraes Jr H. Manifestações oculares observadas em indivíduos infectados por HTLV-I no Rio de Janeiro. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*. 63:293-298, 2000.
 35. Yamamoto JH, Segurado AA, Hirata CE, Sampaio MW, Souza EC, Nukui Y, Cliquet M, Saéz-Alquézar A, Olivares E, Mochizuki M. Human T-lymphotropic virus type I infection and ocular manifestations in São Paulo, Brazil. *Archives of Ophthalmology* 117: 513-517, 1999.
 36. Yoshida M, Miyoshi I, Hinuma Y. Isolation and characterization of retrovirus from cells lines of human adult T-cell leukemia and its implications in the disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79:2031-2035, 1982.
-

Objetivo 2: Avaliar a associação entre CCS e elevação da carga proviral (CPV) em pacientes portadores de HTLV-1.

Artigo N° 2: Keratoconjunctivitis sicca of human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) infected individuals is associated with high levels of HTLV-1 proviral load.

Castro-Lima-Vargens C, Grassi MFR, Boa-Sorte N, Rathsam-Pinheiro RH, Olavarria VN, de Almeida-Kruschewsky R, Galvão-Castro B.

Journal of Clinical Virology. 2011; 52(3), 177-80.

Após confirmar a associação entre HTLV-1 e CCS em nosso meio, tomamos os dados prévios de carga proviral já descritos anteriormente como estudo piloto e base para o cálculo amostral. Selecionamos uma amostra de 104 pacientes. Desses, 46 pacientes (44,2%) tinham CCS. Cinquenta e dois pacientes (50%) tinham diagnóstico de HAM/TSP e a presença de CCS foi maior nos pacientes com HAM/TSP ($p = 0,022$).

A média da carga proviral do HTLV-1 nos pacientes com CCS foi de 134.672 ± 150.393 cópias/ 10^6 PBMC e apresentou significância estatística em relação à média dos pacientes sem CCS (66.880 ± 109.525 cópias/ 10^6 PBMC), ($p = 0,001$). Apresentamos um modelo completo de regressão logística, que mostrou que pacientes com CPV maior que 100.000 cópias/ 10^6 PBMC têm um risco significativamente aumentado de desenvolver CCS (RC = 4,05 e 95% IC = 1,40 – 11,76). Gênero, HAM/TSP, idade acima de 45 anos e CPV entre 50.000 e 100.000 não se correlacionaram positivamente com risco de desenvolver CCS. No modelo final, foram excluídas as variáveis idade acima de 45 anos e presença de HAM/TSP. Ainda assim, CPV maior que 100.000 cópias/ 10^6 PBMC (RC = 4,77 e 95% IC = 1,83 – 12,44) se manteve estatisticamente significante.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Clinical Virology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jcv

Keratoconjunctivitis sicca of human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) infected individuals is associated with high levels of HTLV-1 proviral load

Cristina Castro-Lima Vargens^{a,*}, Maria Fernanda Rios Grassi^b, Ney Boa-Sorte^b, Regina Helena Rathsam-Pinheiro^{a,b}, Viviana Nilla Olavarria^{b,c}, Ramon de Almeida Kruschewsky^a, Bernardo Galvão-Castro^{b,c}

^a Instituto Brasileiro de Oftalmologia e Prevenção da Cegueira (IBOPC), Salvador, BA, Brazil

^b Centro Integrativo e Multidisciplinar de HTLV, Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP), Salvador, BA, Brazil

^c Laboratório Avançado de Saúde Pública, Centro de Pesquisas Gonçalo Montz, Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, CEP: 40296-710, Salvador, BA, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 May 2011

Received in revised form 15 July 2011

Accepted 20 July 2011

Keywords:

HTLV-1

Ocular lesions

Keratoconjunctivitis sicca

Proviral load

ABSTRACT

Background: A high HTLV-1 proviral load is found in HTLV-1-associated diseases, mainly HAM/TSP. However, the association between proviral load and keratoconjunctivitis sicca (KCS) has not been well established.

Aim: To verify the association between KCS and HTLV-1 proviral load.

Study design: 104 HTLV-1 infected patients (51 asymptomatic and 52 with HAM/TSP) from the HTLV reference center in Salvador, Brazil were followed from June 2008 to May 2010. Evaluation of tear secretion was performed by BUT (break-up time), Rose Bengal and Schirmer I tests. The diagnosis of KCS was based upon the presence of symptoms and when at least two of three tests were positive. HTLV-1 proviral load was determined using real-time PCR.

Results: The prevalence of KCS was 44.2%. KCS was more frequent among HAM/TSP patients ($p=0.022$). Patients with KCS had higher proviral load (mean $134,672 \pm 150,393$ copies/ 10^6 PBMC) than patients without the disease (mean $66,880 \pm 109,525$ copies/ 10^6 PBMC) ($p=0.001$). HTLV-1 proviral load $> 100,000$ copies/ 10^6 PBMC increased significantly the risk of developing KCS (OR = 4.05 and 95% CI = 1.40–11.76). After age > 45 years and HAM/TSP status were excluded in stepwise analysis, the variables PVL $> 100,000$ (OR = 4.77 and 95% CI = 1.83–12.44) still remained statistically significant.

Conclusion: HTLV-1 proviral loads are higher in patients with KCS and may represent a relevant biological marker of disease.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Background

The human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) is etiologically linked with adult T cell leukemia (ATL),¹ tropical spastic paraparesis/HTLV-1-associated myelopathy (HAM/TSP),^{2,3} infective dermatitis⁴ and uveitis (HTLV-1-associated uveitis [HAU]).^{5,6} Several diseases have been also associated with HTLV-1 infection, such as polymyositis, sinusitis, thyroiditis, bronchi alveolar pneumonia, Sjögren syndrome indicating a multi-systemic involvement in this infection.^{7,8}

Abbreviations: ATL, adult T cell leukemia; BUT, break-up time; HAU, HTLV-1-associated uveitis; HTLV, human T-cell lymphotropic virus; KCS, keratoconjunctivitis sicca; TSP/HAM, tropical spastic paraparesis/HTLV-1-associated myelopathy; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; PVL, proviral load.

* Corresponding author at: Centro Integrativo e Multidisciplinar de HTLV, Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Av. Dom João VI, n° 274, Brotas, Salvador, BA 40.290-000, Brazil. Tel.: +55 71 32768281; fax: +55 71 32768290.

E-mail address: bgalvao@bahiana.edu.br (C. Castro-Lima Vargens).

In addition to HAU, keratoconjunctivitis sicca (KCS) has also been described in HTLV-1-infected individuals.^{9–11} KCS causes an eye discomfort, a visual disturbance, and tear film instability with potential damage to the ocular surface.¹² The disease is more prevalent in women in their 50s.^{13,14} In HTLV-1 infected individuals, the prevalence of KCS is higher in patients with HAM/TSP diagnosis, when compared to asymptomatic individuals.¹⁵ A higher HTLV-1 proviral load (PVL) has been found in patients with HTLV-associated diseases, especially HAM/TSP,^{16–19} infective dermatitis,²⁰ and uveitis²¹ compared with proviral load from asymptomatic individuals. A recent study found that patients with KCS who were infected by HTLV-1 had a higher PVL than those without KCS. However, due to its small sample size, no statistically significant differences were observed in the study.²²

2. Objective

This study aims to verify the association between KCS and HTLV-1 proviral load.

3. Study design

3.1. Population

An outpatient cross-sectional study was carried out between June 2008 and May 2010 at the Bahian School of Medicine and Public Health reference center for HTLV, Salvador, Bahia, Brazil, where an inter-disciplinary project including medical care, laboratory diagnosis, psychological assistance and physiotherapy is being carried out. Since 2002, a total of 1070 HTLV-1 infected patients were followed up in the center and 50% of them have been seen at least twice a year. The majority of patients of HTLV center was women, belonged to low social class and 30% had HAM/TSP.²³ Patients were sequentially invited at the moment of medical examination and were eligible if they had the following inclusion criteria: HTLV proviral load available and an ophthalmological exam, including complete tear film evaluation. All volunteers gave written informed consent before entering the research protocol.

3.2. Laboratory, clinical and ophthalmologic diagnosis

The HTLV-1 infection was assessed according to the algorithm recommended by the Brazilian Ministry of Health.²⁴ Plasma samples repeatedly positive in duplicate by ELISA (HTLV-1/HTLV-2 Ab-Capture ELISA Test System, Ortho, Clinical Diagnostic Inc, Raritan, New Jersey, USA) were confirmed and discriminated between HTLV-1 and HTLV-2 using Western Blot (HTLV Blot 2.4; Genelabs, Singapore). Polymerase chain reaction (PCR) analysis was performed in samples with undetermined results according to the technique described by Kashima.²⁵ The diagnosis of HAM/TSP was made according to the WHO guideline.²⁶ All patients had a full ophthalmologic examination in both eyes, including visual acuity measurement by Snellen table with optical correction, optical motility, applanation tonometry, biomicroscopy of the anterior and posterior chambers, binocular indirect ophthalmoscopy with or without depression and intraocular pressure. Evaluation of tear secretion was performed by BUT (break-up time), Rose Bengal and Schirmer I tests. Rose Bengal test was performed with 0.1% solution Rose Bengal staining and was considered abnormal when its

total score was higher than three points (Van-Bijsterveld score).²⁷ Break-up time < 10 s and Schirmer I test < 5 mm were defined as abnormal. The diagnosis of KCS was based upon the presence of symptoms and when at least two of three tests were positive.^{28,29}

3.3. HTLV-1 proviral load

HTLV-1 proviral load was quantified using a real-time TaqMan PCR method, as described previously.³⁰ SK110/SK111 primers were used to amplify a 186 pb fragment of the pol gene and dual TaqMan probe (5' FAM/5' VIC and 3' TAMRA) was located at 4829–4858 bp of the HTLV-1 reference sequence (HTLV_{ATK}). Albumin DNA was used as an endogenous reference. The value of HTLV-1 proviral load was reported as the [(HTLV-1 average copy number)/(albumin average copy number)] × 2 × 10⁶ and expressed as the number of HTLV-1 copies per 10⁶ cells in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). PVL measurements for all patients were performed within a period of time ranging from 12 months prior to, or following, ophthalmologic examination.

3.4. Statistical analysis

Results were expressed as proportions for categorical variables and means ± standard deviation (SD) for continuous variables. The statistical tests used included Student's *t*-test for independent variables and chi-square test for comparison of sex and HAM/TSP between KCS and asymptomatic patients. Mann-Whitney test was

Table 1

Main ocular complaint and diagnosis of keratoconjunctivitis sicca.

Ocular complaint	N	%
Visual blurring	30	28.8
Pain/burning	29	27.9
Itching	15	14.4
Hyperemia	7	6.7
Foreign body sensation	5	4.8
Eyelid tumor	3	2.9
Tear flow	2	1.9
Flying flies	1	1.0
Dryness	1	1.0
No complaints	11	10.6
KCS diagnosis	46	44.2

KCS, keratoconjunctivitis sicca (tear secretion evaluated by break-up time, Rose Bengal and Schirmer I tests. The diagnosis of KCS was based upon the presence of symptoms and when at least two of three tests were positive).

Table 2

Association between KCS and age, sex, PVL and HAM/TSP diagnosis.

Variable	KCS		p value
	Present N = 46	Absent N = 58	
Age (years)	47.9 ± 11.7	45.2 ± 15.7	0.343*
Male N (%)	16 (55.2)	13 (44.8)	0.162*
PVL	134,672 ± 150,393	66,880 ± 109,525	0.001**
HAM/TSP diagnosis n (%)	29 (55.8%)	23 (44.2%)	0.022**

PVL, proviral load (copies/10⁶ PBMC).

* Student's *t*-test, *p* < 0.05.

** Chi-square test, *p* < 0.05.

*** Mann-Whitney test, *p* < 0.05.

used to evaluate PVL and this association with KCS. A logistic regression model was used to estimate the association between patients with KCS and variables such as age over 45 years, female sex, presence of HAM/TSP and CPV, measured by odds ratio (OR) and corresponding 95% confidence interval (CI). Differences of *p* < 0.05 were considered statistically significant. Data were stored and analyzed with SPSS 13.0 for Windows.

4. Results

There was a predominance of women (72.9%), patients' age ranged from 9 to 81 years (mean 46.4 ± 14.04). The main ocular complaints were described in Table 1. The prevalence of KCS was 44.2%. Fifty-two patients (50%) had HAM/TSP diagnosis and the presence of KCS was higher among TSP/HAM patients (*p* = 0.022) (Table 2). The frequency of KCS was higher in male patients, however this difference was not statistically significant (*p* = 0.162). The mean age of patients was not statistically significant (*p* = 0.343).

Table 3

Proviral load according to the presence or absence of KCS in HTLV-1-infected individuals.

PVL	KCS	
	Present N = 46	Absent N = 58
Min – Max	0.0 – 678,012	0.0 – 654,028
IQR	28,131 – 186,870	1,097 – 86,476
Median*	87,335	30,935
Mean ± SD	134,672 ± 150,393	66,880 ± 109,525
CV (%)	111.7	163.8

PVL, proviral load (copies/10⁶ PBMC).

Min, minimum; max, maximum; IQR, interquartile range; SD, standard deviation;

CV (coefficient of variation).

* *p* = 0.003 (median test).

Table 4
Multivariate analysis of patients with and without KCS.

Variable	Complete model		Final model ^a	
	OR (95% CI)	p value	OR (95% CI)	p value
Age < 45 years	1.0			
Age > 45 years	1.06 (0.46–2.47)	0.888		
Male	1.0		1.0	
Female	0.47 (0.18–1.23)	0.125	0.44 (0.17–1.13)	0.087
Asymptomatic	1.0			
TSP/HAM	1.36 (0.53–3.47)	0.519		
PVL 0–50,000	1.0		1.0	
PVL 50,000–100,000	2.26 (0.66–7.75)	0.191	2.58 (0.80–8.31)	0.111
PVL ≥100,000	4.05 (1.40–11.76)	0.010	4.77 (1.83–12.44)	0.001

^a Age > 45 years and TSP/HAM status were excluded in stepwise regression. PVL (HTLV-1 proviral load – copies/10⁶ PBMC).

The mean ± SD of HTLV-1 proviral load in KCS patients was 134,672 ± 150,393 copies/10⁶ PBMC and was significantly higher than the mean (±SD) of proviral load of patients without KCS, 66,880 ± 109,525 copies/10⁶ PBMC ($p = 0.001$) (Table 2). The coefficient of variations of PVL was 111.7% in patients with KCS and 163.8% in those without KCS. The measures of dispersion of PVL were described in Table 3.

The complete model for logistic regression analysis showed that patients with PVL > 100,000 copies/10⁶ PBMC had a significantly increased risk of developing KCS (OR = 4.05 and 95% CI = 1.40–11.76). However, sex, HAM/TSP, status, age > 45 years and PVL between 50,000 and 100,000 did not positively correlate with the risk of developing KCS. The PVL > 100,000 copies/10⁶ PBMC (OR = 4.77 and 95% CI = 1.83–12.44) variable remained statistically significant after exclusion of age > 45 years and HAM/TSP variables in the stepwise regression analysis (Table 4).

5. Discussion

This study demonstrated that high HTLV-1 proviral load is associated with the presence of KCS in patients infected with HTLV-1. Moreover, KCS was observed in almost half of the infected individuals and was more frequent in HAM/TSP patients.

A broad spectrum of ophthalmic manifestations is described in HTLV-1-infected patients including HAU,³¹ malignant infiltrates in patients with ATL,^{32,33} interstitial keratitis,³⁴ Sjögren's syndrome with lacrimal involvement,³⁵ as well as an increased prevalence of KCS in patients with HAM/TSP.¹⁵

Several mechanisms have been proposed to explain the role of the virus for the development of these ophthalmological manifestations. The eye has a unique defense system to protect it from immunopathogenic mechanisms, including the blood ocular barrier that will stop activated T cells from entering the eye.^{36–38}

The HTLV-1 proviral load is the amount of the DNA of virus (provirus) integrated into the host cell genome. Several evidence indicate that it may represent a biological marker of development of HTLV-1 associated diseases. There is strong evidence that high HTLV-1-proviral load is associated with HAM/TSP disease,^{16–19} and also it is increased in patients with other HTLV-1-associated diseases, such as infective dermatitis,²⁰ ATL,³⁹ as well as patients with rheumatoid arthritis and other connective tissue diseases.⁴⁰ Recently, it has been suggested that a proviral load above 50,000 HTLV copies/10⁶ PBMC is the best level of HTLV-1-proviral load to discriminate asymptomatic individuals from HAM/TSP patients.¹⁹

In the present study, only a proviral load above 100,000 copies/10⁶ PBMC was associated with an increased risk of KCS, and there was an association between the presence of KCS and HAM/TSP disease corroborating previous data.¹⁵ In KCS patients, Ferraz-Chaoui et al. demonstrated that the lesion of cornea was not due to the presence of autoantibodies elicited by the infection with HTLV-1.

Moreover, the authors found a trend toward higher proviral load in HTLV-1 patients with KCS, compared with patients with preserved lacrimal function.²² However, the mechanisms implicated in the development of KCS in these patients remain unclear. Interestingly, HAU was not diagnosed in this study, even in patients with high PVL, corroborating other studies performed in Brazil that found a lower prevalence of HAU, compared to Japanese studies.^{10,11,41,42} It is possible that genetic background could play a role in the difference HAU prevalences.

We are aware that one of the limitations of the present study is its cross-sectional design. A single PVL measurement was taken no earlier than one year before, or after, the KCS diagnosis. In addition to an elevated PVL, it is also possible that the length of time in which a high load is sustained may play a role in the development of KCS. Although PVL varies widely among HTLV-1-infected individuals, there is evidence that it remains relatively constant within a given individual over a period of 24 months to 10.4 years.^{43,44} An additional limitation of the present study is that the prevalence of KCS in the general population of Salvador is unknown.

In summary, the results presented herein suggest that HTLV-1 PVL may be a biological marker of KCS development. HTLV-1-infected patients with a high PVL should be encouraged to have regular ophthalmological examinations for KCS screening. This precaution can aid in the treatment of dry eye symptoms and avoid consequent corneal damage.

Funding

Support for this study was provided by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Coordenação Nacional de DST/aids-Ministério da Saúde.

Conflict of interest

The authors disclose any financial or other conflict of interest that might be construed to influence the contents of the manuscript, including the results or interpretation of publication.

Ethical approval

This study was approved by the Institutional Review Board of the Bahian School of Medicine and Public Health (Protocol Number 71/2006).

Acknowledgement

We would like to thank Dr. Raymond Césarie for providing HTLV/Albumina clones.

References

- Yoshida M, Miyoshi I, Hinuma Y. Isolation and characterization of retrovirus from cells lines of human adult T-cell leukemia and its implications in the disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982;79:2031–5.
- Gessain A, Barin E, Vernant JC, Gout O, Maurs I, Calender A. Antibodies to human T-lymphotropic virus type I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet* 1985;2:407–10.
- Osame M, Matsumoto M, Usuku K, Izumo S, Ijichi N, Amitani H, et al. HTLV-1 associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet* 1986;1:1031–2.
- La Grenade L, Hanchard B, Fletcher V, Cranston B, Blattner W. Infective dermatitis of Jamaican children: a marker for HTLV-1 infection. *Lancet* 1990;336:1345–7.
- Nakao K, Ohba N, Matsumoto M. Noninfectious anterior uveitis in patients infected with human T lymphotropic virus type I. *Jpn J Ophthalmol* 1989;33:472–8.
- Mochizuki M, Watanabe T, Yamaguchi K, Takatsuki K, Yoshimura K, Nakashima S, et al. Uveitis associated with human T-cell lymphotropic virus type I. *Am J Ophthalmol* 1992;114(2):123–9.

7. Eguchi K, Matsuoka N, Ida H, Nakashima M, Sakai M, Sakito S, et al. Primary Sjogren's syndrome with antibodies to HTLV-I: clinical and laboratory features. *Ann Rheum Dis* 1992;**51**:769–76.
8. Proietti FA, Carneiro-Proietti ACF, Catalan-Soares BC, Murphy EL. Global epidemiology of HTLV-1 infection and associated diseases. *Oncogene* 2005;**24**:6058–68.
9. Merle H, Smadja D, Le Hoang P, Bera O, Cabre P, Landau M, et al. Ocular manifestations in patients with HTLV-1 associated infection: a clinical study of 93 cases. *Jpn J Ophthalmol* 1996;**40**:260–70.
10. Pinheiro SR, Martins-Filho OA, Ribas JG, Catalan-Soares BC, Proietti FA, Narmen-Lopes S, et al. Immunologic markers, uveitis, and keratoconjunctivitis sicca associated with human T-cell lymphotropic virus type 1. *Am J Ophthalmol* 2006;**20**:1–5.
11. Rathsam-Pinheiro RH, Boa-Sorte N, Castro-Lima-Vargens C, Pinheiro CA, Castro-Lima H, Galvão-Castro B. Ocular lesions in HTLV-1 infected patients from Salvador, State of Bahia: the city with the highest prevalence of this infection in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2009;**42**(6):633–7.
12. The definition and classification of dry eye disease: report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop. *Ocul Surf* 2007;**5**(2):75–92.
13. Schein OD, Munoz B, Bandeen-Roche K, West S. Prevalence of dry eye among the elderly. *Am J Ophthalmol* 1997;**124**(6):723–8.
14. Schaumberg DA, Sullivan DA, Buring JE, Dana R. Prevalence of dry eye syndrome among US women. *Am J Ophthalmol* 2003;**136**(2):318–26.
15. Merle H, Cabre P, Olindo S, Merle S, Smadja D. Ocular lesions in 200 patients infected by the T-cell lymphotropic virus type 1 in Martinique (French West Indies). *Am J Ophthalmol* 2002;**134**(2):190–5.
16. Nagai M, Usuku K, Matsumoto W, Kodama D, Takenouchi N, Moritoyo T, et al. Analysis of HTLV-1 proviral load in 202 HAM/TSP patients and 243 asymptomatic HTLV-1 carriers: high proviral load strongly predisposes to HAM/TSP. *J Neurovirol* 1998;**4**:586–93.
17. Olindo S, Lezin A, Cabre P, Merle H, Saint-Vil M, Edimonana Kaptue M, et al. HTLV-1 proviral load in peripheral blood mononuclear cells quantified in 100 TSP/HAM patients: a marker of disease progression. *J Neurosci* 2005;**23**:53–9.
18. Silva MT, Harab RC, Leite ACC, Schor D, Araujo A, Andrada-Serpa MJ. Human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) proviral load in asymptomatic carriers. HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis, and other neurological abnormalities associated with HTLV-1 infection. *Clin Infect Dis* 2007;**44**:p.689–92.
19. Grassi MFR, Olavarria VN, Kruschewsky RA, Mascarenhas RE, Dourado I, Correia LCL, et al. Human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) proviral load of HTLV-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) patients according to new diagnostic criteria of HAM/TSP. *J Med Virol* 2011;**83**:1269–74.
20. Primo J, Siqueira I, Nascimento MC, Oliveira MF, Farre L, Carvalho EM, et al. High HTLV-1 proviral load, a marker for HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis, is also detected in patients with infective dermatitis associated with HTLV-1. *Braz J Med Biol Res* 2009;**42**:761–4.
21. Ono A, Mochizuki M, Yamaguchi K, Miyata N, Watanabe T. Increased number of circulating HTLV-1 infected cells in peripheral blood mononuclear cells of HTLV-1 uveitis patients: a quantitative polymerase chain reaction study. *Br J Ophthalmol* 1995;**79**(3):270–6 [Erratum in: *Br J Ophthalmol* 1995;**69**(6):621].
22. Ferraz-Chaoui AK, Atta ML, Galvão-Castro B, Santiago MB. Study of autoantibodies patients with keratoconjunctivitis sicca infected by the human T cell lymphotropic virus type 1. *Rheumatol Int* 2010;**30**(6):775–8.
23. Nunes C, Mascarenhas-Batista AV, Maltês D, Brandão JCD, Ferreira TS, Seabra AML, et al. Características Clínicas–Epidemiológicas de 385 pacientes portadores de HTLV na Bahia. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006;19–22.
24. Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. Guia do manejo clínico do HTLV/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de DST e Aids. – Brasília: Ministério da Saúde; 2003. p. 52.
25. Kashima S, Alcantara LC, Takayanagi OM, Cunha MA, Castro BG, Pombo-de-Oliveira MS, et al. Distribution of human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) subtypes in Brazil: genetic characterization of LTR and tax region. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2006;**22**(10):953–9.
26. Osame M. Review of WHO Kagoshima meeting and diagnostic guidelines for HAM/TSP. In: Blattner W, editor. *Human retrovirology: HTLV*. New York: Raven Press; 1990. p. 91–197.
27. Van-Bijsterveld OP. Diagnostic tests in the Sicca syndrome. *Arch Ophthalmol* 1969;**82**:10–4.
28. Kanski JJ. *Clinical ophthalmology: a systematic approach*, vol. 5, fifth ed. Philadelphia: Butterworth Heinemann; 2003. p. 270–308.
29. Farris RL, Gilbard JP, Stuchell RN, Mandel ID. Diagnostic tests in keratoconjunctivitis sicca. *CLAO J* 1983;**9**:23–8.
30. Dehée A, Césaire R, Désiré N, Lézin A, Bourdonné O, Béra O, et al. Quantitation of HTLV-1 proviral load by a TaqMan real-time PCR assay. *J Virol Methods* 2002;**102**:37–51.
31. Mochizuki M, Watanabe T, Yamaguchi K, Takatsuki K, Shirao M, Yoshimura K, et al. HTLV-1 uveitis: a distinct clinical entity caused by HTLV-1. *Jpn J Cancer Res* 1992;**83**:236–9.
32. Levy-Clarke G, Buggage R, Shen DF, Vaughn LO, Chan CC, Davis JL. Human T-cell lymphotropic virus type-1 associated T-cell leukemia-lymphoma masquerading as necrotizing retinal vasculitis. *Ophthalmology* 2002;**109**:1717–22.
33. Liu MM, Furusato E, Cao X, Shen D, Chan CC. Ocular manifestation and pathology of adult T-cell leukemia/lymphoma associated with human T-lymphotropic virus type 1. *Rare Tumors* 2010;**2**(63):179–82.
34. Merle H, Cabre P, Merle S, Gerard M, Smadja D. A description of human T-lymphotropic virus type 1-related chronic interstitial keratitis in 20 patients. *Am J Ophthalmol* 2001;**131**:305–8.
35. Nakamura H, Eguchi K, Nakamura T, et al. High prevalence of Sjogren's syndrome in patients with HTLV-1 associated myelopathy. *Ann Rheum Dis* 1997;**56**:167–72.
36. Mochizuki M. Regional immunity of the eye. *Acta Ophthalmol* 2009;**88**(3):292–9.
37. Ono A, Ikeda E, Mochizuki M. Provirus load in patients with human-T cell leukemia virus type 1 correlates with precedent Graves disease and disease activities. *Jpn J Cancer Res* 1998;**89**:608–14.
38. Sagawa K, Mochizuki M, Masuoka K, Katagiri K, Kitayama T, Maeda T, et al. Immunopathological mechanisms of human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) uveitis. Detection of HTLV-1-infected T cells in the eye and their constitutive cytokine production. *J Clin Invest* 1995;**95**(2):852–8.
39. Okayama A, Stuver S, Matsuoka M, Ishizaki J, Tanaka G, Kubuki Y, et al. Role of HTLV-1 proviral DNA load and clonality in the development of adult T-cell leukemia/lymphoma in asymptomatic carriers. *Int J Cancer* 2004;**110**:621–5.
40. Yakova M, Lezin A, Dantin F, Lagathu G, Olindo S, Jean-Baptiste G, et al. Increased proviral load in HTLV-1-infected patients with rheumatoid arthritis or connective tissue disease. *Retrovirology* 2005;**2**:4.
41. Ikeda E, Ono A, Hikita N, Arima K, Mochizuki M, Yamaguchi K, et al. Estimated prevalence rate of HTLV-1 uveitis in Chikugo. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 1998;**102**:327–32.
42. Yamamoto JH, Segurado AA, Hirata CE, Sampaio MW, Souza EC, Nukui Y, et al. Human T-lymphotropic virus type 1 infection and ocular manifestations in São Paulo, Brazil. *Arch Ophthalmol* 1999;**117**(4):513–7.
43. Manns A, Miley WJ, Wilks RJ, Morgan OS, Hanchard B, Wharfe G, et al. Quantitative proviral DNA and antibody levels in the natural history of HTLV-1 infection. *J Infect Dis* 1999;**180**(5):1487–93.
44. Taylor GP, Tosswill JH, Matutes E, Daenke S, Hall S, Bain BJ, et al. Prospective study of HTLV-1 infection in an initially asymptomatic cohort. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999;**22**(1):92–100.

Objetivo 3: Avaliar a acurácia dos testes diagnósticos para CCS realizados no centro de HTLV-1.

Artigo N° 3: Proposal of an algorithm for the diagnosis of Keratoconjunctivitis sicca (KCS) in HTLV-1-infected individuals.

Castro-Lima-Vargens C, Boa-Sorte N, Grassi MFR, Rathsam-Pinheiro RH, Galvão-Castro B.

(em preparação)

O objetivo desse trabalho foi avaliar efetivamente os métodos diagnósticos utilizados em nosso serviço. Para isso, foram avaliados 96 pacientes.

Para o diagnóstico de CCS, sempre foi utilizado no serviço três testes: TBUT, Teste de Schirmer I e coloração com Rosa Bengala. Esse último, frequentemente causava desconforto e irritação ocular. Recentemente introduzimos um quarto elemento, o questionário OSDI, como forma de avaliar a sintomatologia dos pacientes de maneira mais objetiva.

Dessa forma, cada teste foi avaliado, primeiro separadamente, e depois OSDI, TBUT e teste de Schirmer I foram avaliados em combinações em paralelo e em série. OSDI e TBUT realizados juntos mostraram uma sensibilidade de 99,5% e o teste de Schirmer I uma especificidade de 100%.

A partir desses resultados, foi possível propor um algoritmo para otimizar a realização desses exames somente quando necessário, mantendo a mesma eficácia já obtida com a realização de TBUT, Teste de Schirmer I e coloração com Rosa Bengala conjuntamente.

Proposal of an algorithm for the diagnosis of Keratoconjunctivitis sicca (KCS) in HTLV-1-infected individuals

Cristina Castro-Lima-Vargens MD^{1,2}, Maria Fernanda Rios Grassi MD^{1,3}, Ney Boasorte MD¹, Regina Helena Rathsam-Pinheiro MD², Bernardo Galvão-Castro MD^{1,3}.

- 1- Pós-graduação em Medicina e Saúde Humana, Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador- Bahia -Brazil
- 2- Instituto Brasileiro de Oftalmologia e Prevenção da Cegueira, Salvador, Bahia- Brazil
- 3- Laboratório Avançado de Saúde Pública, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz-Brazil

Corresponding author: Bernardo Galvão-Castro, Centro Integrativo e Interdisciplinar de HTLV Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública. Av. D.João VI, nº 275, Brotas, Salvador, Bahia, Brazil. CEP 40.290.000:e-mail: bgalvao@bahiana.edu.br

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Keywords: HTLV; keratoconjunctivitis sicca/dry eye; tear film/diagnosis.

Acknowledgements: We thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (Fapesb) for financial support.

ABSTRACT

BACKGROUND: Keratoconjunctivitis sicca (KCS) is an ocular surface disease that causes eye discomfort, visual disturbance, and tear film instability. HTLV-1-infection is associated with KCS.

PURPOSE: To evaluate the accuracy of lacrimal film tests and to propose an algorithm for the diagnosis of KCS in HTLV-1-infected individuals.

METHODS: Ninety-six patients infected with HTLV-1 were enrolled in the study. To assess clinical complaints they completed the Ocular Surface Disease Index (OSDI) questionnaire. In order to evaluate the quality of lacrimal film, patients were submitted to tear breakup time test (TBUT), Schirmer I test and Rose Bengal staining. KCS was

diagnosed when at least two of these three tests were abnormal. Sensitivity, specificity, positive and negative predictive value and overall accuracies of OSDI and of each test alone and combined in parallel and in series were determined.

RESULTS: The most sensitive test was TBUT (98%) and the most specific was Schirmer I test (100%). The highest overall accuracy sensitivity and specificity was found for Rose Bengal staining (88.64%) while symptoms assessed using OSDI had the lowest overall accuracy (62.65%). TBUT, Schirmer I test and OSDI combined in parallel showed an increase in sensitivity and a decrease in specificity of all tests. Instead, combined in series, TBUT, Schirmer I test and OSDI had an increased specificity and decreased sensitivity.

CONCLUSION: This study confirmed the need to use more than one test to evaluate the quality of tear film as well as the need to use a symptom questionnaire as part of diagnosis algorithm for KCS.

INTRODUCTION

Human T-cell Lymphotropic Virus type 1 (HTLV-1) is the etiologic agent of adult T cell leukemia (ATL)¹, tropical spastic paraparesis/HTLV-1-associated myelopathy (HAM/TSP)² and infective dermatitis in children³. An ophthalmologic disease, HTLV-1-associated uveitis (HAU) is also linked to HTLV-1 infection^{4,5}. HAU is especially reported in Japan with prevalence ranging from 9.5 to 44.8%^{6,7}. In addition, other ophthalmologic alterations such as corneal lesions, retinal vasculitis and keratoconjunctivitis sicca (KCS) are also associated with HTLV-1⁸⁻¹¹. In these individuals, the prevalence of KCS may reach 30-40%¹²⁻¹⁵, especially in symptomatic patients with HAM/TSP.

KCS is an ocular surface disease that causes eye discomfort, visual disturbance, and tear film instability. Aging, medications, eyelid problems, environmental factors might be associated with dry eye. In addition, several diseases cause KCS such as Sjögren's syndrome and **rheumatoid arthritis**¹⁶. In these autoimmune diseases, the major finding is the destruction of lacrimal gland ducts by autoantibodies¹⁷.

The mechanism leading to KCS in HTLV-1-infected persons remains unclear. It is reported that antinuclear antibodies, present in autoimmune diseases, such as rheumatoid factor, anti-SSA/Ro and anti-SSB/La are absent in patients with KCS

diagnosis associated with HTLV-1¹⁸. Conversely, there was an association between high HTLV-1 proviral load (PVL) and KCS in infected patients^{18,19}.

Complaints suggestive of KCS are blurred vision, dryness, foreign body sensation and burning eyes. To confirm the diagnosis, it is mandatory both to measure the volume and evaluate the quality of tears. The three most widely used tests for assessment of dry eye are the Schirmer I test, tear breakup time test (TBUT) and Rose Bengal staining. The Schirmer I test measures the basal and reflex tear secretion. TBUT is used to assess tear film stability. The Rose Bengal staining evaluates both conjunctival and corneal damage. However, this test has the disadvantage of being toxic and causing typical burning²⁰. In addition, patients' complaints might be evaluated by means of the Ocular Surface Disease Index (OSDI)²¹. The OSDI is a specific questionnaire that provides a rapid assessment of dry eye symptoms and their impact on vision-related functioning²¹.

In general, studies have combined symptoms questionnaires and two or three tests to evaluate the volume and the quality of tears. However, no definite protocol for KCS diagnosis has been proposed and there is poor relation between symptoms and diagnosis tests^{22, 23}. The aim of the present study was to evaluate the accuracy of TBUT, Schirmer I test, Rose Bengal staining and OSDI, alone or combined, for the diagnosis of KCS in HTLV-1-infected individuals; and to propose an algorithm for KCS diagnosis with low cost and minimally invasive procedures.

SUBJECTS AND METHODS

A prospective study was conducted at the Bahiana School of Medicine and Public Health reference center for HTLV, Salvador, Bahia, Brazil, between February 2013 and November 2013. Patients were sequentially invited at the time of their medical visit. They were eligible if they had a positive serological diagnosis of HTLV-1 (ELISA and Western Blot). Patients presenting any previous palpebral disorders, intraocular surgery and who had nasolacrimal duct obstruction were excluded. The Institutional Research Board of Bahiana School of Medicine approved the study and all patients signed an informed consent.

Ophthalmologic examination and measurements

Patients underwent a detailed ophthalmic examination, including best-corrected visual acuity, intraocular pressure measurement with applanation tonometer, anterior segment, and fundus examination with a slit-lamp biomicroscope.

Clinical symptoms were evaluated using the OSDI, a questionnaire that has been validated in Brazil²⁴ and provides a rapid assessment of the symptoms of ocular irritation consistent with dry eye disease. Patients were classified on a scale of intensity for dry eyes as normal, mild, moderate and severe condition, according to the score obtained in OSDI. Tear secretion of both eyes was evaluated, using the three following tests: TBUT, Rose Bengal and the Schirmer I test. TBUT was performed by instillation of 1% fluorescein solution and the time required for dry spots to appear on the corneal surface after blinking was measured. Dry spots that appeared in less than 10 seconds were considered abnormal. To perform the Schirmer I test, millimeter Whatman strips (5mm x 35mm) were placed in the lower fornix near the lateral canthus of both eyes. After 5 minutes, the strips were removed and the wet portion was measured. A result less than 5mm was considered abnormal. The Rose Bengal test was performed with 0.1% Rose Bengal staining solution, and was considered abnormal when its total score was higher than three points²⁵. KCS was diagnosed when at least two of three tests were abnormal.

Statistical Analysis: Age was expressed as means (SD) and gender and presence of KCS were expressed as relative frequency. Means comparison was performed using t-tests or Mann–Whitney tests according to Gaussian or non-Gaussian statistical distribution. Sensitivity, specificity, positive and negative predictive value and overall accuracies (OA) of each test alone were calculated using the OpenEpi software program version 3.01²⁶. Two tests at a time were combined in parallel and series to evaluate the ability to differentiate persons with dry eye from normal individuals. When combined in parallel, only one positive result is sufficient. When combined in series both tests must be positive. The MS-excel software program was used to calculate accuracy. All statistical analysis was carried out using SPSS/PC Statistical Software Program Version 18.0 (SPSS, Chicago, IL)

RESULTS

Ninety-six subjects were included in the study; 71 (74%) were female. Fifty patients (52.1%) had a diagnosis of KCS. The mean age for patients with KCS diagnosis was 53.6 years and for patients without KCS, 47.4 years, which was statistically significant ($p=0.017$). The age for all patients ranged from 23 to 78 years.

Sensitivity, specificity, positive and negative predictive value and overall accuracies of each test alone and combined in parallel or in series are represented in Table 1.

When evaluated alone, the most sensitive test was TBUT (98.0%), presenting a false-negative rate of 3.0%, and 69.6% of specificity. The Schirmer I test was the most specific (100%) with absence of false-positives cases; the sensitivity was 44.0%. The highest overall accuracy of sensitivity and specificity was found for Rose Bengal (88.6%), while OSDI had the lowest (62.7%) overall accuracy.

Combined in parallel, TBUT and OSDI were the most sensitive (99.5%), followed by the combination of TBUT and Schirmer I test (98.9% sensitivity), with a false positive rate of 37.3% and 22.1%, respectively. The specificity of both combinations was 35.6% and 69.6%, respectively. The association of the TBUT, Schirmer I test and OSDI showed the highest sensitivity and 35.6% specificity.

Combined in series, a positive Schirmer I test, combined with a positive TBUT or OSDI, reached a specificity of 100%, with 43.1% and 33.0% sensitivity, respectively. The TBUT, Schirmer I test and OSDI combined showed 100% specificity and 37.8% sensitivity.

DISCUSSION

The results presented herein refer to the assessment of the efficacy of low cost tests widely used for the diagnosis of KCS in a group of HTLV-1-infected patients. When evaluated alone, TBUT proved to be the best screening test, with the highest sensitivity and negative predictive value. However, for confirmation of the diagnosis, additional tests were required. The Schirmer I test had the highest specificity (100%), making this test essential for confirmation of KCS diagnosis. In the present study, the Schirmer I test showed a sensitivity of less than 50%, similar to sensitivity rates described in the literature²⁷.

However, the pathogenesis of KCS in patients infected with HTLV-1 remains unclear, and viral damage to a lacrimal gland and a resultant decrease in tear production would be expected^{28;29}. Consequently, a high number of positive Schirmer I tests should be found among HTLV-1-infected subjects. Rose Bengal staining presented the best overall accuracy. However, when evaluated alone, Rose Bengal did not provide high positive and negative predictive values. Therefore, the use of this test only is not suitable for the purpose of confirming or excluding the diagnosis of KCS. Moreover, patients usually complained of itching and redness, and in some cases, severe ocular inflammation after the test. In spite of this dye being a derivative of fluorescein, which is harmless, it has a dose-dependent toxic effect on human corneal epithelial cells *in vitro*³⁰. Due to the side effects, the use of Rose Bengal dye should be limited to patients for whom the KCS diagnosis was not conclusive. The Rose Bengal also could be replaced by Lissamina Green, a dye that is well tolerated and is equally as effective as Rose Bengal in evaluating the ocular surface³¹. As regards the effectiveness of the OSDI, its accuracy was very low when the questionnaire was considered alone for the diagnosis of KCS. This demonstrated the weak correlation between the patient's symptoms and clinical signs.

Serial testing maximizes specificity and positive predictive value but decreases sensitivity and the negative predictive value. Multiple tests combined in parallel increase the sensitivity, and therefore, the negative predictive value. Instead performing all tests in all patients, the diagnostic algorithm proposed in the present study follows a sequence based on the performance of the tests in three stages. Based on the results obtained herein, we suggest an algorithm for screening HTLV-1-infected patients and making a reliable diagnosis of KCS (Figure 1). Firstly, all infected patients would be screened using both the OSDI questionnaire and TBUT. If both tests are normal, dry eye diagnosis might be excluded. Secondly, if the OSDI questionnaire and/or TBUT are abnormal, the Schirmer I test must be performed for all patients. A positive Schirmer I test confirms the KCS diagnosis. Thirdly, in those patients for whom the diagnosis remains indeterminate (Schirmer I test negative), Rose Bengal staining must be performed. Although 100% predictive positive value was found for several test combinations evaluated in this study, none of them was sufficient to completely exclude the occurrence of false negatives. Therefore, in patients with HAM/TSP diagnosis, with HTLV-1 proviral load of over 10% of infected cells, or those older than 45 years, the

Rose Bengal test should be considered, despite a negative result for the TBUT, OSDI and Schirmer test.

In summary, this study demonstrated that a reliable KCS diagnosis in HTLV-1 patients could be made, using tests to evaluate dry eye and a validated questionnaire, not only as information about the patients' complaints, but also as part of diagnosis algorithm. This would allow the exclusion of patients in whom it is possible to confirm or to exclude KCS diagnosis before the next step, therefore, this algorithm might contribute to reducing costs, discomfort for the patient and time, without compromising the diagnostic efficacy.

REFERENCES

1. Yoshida M, Miyoshi I, Hinuma Y. Isolation and characterization of retrovirus from cells lines of human adult T-cell leukemia and its implications in the disease. *Proc Natl Acad Sci* 1982; 79:2031–2035.
2. Gessain A, Barin E, Vernant JC, et al. Antibodies to human T-lymphotropic virus type I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet* 1985; 2:407–410.
3. Blattner W, Hanchard B, Fletcher V, et al. Infective dermatitis of Jamaican children: a marker for HTLV-I infection. *Lancet* 1990; 336:1345–1347.
4. Mochizuki M, Watanabe T, Yamaguchi K, et al. Uveitis associated with human T-cell lymphotropic virus type I. *Am J Ophthalmol* 1992; 114(2):123–129.
5. Nakao K, Ohba N, Matsumoto M. Noninfectious anterior uveitis in patients infected with human T lymphotropic virus type I. *Jpn J Ophthalmol* 1989; 33:472–478.
6. Goto K, Saeki K, Kurita M, et al. HTLV-I seroprevalence in patients with undefined uveitis in central Japan. *Jpn. J. Ophthalmol* 1994; 38:175–177.
7. Mochizuki M, Watanabe T, Yamaguchi K, et al. HTLV-1 uveitis: a distinct clinical entity caused by HTLV-1. *Jpn J Cancer Res* 1992, 83:236-239.
8. Merle H, Cabre P, Olindo S, et al. Ocular Lesions in 200 Patients Infected by the T-cell Lymphotropic Virus Type 1 in Martinique (French West Indies). *Am J Ophthalmol* 2002; 134(2):190-195.
9. Merle H, Smadja D, Le Hoang P, et al. Ocular manifestations in patients with HTLV-I associated infection: a clinical study of 93 cases. *Jpn J Ophthalmol* 1996; 40:260-270.

10. Buggage RR, Levy-Clarke GA, Smith JA. New corneal findings in human T-cell lymphotropic virus type 1 infection. *American Journal of Ophthalmology* 2001; 131:309-313.
11. Levy-Clarke G, Buggage R, Shen DF, et al. Human T-cell Lymphotropic virus type-I associated T-cell leukemia-lymphoma masquerading as necrotizing retinal vasculitis. *Ophthalmology* 2002; 109:1717-1722.
12. Nasu M, Matsubara O, Yamamoto H. Post-mortem prevalence of lymphocytic infiltration of the lacrimal gland: a comparative study in autoimmune and non-autoimmune diseases. *J Pathol* 1984; 143(1):5-11.
13. Pinheiro SR, Martins-Filho OA, Ribas JG, et al. Immunologic markers, uveitis, and keratoconjunctivitis sicca associated with Human T-Cell lymphotropic virus type 1. *Am J Ophthalmol* 2006; 20:1-5.
14. Rathsam-Pinheiro RH, Boa-Sorte N, Castro-Lima-Vargens C, et al. Ocular lesions in HTLV-1infected patients from Salvador, State of Bahia: the city with the highest prevalence of this infection in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2009; 42(6).
15. Merle H, Cabre P, Olindo S, 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* 2002, 134(2):190-195.
16. Lemp, MA. Dry Eye (Keratoconjunctivitis Sicca), Rheumatoid Arthritis, and Sjögren's Syndrome. *Am J Ophthalmol* 2005; 140(5):898-899.
17. Toshiharu H. Dysfunction of Lacrimal and Salivary Glands in Sjögren's Syndrome: Nonimmunologic Injury in Preinflammatory Phase and Mouse Model. *J Biomed Biotechnol* 2011; 1-15.
18. Ferraz-Chaoui AK, Atta AM, Atta ML, et al. Study of autoantibodies in patients with keratoconjunctivitis sicca infected by the human T cell Lymphotropic virus type 1. *Rheumatol Int* 2010; 30(6):775-778
19. Castro-Lima-Vargens C, Grassi MFR, Boa-Sorte N, et al. Keratoconjunctivitis sicca of human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) infected individuals is associated with high levels of HTLV-1 proviral load. *J Clin Virol* 2011; 52:177-180.
20. Savini G, Prabhawasat P, Kojima T, et al. The challenge of dry eye diagnosis. *Clin Ophthalmol* 2008; 2(1):31-55.

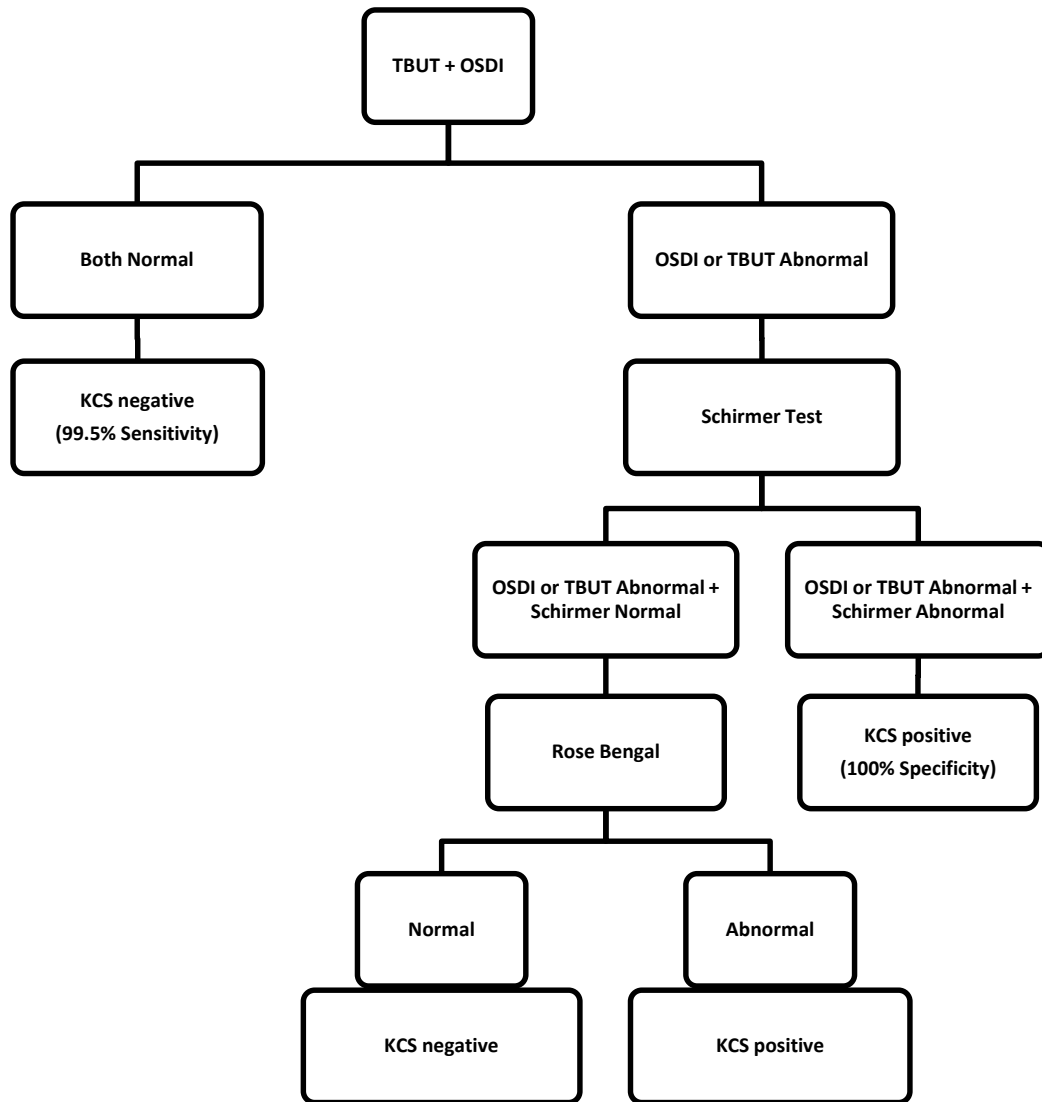
21. Schiffman RM, Christianson MD, Jacobsen G, et al. Reliability and validity of the Ocular Surface Disease Index. *Arch Ophthalmol* 2000; 118(5):615-621.
22. Nichols KK, Nichols JJ, Mitchell GL. The Lack of Association Between Signs and Symptoms in Patients With Dry Eye Disease. *Cornea* 2004; 23(8):762-770.
23. Smith J, Nichols KK, Baldwin EK. Current patterns in the use of diagnostic tests in dry eye evaluation. *Cornea* 2008, 27(6):656-662.
24. Prigol AM, Tenório MB, Matsschinske R, et al. Translation and validation of ocular surface disease index to Portuguese. *Arq Bras Oftalmol* 2012; 75(1):24-28.
25. van Bijsterveld OP. Diagnostic tests in the sicca syndrome. *Arch Ophthalmol* 1969; 82(1):10-14.
26. OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health. 2013.
27. Versura P, Frigato M, Cellini M, et al. Diagnostic performance of tear function tests in Sjogren's syndrome patients. *Eye* 2007; 21:229–237.
28. Mochizuki M. Regional Immunity of the Eye. *Acta Ophthalmologica* 2009. *Clin Ophthalmol* 2008; 2(1):31–55.
29. Alves M, Angerami RN, Rocha EM. Dry eye disease caused by viral infection: review. *Arq Bras Oftalmol* 2013; 76(2):129-132.
30. Feenstra RG, Tseng SG. What is actually stained by rose bengal? *Arch Ophthalmol* 2002; 110(7):984-993.
31. Manning FJ, Wehrly SR, Foulks GN. Patient tolerance and ocular surface staining characteristics of lissamine green versus rose bengal. *Ophthalmol* 1995; 102:1953–1957.

TABLE 1: Effectiveness of tests used to evaluate KCS in HTLV-1 patients.

TEST	SENS	SPEC	False	False-	PPV (%)	NPV	OA
	(%)	(%)	Neg	Pos		(%)	(%)
OSDI	75.0	51.2	31.3	41.2	58.8	68.8	62.7
TBUT	98.0	69.5	3.0	22.2	77.8	97.0	84.4
SCH	44.0	100	37.8	0.0	100	62.2	70.8
RB	87.8	89.7	14.6	8.1	91.5	85.4	88.6
Combined Tests (Parallel)							
OSDI or TBUT	99.5	35.6	1.5	37.3	62.7	98.5	
OSDI or SCH	86.0	51.2	22.9	62.8	37.3	77.1	
TBUT or SCH	98.9	69.6	1.7	22.1	78.0	98.3	
OSDI or TBUT or SCH	99.7	35.6	0.8	37.3	62.7	99.2	
Combined Tests (Series)							
OSDI and TBUT	73.5	85.1	25.3	15.7	84.3	74.7	
OSDI and SCH	33.0	1.0	42.2	0.0	1.0	57.9	
TBUT and SCH	43.1	1.0	38.2	0.0	1.0	61.8	
OSDI and TBUT and SCH	37.8	100	40.3	0.0	100	59.7	

Keratoconjunctivitis sicca (KCS); Human T-cell Lymphotropic Virus type 1 (HTLV-1). Sensitivity (SENS); Specificity (SPEC); False-negatives (False-Neg); False Positives (False-Pos); Positive Predictive Value (PPV); Negative Predictive Value (NPV); Overall Accuracies (OA). Tear Break Up Time (TBUT); Schirmer (SCH); Rose Bengal (RB); Ocular Surface Disease Index (OSDI)

Figure 01: Algorithm for KCS diagnosis in HTLV-1-infected patients.



Keratoconjunctivitis sicca (KCS); Human T-cell Lymphotropic Virus type 1 (HTLV-1). Tear

Break Up Time (TBUT); Schirmer (SCH).

6. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que a CCS é associada ao HTLV-1, uma vez que foi encontrada uma elevada prevalência de CCS em indivíduos infectados e que existiu uma associação entre a CCS e carga proviral elevada. Além disso, propomos um algoritmo para o diagnóstico de CCS nos pacientes infectados pelo HTLV-1, através de uma análise da efetividade dos principais exames diagnósticos de CCS.

No presente estudo foram avaliadas três amostras de pacientes com HTLV-1 em momentos diferentes, com prevalências de CCS variando de 36,4 a 52,1%, semelhante às encontradas em outras coortes de pacientes infectados pelo HTLV-1. Em 1999, estudo realizado na Martinica avaliou 15 pacientes com HAM/TSP e todos apresentaram CCS (Merle e col., 1999). Outro estudo, também na Martinica, envolvendo uma série de 200 pacientes com sorologia positiva para o HTLV-1, encontrou uma prevalência de CCS de 37%, sendo esta duas vezes mais frequente entre os pacientes com HAM/TSP que em portadores assintomáticos (Merle e col., 2002). Nossos resultados confirmam que a CCS no nosso meio é frequente nos pacientes infectados pelo HTLV-1.

Em nosso estudo, a CCS também foi mais frequente entre os pacientes com HAM/TSP. Existe forte evidência que a presença de HAM-TSP está associada com a carga proviral elevada (Nagai e col., 1998; Olindo e col., 2005; Silva e col., 2007, Grassi e col., 2011). A carga proviral é o montante de DNA viral integrado ao genoma das células do hospedeiro (pro-vírus), ou seja, é a população de células infectadas pelo HTLV-1. A carga proviral também se encontra elevada em outras doenças associadas ao HTLV-1, como dermatite infecciosa (Primo e col., 2009), LLTA (Okayama e col., 2004), assim como artrite reumatóide e outras doenças do tecido conectivo (Yakova e col., 2005), podendo representar um marcador biológico de desenvolvimento de doenças associadas ao HTLV-1. De fato, no presente estudo quando avaliamos a associação entre carga proviral e CCS, demonstramos que pacientes com carga proviral maior que 100.000 cópias/ 10^6 PBMC (10% de células infectadas) têm um risco significativamente maior de desenvolver CCS (RC = 4,05 e 95% IC = 1,40 – 11,76). Em 2011, Grassi e col. sugeriram que uma carga proviral acima de 50.000 cópias/ 10^6 PBMC é o melhor ponto de corte para discriminar indivíduos assintomáticos daqueles portadores de HAM/TSP (Grassi e col., 2011). Já Olindo e colaboradores, embora tenham relacionado positivamente carga proviral com a presença de HAM-TSP quando comparados a controles assintomáticos, não encontraram associação entre carga proviral alta e

a presença de alterações oculares (CCS, uveítes e ceratites) (Olindo e col., 2005). Porém a avaliação oftalmológica só foi realizada nos pacientes portadores de HAM-TSP, que por si só já apresentavam um nível mais alto de carga proviral. Sendo assim, é possível que na relação CCS e HAM-TSP não haja uma associação real, sendo apenas o resultado da carga proviral aumentada, favorecendo a ocorrência de ambas as patologias.

Embora a patogenia da CCS em portadores do HTLV-1 ainda não esteja bem definida, alguns dados na literatura trazem informações que podem justificar o aumento na prevalência de CCS nesses pacientes. A presença do gene *tax* em camundongos infectados que desenvolveram inflamação nas glândulas salivares e lacrimais indicam um tropismo do HTLV-1 para estas glândulas (Green e col., 1989). Esses achados sugerem que o vírus induziria uma reação inflamatória, com infiltração linfocítica no tecido glandular e conseqüente déficit funcional. Alguns estudos vêm demonstrando que a CCS relacionada ao HTLV-1 parece ser diferente daquela relacionada com a síndrome de Sjögren auto-imune primária, e deve ser comparada a síndrome seca vista em outras infecções virais como a associada ao HIV e ao vírus da hepatite C (Sipsas e col., 2011; Alves e col., 2013). Nessas infecções, os infiltrados linfocitários estão mais localizados na área pericapilar e o dano ao tecido glandular é mais leve, com uma taxa menor de linfócitos T CD4+ e T CD8+ nos infiltrados, quando comparado com a síndrome de Sjögren primária (Vitali e col., 2011). Infiltração linfocitária das glândulas salivares, hipergamaglobulinemia com elevação de IgG e alveolite linfocítica são alterações que já foram previamente descritas em pacientes com HTLV-1, sendo todos esses achados compatíveis com a síndrome de Sjögren, porém nesses mesmos pacientes, não foram observados anticorpo antinuclear e fator reumatóide (Merle e col., 1999). Em nosso meio, o estudo de Ferraz-Chaoui e colaboradores sugerem que as manifestações de CCS em pacientes com HTLV-1 não estão associadas a uma doença autoimune, pois a presença de auto-anticorpos, tais como FAN, anti-SSA/ anti-SSB e FR não foi identificada, diferentemente do que ocorre nos casos de síndrome de Sjögren primária, nos quais a maioria dos pacientes apresenta esses anticorpos (Ferraz-Chaoui e col., 2010). O desenvolvimento de manifestações clínicas da CCS em portadores de HTLV-1 poderia ser explicado pela ativação de células T auto-reativas.

Além disso, no presente estudo abordamos a avaliação diagnóstica de CCS em pacientes infectados pelo HTLV-1. Não existe um padrão-ouro para diagnóstico de CCS e existe uma lacuna na literatura em relação aos testes diagnósticos no contexto da infecção

pelo HTLV-1 (Versura e col., 2007; Savini e col., 2008). A partir da análise em paralelo e em série do questionário OSDI e dos três testes utilizados de rotina nos pacientes com HTLV-1 (TBUT, teste de Schirmer I e coloração com Rosa Bengala), foi possível propor um protocolo para o diagnóstico e acompanhamento dos pacientes com HTLV-1 e CCS. Inicialmente, recomendamos a realização do OSDI e do TBUT, testes que são simples e rápidos de serem realizados. Em estudo de 2012 com pacientes usuários de computador, foi sugerido que a realização do BUT e do questionário OSDI juntos seria uma opção mais rápida e efetiva quando comparado ao teste de Schirmer para o diagnóstico de olho seco (Unlu e col., 2012). Em nosso estudo, quando combinados em paralelo (pelo menos, um dos testes positivos) estes testes apresentaram uma sensibilidade de 99,5%, devendo, portanto estar na rotina de todos os pacientes. Em seguida, os pacientes que tiverem alterações nos dois exames, devem ser submetidos ao teste de Schirmer. Os pacientes com testes de Schirmer positivos (após o TBUT ou OSDI positivos) terão confirmação diagnóstica (especificidade de 100%). Apenas os pacientes que apresentarem teste de Schirmer negativos deverão ser submetidos ao teste de coloração com o Rosa Bengala. Sendo assim, o número de pacientes submetidos a esse último exame será reduzido. O Rosa Bengala, dentre os testes citados, é o mais incômodo para o paciente. Seu uso está associado a ardor e hiperemia conjuntival, e em alguns casos inflamação intensa. Esse corante, apesar de ser um derivado da fluoresceína, possui uma estrutura molecular diferente dessa, e estudos mostraram um efeito tóxico sobre as células epiteliais da córnea humana *in vitro* dose dependente e potencializada pela exposição à luz (Feenstra e col., 1992). Em nosso estudo, apesar do desempenho satisfatório, apresentando a melhor acurácia entre os três testes avaliados, sugerimos um protocolo de triagem que limitaria sua utilização como critério de confirmação, quando não há diagnóstico de certeza com os métodos potencialmente menos danosos ao paciente.

Uma das limitações do presente estudo foi a ausência de um grupo controle com pacientes não infectados pelo HTLV-1 para determinar a prevalência de CCS. Porém, tomando-se como base estudos prévios que encontraram CCS em apenas 5% a 12,7% de controles não infectados pelo HTLV-1, podemos inferir que a prevalência de CCS é de fato maior nos pacientes infectados com HTLV-1 (Pinheiro e col., 2006; Merle e col., 2002). Além disso, nós encontramos uma associação entre CCS e presença de HAM/TSP e de elevada carga proviral (acima de 10% de células infectadas) o que reforçaria o papel do vírus. Estudos futuros devem ser conduzidos para melhor caracterizar a CCS clinicamente e para determinar

os mecanismos imunológicos implicados no desenvolvimento desta doença em pacientes infectados.

Em resumo, com esse estudo foi possível avaliar aspectos importantes da relação da CCS com o HTLV-1, confirmando a alta prevalência dessa patologia nesse grupo de pacientes, apontando o papel da carga proviral como possível marcador biológico e objetivando o uso dos meios diagnósticos disponíveis.

7. LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS

As limitações deste estudo foram o desenho transversal e a ausência de um grupo controles (pacientes não infectados pelo HTLV-1), já que não há conhecimento da real prevalência de CCS na população geral de Salvador, o que impossibilita uma comparação entre os pacientes com HTLV. Além disso, existe uma única medida de carga proviral, realizada em torno de um ano do diagnóstico de CCS. É possível que a duração de altos níveis de CPV também desempenhe um papel no desenvolvimento de CCS. Embora CPV varie muito entre os indivíduos, existem evidências de que permanece relativamente constante em um mesmo indivíduo entre o período de 24 meses a 10,4 anos (Manns e col., 1999 b; Taylor e col., 1999; Olavarria e col., 2012).

As várias manifestações de uma infecção pelo HTLV-1 podem estar relacionadas com as diferenças no background genético dos indivíduos, variações nos subtipos do HTLV-1, diferenças no tropismo do vírus ou na resposta imune do hospedeiro. Conhecer o papel das células diretamente envolvidas na lise de células infectadas pelo HTLV-1, os CTL e as células NK, poderia auxiliar na compreensão da patogênese da ceratoconjuntivite em pacientes infectados por este vírus. Os CTL estão cronicamente ativados em resposta à infecção pelo HTLV-1. O papel destas células em doenças associadas, como na patogênese da HAM-TSP, ainda não está completamente esclarecido. Permanece a dúvida se estas células participam da patogênese da doença (Biddison e col., 1997; Barmak e col., 2003) ou, como sugerido por outros autores, elas provocam uma forte resposta contra o vírus, reduzindo a carga proviral, e diminuindo o risco de desenvolvimento de doenças inflamatórias (Jeffery e col., 1999; Asquith e col., 2007). As células NK por sua vez são originalmente definidas como componentes efetores da resposta imune inata. Entretanto, recentes achados revelam evidências de características da resposta imune adaptativa na resposta por estas células (Vivier e col., 2011). Já as células Treg representam uma sub-população de células T cuja função está relacionada à supressão da resposta imune (Buckner & Ziegler, 2008; Campbell & Koch, 2011).

Esse estudo vai permitir que se aplique de forma mais criteriosa os recursos diagnósticos disponíveis na avaliação oftalmológica dos pacientes com HTLV-1, porém outros aspectos da dinâmica lacrimal ainda não estão sendo avaliados. No futuro, seria interessante incluir a medida da osmolaridade nesses pacientes, dado ainda não avaliado.

Também seria importante o acompanhamento dos pacientes que não apresentam a doença e verificar dados de incidência ao longo dos anos nesses pacientes.

8. CONCLUSÕES

1. Foi observada elevada prevalência de ceratoconjuntivite seca e uma associação positiva com a presença de HAM-TSP.
2. Carga proviral acima de 100.000 cópias/10⁶ PBMC foi positivamente associada com um risco aumentado de CCS e pode representar um marcador biológico dessa doença.
3. Foi identificada a necessidade de uso de mais de um teste positivo para um diagnóstico preciso de CCS e acrescentar um questionário de sintomatologia a rotina dos pacientes portadores de HTLV-1.
4. Foi proposto um algoritmo para o diagnóstico de CCS a ser seguido na avaliação de rotina dos pacientes com HTLV-1.

REFERÊNCIAS

- Alves M, Angerami RN, Rocha EM. Dry eye disease caused by viral infection: review. *Arq Bras Oftalmol.* 2013; 76(2).
- Asquith B, Bangham CR. Quantifying HTLV-I dynamics. *Immunol Cell Biol.* 2007; (4):280-6.
- Barmak K, Harhaj E, Grant C, Alefantis T, Wigdahl B. Human T cell leukemia virus type I-induced disease: pathways to cancer and neurodegeneration. *Virology.* 2003; 308:1-12.
- Biddison WE, Kubota R, Kawanishi T, Taub DD, Cruikshank WW, Center DM, et al. Human T cell leukemia virus type I (HTLV-I)-specific CD8+ CTL clones from patients with HTLV-I-associated neurologic disease secrete proinflammatory cytokines, chemokines, and matrix metalloproteinase. *J Immunol.* 1997; 159(4):2018-25.
- Brasil. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de DST e AIDS. Guia do manejo clínico do HTLV. Brasília; 2003.
- Brewitt H, Sistani F. Dry Eye Disease: The Scale of the Problem. *Surv Ophthalmol.* 2001; 45(2):199-202.
- Bron AJ. Diagnosis of Dry Eye. *Surv Ophthalmol.* 2001; 45(2):221-26.
- Buckner JH, Ziegler SF. Functional analysis of FOXP3. *Ann N Y Acad Sci.* 2008; 1143:151-69.
- Campbell DJ, Koch MA. Treg cells: patrolling a dangerous neighborhood. *Nat Med.* 2011; 17(8):929-30
- Catalan-Soares B, Carneiro-Proietti AB, Proietti FA. Heterogeneous geographic distribution of human T-cell lymphotropic viruses I and II (HTLV-I/II): serological screening prevalence rates in blood donors from large urban areas in Brazil. *Cad Saude Publica.* 2005; 21(3):926-31.
- Chisholm DM, Mason DK. Labial salivary gland biopsy in Sjogren's disease. *J Clin Pathol.* 1968; 21(5):656-60.

Dehée A, Césaire R, Désiré N, Lézin A, Bourdonné O, Béra O, et al. Quantitation of HTLV-I proviral load by a TaqMan real-time PCR assay. *J Virol Methods*. 2002; 102(1-2):37-51.

Dourado I, Alcantara LC, Barreto ML, Teixeira MG, Galvão-Castro B. HTLV-I in the general population of Salvador, Brazil: a city with African ethnic and sociodemographic characteristics. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2003; 34:527-31.

Farris RL, Gilbard JP, Stuchell RN, Mandel ID. Diagnostic Tests in Keratoconjunctivitis Sicca. *CLAO J*. 1983; 9:23-28.

Feenstra RP, Tseng SC. What is actually stained by rose bengal? *Arch Ophthalmol*. 1992; 110(7):984-93.

Ferraz-Chaoui AK, Atta ML, Galvao-Castro B, Santiago MB. Study of autoantibodies patients with keratoconjunctivitis sicca infected by the human T cell lymphotropic virus type 1. *Rheumatol Int*. 2010; 30(6):775-78.

Galvão-Castro B, Loures L, Rodrigues LG, Sereno A, Ferreira Júnior OC, Franco LG, et al. Distribution of human T-lymphotropic virus type I among blood donors: a nationwide Brazilian study. *Transfusion*. 1997; 37:242-43.

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

Grassi MFR, Olavarria VN, Kruschewsky RA, Mascarenhas RE, Dourado I, Correia LCL, et al. Human T Cell Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1) Proviral Load of HTLV-Associated Myelopathy/ Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP) Patients According to New Diagnostic Criteria of HAM/TSP. *J Med Virol*. 2011; 83:1269-74.

Green JE, Hinrichs SH, Vogel J, Jay G. Exocrinopathy resembling Sjogren's syndrome in HTLV-1 tax transgenic mice. *Nature*. 1989; 341(6237):72-74.

Jeffery KJ, Usuku K, Hall SE, Matsumoto W, Taylor GP, Procter J, 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*. 1999; 96(7):3848-53.

Kalyanaraman VS, Samgaharam MG, Gurrof R. A new subtype of HTLV-2 associated with T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science*. 1982; 281:571-73.

Kanski JJ. *Clinical Ophthalmology: A Systematic Approach*. 5^a ed. Philadelphia: Butterworth Heinemann; 2003.

Kashima S, Alcantara LC, Takayanagui OM, Cunha MA, Castro BG, Pombo-de-Oliveira MS, et al. Distribution of human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) subtypes in Brazil: genetic characterization of LTR and tax region. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2006; 22(10):953-9.

Khanal S, Tomlinson A, McFadyen A, Diaper C, Ramaesh K. Dry eye diagnosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008; 49(4):1407-14.

Kitagawa T, Fujishita M, Taguchi H, Miyoshi I, Tadokoro H. Antibodies to HTLV-I in Japanese immigrants in Brazil. *JAMA*. 1986; 256(17):2342.

Lemp MA, Foulks GN. The definition and classification of dry eye disease: report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye Work Shop (2007). *Ocul Surf*. 2007; 5(2):75-92.

Luo LD, Li Q, Doshi A, Farley W, Corrales RM, Pflugfelder SC. Experimental dry eye stimulates production of inflammatory cytokines and MMP-9 and activates MAPK signaling pathways on the ocular surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004; 45(12):4293-301.

Manns A, Hisada M, La Grenade L. Human T-lymphotropic virus type I infection. *Lancet*. 1999 ; 353:1951-58. (a)

Manns A, Miley WJ, Wilks RJ. Quantitative proviral DNA and antibody levels in the natural history of HTLV-1 infection. *J Infect Dis*. 1999; 5:1487-93. (b)

Merle H, Cabre P, Merle S, Gerard M, Smadja D. A description of human T- lymphotropic virus type I-related chronic interstitial keratitis in 20 patients. *Am J Ophthalmol*. 2001; 131:305-08.

- Merle H, Cabre P, Olindo S, Merle S, Smadja D. Ocular Lesions in 200 Patients Infected by the T-cell Lymphotropic Virus Type 1 in Martinique (French West Indies). *Am J Ophthalmol.* 2002; 134(2):190-95.
- Merle H, Cabre P, Smadja D, Josset P, Landau M, Vernant JC. Sicca syndrome and HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Jpn J Ophthalmol.* 1999; 43(6):509-12.
- Merle H, Smadja D, Le Hoang P, Bera O, Cabre P, Landau M, Vernant JC. Ocular manifestations in patients with HTLV-I associated infection: a clinical study of 93 cases. *Jpn J Ophthalmol.* 1996; 40:260-70.
- Miljanovi-ç B, Dana R, Sullivan DA, Schaumberg DA. Impact of Dry Eye Syndrome on Vision-Related Quality of Life. *Am J Ophthalmol.* 2007; 143(3):409-15.
- Moreira ED Jr, Ribeiro TT, Swatson P, Sampaio Filho C, Melo A, Brites C. Seroepidemiology of human T-cell lymphotropic virus type I/II in northeastern Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1993; 6(8):959-63.
- Mochizuki M, Ono A, Ikeda E, Hikita N, Watanabe T, Yamaguchi K, et al. HTLV-I uveitis. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1996; 1:50-6.
- Mochizuki M, Watanabe T, Yamaguchi K, Takatsuki K, Shirao M, Yoshimura K, Nakashima S, Mori S, Araki S, Miyata N. HTLV-1 uveitis: a distinct clinical entity caused by HTLV-1. *Jpn J Cancer Res.* 1992; 83:236-39.
- Moss SE, Klein R, Klein BEK. Incidence of dry Eye in an Older Population. *Arch Ophthalmol.* 2004; 122(3):369-73.
- Nagai MN, Usuku K, Matsumoto W, Kodama D, Takenouchi N, Moritoyo T, 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.* 1998; 4(6):586-93.
- Nakamura H, Eguchi K, Nakamura T, et al. High prevalence of Sjogren's syndrome in patients with HTLV-1 associated myelopathy. *Ann Rheum Dis.* 1997; 56:167-72.
- Nichols KK, Nichols JJ, Mitchell GL. The relation between tear film tests in patients with dry eye disease. *Ophthalmic Physiol Opt.* 2003; 23(6):553-60.

- Okayama A, Stuver S, Matsuoka M, Ishizaki J, Tanaka G, Kubuki Y, et al. Role of HTLV-1 proviral DNA load and clonality in the development of adult T-cell leukemia/lymphoma in asymptomatic carriers. *Int J Cancer*. 2004; 110:621-25.
- Olavarria VN, Gomes Ado N, Kruschewsky R de A, Galvão-Castro B, Grassi MF. Evolution of HTLV-1 proviral load in patients from Salvador, Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2012; 16(4):357-60.
- Olindo S, Lezin A, Cabre P, Merle H, Saint-Vil M, Edimonana Kaptue M, et al. HTLV-1 proviral load in peripheral blood mononuclear cells quantified in 100 TSP/ HAM patients: a marker of disease progression. *J Neurol Sci*. 2005; 237:53-9.
- Ono A, Mochizuki M, Yamagushi K, Miyata N, Watanabe T. Increased number of circulating HTLV-1 infected cells in peripheral blood mononuclear cells of HTLV-1 uveitis patients: a quantitative polymerase chain reaction study. *Br J Ophthalmol*. 1995; 79(3): 270-6.
- Osame M, Matsumoto M, Usuku K, Izumo S, Ijichi N, Amitani H, et al. HTLV-1 associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet*. 1986; 1:1031-32.
- Osame M. Review of WHO Kagoshima meeting and diagnostic guidelines for HAM/TSP. *Human Retrovirology: HTLV*. Raven Press: New York; 1990.
- Pinheiro SRAA, Lana-Peixoto MA, Proietti ABC, Oréfice F, Lima-Martins MV, Proietti FA. HTLV-I associated uveitis, myelopathy, rheumatoid arthritis and Sjögren's syndrome. *Arq Neuro-Psiquiatr*. 1995; 53(4):777-81.
- Pinheiro SR, Martins-Filho OA, Ribas JG, Catalan-Soares BC, Proietti FA, Namen-Lopes S, et al. Immunologic markers, uveitis, and keratoconjunctivitis sicca associated with Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1. *Am J Ophthalmol*. 2006; 20:1-5.
- Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. Detection and isolation of type-C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous t-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980; 77:7415-19.
- Primo J, Siqueira I, Nascimento MC, Oliveira MF, Farre L, Carvalho EM, et al. High HTLV-1 proviral load, a marker for HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis, is

also detected in patients with infective dermatitis associated with HTLV-1. *Braz J Med Biol Res.* 2009; 42:761-64.

Román GC, Osame M. Identity of HTLV-1 associated tropical spastic paraparesis and HTLV-I associated mielopatía. *Lancet.* 1988; 1:651.

Savini G, Prabhawasat P, Kojima T, Grueterich M, Espana E, Goto E. The challenge of dry eye diagnosis. *Clin Ophthalmol.* 2008; 2(1):31–55.

Schaumberg DA, Sullivan DA, Buring JE, Dana R. Prevalence of Dry Eye Syndrome Among US Women. *Am J Ophthalmol.* 2003; 136(2):318-26.

Schein OD, Munoz B, Tielsch JM, Bandeen-Roche K, West S. Prevalence of dry eye among the elderly. *Am J Ophthalmol.* 1997; 124(6):723-8.

Schiffman RM, Christianson MD, Jacobsen G, Hirsch JD, Reis BL. Reliability and validity of the Ocular Surface Disease Index. *Arch Ophthalmol.* 2000; 118:615-21.

Silva MT, Harab RC, Leite ACC, Schor D, Araujo A, Andrada-Serpa MJ. Human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-I) proviral load in asymptomatic carriers, HTLV-1-associated myelopathy/ tropical spastic paraparesis, and other neurological abnormalities associated with HTLV-1 infection. *Clinical Infectious Disease.* 2007; 44:689-92.

Sipsas NV, Gamaletsou MN, Moutsopoulos HM. Is Sjogren's syndrome a retroviral disease? *Arthritis Res Ther.* 2011; 13(2):212.

Soares R, Moraes Jr H. Manifestações oculares observadas em indivíduos infectados por HTLV-I no Rio de Janeiro. *Arquivos Bras de Oftalmol.* 2000; 63(4):293-98.

Taylor GP, Tosswill JH, Matutes E. Prospective study of HTLV-I infection in an initially asymptomatic cohort. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1999; 22(1):92-100.

Unlu C, Guney E, Akcay BI, Akcali G, Erdogan G, Bayramlar H. Comparison of ocular-surface disease index questionnaire, tear film break-up time, and Schirmer tests for the evaluation of the tear film in computer users with and without dry-eye symptomatology. *Clinical Ophthalmology.* 2012; (6):1303-06.

- Van Bijsterveld OP. Diagnostic tests in the sicca syndrome. *Arch Ophthalmol.* 1969; 82:10-14.
- Vernant JC, Buisson G, Magdeleine J, De Thore J, Jouannelle A, Neisson-Vernant C, et al. T-lymphocyte alveolitis, tropical spastic paresis, and Sjogren syndrome. *Lancet.* 1988; 1(8578):177.
- Versura P, Frigato M, Cellini M, Mule R, Malavolta N, Campos EC. Diagnostic performance of tear function tests in Sjogren's syndrome patients. *Eye.* 2006; 21(2):229-37.
- Vitali C, Moutsopoulos HM, Bombardieri S. The European Community Study Group on Diagnostic Criteria for Sjogren's Syndrome. Sensitivity and specificity of tests for ocular and oral involvement in Sjogren's syndrome *Ann Rheum Dis.* 1994; 53(10):637-47.
- Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science.* 2011; 331(6013):44-9.
- Yakova M, Lezin A, Dantin F, Lagathu G, Olindo S, Jean-Baptiste G, et al. Increased proviral load in HTLV-1-infected patients with Rheumatoid arthritis or connective tissue disease. *Retrovirology.* 2005; 2:4.
- Yamamoto JH, Segurado AA, Hirata CE, Sampaio MW, Souza EC, Nukui Y, et al. Human T-lymphotropic virus type 1 infection and ocular manifestations in São Paulo, Brazil. *Arq Ophthalmol.* 1999; 117(4):513-7.
- Yamane R, Camara AG. Filme lacrimal, testes de secreção e drenagem lacrimal e estesiometria. *Semiologia ocular.* Rio de Janeiro: Cultura Médica; 1990.
- Yoshida M, Miyoshi I, Hinuma Y. Isolation and characterization of retrovirus from cells lines of human adult T-cell leukemia and its implications in the disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982; 79:2031-35
- Walt JG, Rowe MM, Stern KL. Evaluating the functional Impact of Dry Eye: The Ocular Surface Disease Index. *Drug Information Journal.* 1997; 31:1436
- Zoukhri, D. Effect of inflammation on lacrimal gland function. *Exp Eye Res.* 2006; 82(5):885-98.

ANEXOS**Anexo 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Vírus Linfotrópico de Células T Humana tipo 1 (HTLV-1) e sua associação com
Ceratoconjuntivite seca no Município de Salvador/ Bahia****TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO****Resolução CNS 196/96 do Ministério da Saúde**

Você é portador do Vírus Linfotrópico de Células T-humanas (HTLV) e está sendo convidado a participar da pesquisa acima citada. As informações que seguem estão sendo fornecidas para o seu esclarecimento e participação voluntária.

A ceratoconjuntivite seca é uma doença que leva a uma diminuição de lágrimas, ocasionando ressecamento nos olhos. Ela tem se mostrado mais comum em pacientes com HTLV. Nosso objetivo com esse estudo é determinar qual a frequência da ceratoconjuntivite seca nas pessoas que tem esse vírus, relacionar a ceratoconjuntivite seca com um aumento da carga proviral e avaliar os testes diagnósticos de ceratoconjuntivite seca realizados em nosso serviço. Você será submetido a um exame oftalmológico, por médicos treinados para esse fim. Neste exame serão realizados 3 testes onde vamos pingar corantes chamados de “fluoresceína” e “rosa bengala” e um colírio anestésico para colocação de uma pequena faixa de papel de 05 mm de largura no canto dos olhos. Durante esses procedimentos é comum a sensação de ardor ocular pela maioria dos pacientes. Se for identificado qualquer alteração, você receberá tratamento e orientação adequados. Além disso, nós pedimos que você doe 25ml de sangue (mais ou menos uma colher de sopa) para estudar suas células no laboratório. Nenhum dos exames que serão realizados envolve riscos.

Em qualquer momento do estudo você poderá entrar em contato com os profissionais responsáveis para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os principais investigadores são Dr Bernardo Galvão, que pode ser encontrado na Av. Dom João VI, 275 , Brotas Telefone: 3276-8281 e Dra. Cristina Vargens, que pode ser encontrada na Rua Pedro Lessa, 118, Canela. Telefone: 71 3173-8200. Você terá o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais da pesquisa e terá total liberdade de se recusar a participar, ou retirar seu consentimento, em qualquer momento da pesquisa, sem que isso leve a qualquer prejuízo no seu acompanhamento. É garantido sigilo quanto aos seus dados, pois as informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente. Você não terá qualquer despesa com a pesquisa, incluindo exames e consultas. Também não há nenhuma compensação financeira relativa à sua participação. É um compromisso do pesquisador utilizar os dados e o material coletado somente para essa pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente esclarecido a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo a pesquisa: **Vírus Linfotrópico de Células T Humana tipo 1 (HTLV-1) e sua associação com Ceratoconjuntivite seca no Município de Salvador/ Bahia**

Assinatura do paciente ou representante legal

Assinatura da testemunha

Anexo 2 – Questionário de Sintomatologia Ocular

Teve alguma das experiências a seguir durante a ÚLTIMA SEMANA:

- 1- Olhos mais sensíveis na claridade?
 - a. Todo o tempo
 - b. A maior parte do tempo
 - c. Em alguns momentos
 - d. Em poucos momentos
 - e. Em nenhum momento

- 2- Sente como se houvesse areia nos olhos?
 - a. Todo o tempo
 - b. A maior parte do tempo
 - c. Em alguns momentos
 - d. Em poucos momentos
 - e. Em nenhum momento

- 3- Os olhos estão dolorosos ou ardendo?
 - a. Todo o tempo
 - b. A maior parte do tempo
 - c. Em alguns momentos
 - d. Em poucos momentos
 - e. Em nenhum momento

- 4- Visão borrada?
 - a. Todo o tempo
 - b. A maior parte do tempo
 - c. Em alguns momentos
 - d. Em poucos momentos
 - e. Em nenhum momento

- 5- Visão ruim?
 - a. Todo o tempo
 - b. A maior parte do tempo
 - c. Em alguns momentos
 - d. Em poucos momentos
 - e. Em nenhum momento

Problemas com seus olhos limitaram sua capacidade em realizar alguma destas atividades durante a última semana:

- 1- Ler?
- 2- dirigir à noite?
- 3- trabalhar com o computador?
- 4- assistir TV?

Seus olhos ficaram desconfortáveis em alguma das situações seguintes durante a última semana:

- 1- Quando expostos ao vento?
- 2- Locais muito secos (com pouca umidade)?
- 3- Locais com ar condicionado