

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS
DOUTORADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS INFECCIOSAS

OTÁVIO DE MELO ESPÍNDOLA

**Estudo de marcadores biológicos para o
desenvolvimento de paraparesia espástica
tropical/mielopatia associada ao HTLV-1 (PET/MAH)
em indivíduos infectados pelo vírus linfotrópico para
células T humanas do tipo 1 (HTLV-1)**

Rio de Janeiro

2013

Estudo de marcadores biológicos para o desenvolvimento de paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1 (PET/MAH) em indivíduos infectados pelo vírus linfotrópico para células T humanas do tipo 1 (HTLV-1)

OTÁVIO DE MELO ESPÍNDOLA

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação *strictu sensu* do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do título de Doutor em Ciências na área de concentração: Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas.

Orientadora: Dr^a Maria José de Andrada Serpa

Rio de Janeiro

2013

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

E77 Espíndola, Otávio de Melo

Estudo de marcadores biológicos para o desenvolvimento de paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1 (PET/MAH) em indivíduos infectados pelo vírus linfotrópico para células T humanas do tipo 1 (HTLV-1) / Otávio de Melo Espíndola. – Rio de Janeiro, 2013.

xvi, 128 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, 2013.
Bibliografia: f. 99-126

1. HTLV-1. 2. PET/MAH. 3. Carga proviral. 4. Células T reguladoras. 5. Expressão de Tax e HBZ. 6. Marcadores biológicos I. Título.

CDD 616.9188

OTÁVIO DE MELO ESPÍNDOLA

Estudo de marcadores biológicos para o desenvolvimento de paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1 (PET/MAH) em indivíduos infectados pelo vírus linfotrópico para células T humanas do tipo 1 (HTLV-1)

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação *strictu sensu* do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do título de Doutor em Ciências na área de concentração: Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas.

Orientadora: Dr^a Maria José de Andrada Serpa

Aprovada em 24/04/2013

BANCA EXAMINADORA

Dr. Abelardo de Queiroz Campos Araújo (Presidente)
Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas / FIOCRUZ

Dr^a. Cynthia Silveira Horn
Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas / FIOCRUZ

Dr^a. Juliana Echevarria Neves de Lima
Instituto de Microbiologia Paulo de Góes / UFRJ

Dr. Marco Antonio Sales Dantas de Lima
Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas / FIOCRUZ

Dr^a. Ana Teresa Gomes Fernandes
Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas / FIOCRUZ

Aos meus pais, Mauricéa e Décio (*in memoriam*), por todo o carinho.

“Os progressos da ciência obedecem à lei da repulsão: para dar um passo em frente é preciso começar por derrubar o domínio do erro e das falsas teorias.”

(Boris Pasternak)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Mauricéa e Décio (*in memoriam*), pelo carinho e apoio em todos os momentos cruciais da minha vida.

À Dr^a Maria José de Andrada Serpa, pela orientação em cada passo deste estudo, pelo apoio nos momentos de desilusão e dúvida, e por toda a compreensão, paciência e carinho que demonstrou por mim ao longo desta jornada.

À Dr^a Ana Cláudia Leite e ao Dr. Marco Antonio Lima do Laboratório de Pesquisa Clínica em Neuroinfecções, pela paciência em passar os termos de consentimento aos pacientes e pela solicitação de coleta das amostras utilizadas neste estudo.

À Dr^a Cynthia Horn, pelas conversas, sugestões e pela revisão primorosa para o enriquecimento deste trabalho.

À Dr^a Maria de Fátima Madeira, à Dr^a Aline Fagundes e aos funcionários do Laboratório de Vigilância em Leishmaniose do IPEC, pela compreensão e acolhimento, e pelo compartilhamento da sala de cultura de células, que foi primordial para a realização deste estudo.

À Dr^a Juliana Echevarria do Departamento de Imunologia do IMPPG/UFRJ e à Dr^a Ana Carolina Vicente do IOC/Fiocruz, pelas sugestões e pelo acompanhamento da execução deste trabalho durante os Seminários de Avaliação.

Aos amigos do IPEC: Ana Cláudia, Isaac Filho, Elizabeth Neves, Marco Antônio, Doris Schor, Alexandre Vizzoni, Luciano Oliveira, Beatriz Vaz e André Cury, por toda a colaboração e momentos de descontração.

Aos estagiários Luã Cardoso e Priscilla Moniz, que me auxiliaram na execução de muitos dos experimentos realizados.

À Magno Maciel, que apesar do pouco tempo no laboratório, se mostrou sempre disposto a ajudar nesta etapa final, me auxiliando na formatação deste trabalho.

Obrigado.

Espíndola, OM. **Estudo de marcadores biológicos para o desenvolvimento de paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1 (PET/MAH) em indivíduos infectados pelo vírus linfotrópico para células T humanas do tipo 1 (HTLV-1)**. Rio de Janeiro, 2013. 128 f. Tese [Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

RESUMO

O vírus linfotrópico para células T humanas do tipo 1 (HTLV-1) é um retrovírus que acarreta uma infecção persistente e, enquanto a maioria dos portadores permanece assintomática, cerca de 0,5 a 5% dos indivíduos infectados desenvolve a paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV (PET/MAH). Este estudo teve como objetivo avaliar parâmetros da dinâmica desta infecção, tais como a carga proviral (CPV), o padrão de integração do DNA proviral e frequência de clones infectados persistentes, a expressão dos genes virais *tax* e *HBZ* e das citocinas IFN- γ e IL-10, além da frequência de células T reguladoras (Tregs), como prováveis marcadores biológicos para a identificação dos indivíduos assintomáticos (ACs) com maior chance de desenvolver PET/MAH. Em comparação com indivíduos saudáveis, ACs e pacientes com PET/MAH com CPV elevada (>5%) apresentaram frequências elevadas de Tregs (células T CD4⁺FoxP3⁺). A utilização isolada de FoxP3 na caracterização das Tregs foi adotada em virtude da expressão aumentada de CD25 por células T CD4⁺, interferindo assim com a identificação clássica das Tregs (células T CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺). A análise de CD127 confirmou este fato, pois a frequência de células T CD4⁺CD25⁺CD127^{-low}FoxP3⁽⁻⁾ se mostrou aumentada nos indivíduos infectados, e se correlacionou positivamente com a CPV. Pacientes com PET/MAH apresentaram maior frequência de populações clonais predominantes infectadas, e estes clones foram capazes de persistir ao longo do tempo, sugerindo que contribuam para os níveis mais elevados de CPV comumente observados nestes indivíduos. A expressão dos genes virais *tax* e *HBZ* em células mononucleares foi detectada em baixos níveis, e correlacionou de modo positivo com a CPV, sendo observada diferença significativa na expressão de *tax ex vivo* entre ACs e mielopatas. Dessa forma, a presença de grandes populações clonais infectadas, mesmo que expressando pequenas concentrações de antígenos virais, serviria como um estímulo para a intensa resposta de linfócitos T citotóxicos. Esta hipótese foi corroborada pelos altos níveis de IFN- γ em relação à IL-10 presentes nos pacientes com PET/MAH e em ACs com CPV alta, indicando que a avaliação conjunta destes parâmetros poderá melhor definir os ACs com maior risco de desenvolvimento de PET/MAH.

Palavras-chave: 1. HTLV-1. 2. PET/MAH. 3. Carga proviral. 4. Células T reguladoras 5. Expressão de *Tax* e *HBZ*. 6. Marcadores biológicos.

Espíndola, OM. **Study of biological markers for the development of HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in individuals infected by the human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)**. Rio de Janeiro, 2013. 128 p. Thesis [PhD on Clinical Research of Infectious Diseases] – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

ABSTRACT

The human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) is a retrovirus that causes a persistent infection, in which the majority of patients remains asymptomatic while about 0.5 to 5% of infected individuals develop HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). This study intended to evaluate parameters of HTLV-1 infection dynamics, such as the proviral load (PVL), the integration pattern of proviral DNA and frequency of persistent infected-cell clones, expression of viral genes *tax* and *HBZ* and of the cytokines IFN- γ and IL-10, and also the frequency of regulatory T cells (Tregs), as probable biological markers for the identification of asymptomatic carriers (AC's) with more chance to develop HAM/TSP. Compared with healthy subjects, AC's and HAM/TSP patients with high PVL (>5%) had high frequency of Tregs (T CD4⁺FoxP3⁺ cells). The Treg characterization using only FoxP3 was done due to the increased CD25 expression on CD4⁺ T cells, which interfered with classical Treg phenotypic identification (T CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ cells). The analysis of CD127 confirmed this fact, because the frequency of T CD4⁺CD25⁺CD127^{-/low}FoxP3⁽⁻⁾ cells was increased among infected individuals, and correlated positively with PVL. In addition, HAM/TSP patients presented greater amounts of predominant clonal cell-infected populations, which were able to persist over time, suggesting that it contributed to the usually high PVL levels observed in these patients. The expression of the viral genes *tax* and *HBZ* by mononuclear cells from infected individuals was detected at low levels and correlated positively with PVL, with difference of ex vivo *tax* expression among AC's and HAM/TSP patients. Thus, the presence of large infected clonal cell populations, even though expressing small amount of viral antigens, could act as a stimulus for the strong response of cytotoxic T lymphocytes. This hypothesis was supported by high levels of IFN- γ in comparison with IL-10 in HAM/TSP patients and AC's with high PVL, indicating that the evaluation of both parameters may better define AC's with high risk for HAM/TSP development.

Keywords: 1. HTLV-1. 2. HAM/TSP. 3. Proviral load. 4. Regulatory T cells. 5. *Tax* and *HBZ* expression. 6. Biological markers.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- χ^2 - qui quadrado
- °C - grau Celsius
- μL - microlitros
- ACs** - portadores assintomáticos
- AP-1** - proteína ativadora 1
- APCs** - células apresentadoras de antígeno
- PE-Cy7** - conjugado de ficoeritrina-cianina 7
- bZIP** - domínio básico de zíper de leucina
- CA** - proteína do capsídeo
- cAMP** - adenosina monofosfato cíclico
- CD** - *cluster of differentiation*
- CDK** - kinases dependentes de ciclina
- cDNA** - DNA complementar
- CPV** - carga proviral
- CRE** - Elemento Responsivo a adenosina monofosfato cíclico
- CREB** - fator de transcrição ligante de CRE
- Ct** - *cycle threshold*
- CTD** - domínio C-terminal da gp46
- CTLA-4** - antígeno 4 de linfócito T citotóxico
- CTL** - linfócito T citotóxico
- DC** - célula dendrítica
- DNA** - ácido desoxirribonucleico
- dNTP** - desoxirribonucleotídeo trifosfatado
- DP** - desvio-padrão
- EDTA** - ácido etilenodiaminotetracético
- E_fPCR** - eficiência de amplificação da PCR
- Env** - proteína de envelope
- ER** - expressão relativa
- FITC** - isotiocianato de fluoresceína
- FoxP3** - do inglês *Forkhead box P3*
- FSC** - *forward scatter*
- g** - constante de aceleração da gravidade

Gag - antígeno grupo-específico, do inglês *group-specific antigen*

GALT - tecido linfoide associado à mucosa gastrointestinal

GAPDH - gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GITR - receptor de TNF induzido por glicocorticoide

GLUT-1 - transportador de glicose do tipo 1

GM-CSF - fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos

gp - glicoproteína

HBV - vírus da hepatite B

HBZ - Fator básico de zíper de leucina de HTLV-1

HCV - vírus da hepatite C

HIV-1 - vírus da imunodeficiência humana do tipo 1

hnRNP-A1 - riboproteína heterogênea nuclear A1

HSPG - heparan sulfato proteoglicano

hTert - transcriptase reversa da telomerase humana

HTLV-1 - vírus linfotrópico para células T humanas do tipo 1

I κ B - inibidor de κ B

ICAM-1 - molécula de adesão intercelular 1

IDO - indoleamina 2,3-dioxigenase

IFN- γ - interferon gama

IKK - I κ B kinase

IL - interleucina

IL-PCR - PCR invertido longo

IP-10 - proteína 10 induzida por interferon gama

iTr35 - célula T reguladora induzida produtora de IL-35

iTreg - célula T reguladora induzida

LAG-3 - gene 3 de ativação de linfócitos

LLTA - leucemia/linfoma de células T do adulto

LTR - repetição terminal longa, do inglês *long terminal repeat*

MA - proteína da matriz

MAR - região de ligação a matriz nuclear

MFI - mediana de intensidade de fluorescência

MHC-I - complexo principal de histocompatibilidade do tipo I

MHC-II - complexo principal de histocompatibilidade do tipo II

mL - mililitros

MLV - vírus da leucemia murina

mm - milímetros

mM - milimolar

mRNA - RNA mensageiro

MTOC - centro de organização de microtúbulos

N.A. - não se aplica

NF- κ B - fator nuclear κ B

NFAT - fator nuclear de células T ativadas

ng - nanogramas

NI - indivíduos não infectados

NP-1 - neuropilina 1

nTegs - células T reguladoras naturais

ORF - janela de leitura aberta, do inglês *open read frames*

P.A. - grau de pureza para análise

p100C - região inibidora C-terminal de p100

pb - pares de bases

PBL - leucócito de sangue periférico

PBMCs - células mononucleares de sangue periférico

PBS - tampão fosfato salino

PCNA - antígeno nuclear da proliferação celular

PE - ficoeritrina

PECAM-1 - molécula de adesão da célula endotelial e plaqueta 1

PET/MAH - paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV

pmol - picomol

PRR - região rica em prolina da gp46

RA - ácido retinóico

RBD - domínio de ligação ao receptor da gp46

RC - razão de chance

RNA - ácido ribonucleico

RT - transcriptase reversa

SFB - soro fetal bovino

SNC - sistema nervoso central

SRF - fator de resposta ao soro

SSC - *side scatter*

T_{conv} - célula T convencional

TCR - receptor de células T

TEC - célula epitelial tímica

TGF- β - fator de crescimento tumoral beta

Th1 - célula T auxiliar do tipo 1

Th2 - célula T auxiliar do tipo 2

Th3 - célula T auxiliar do tipo 3

TNF- α - fator de necrose tumoral alfa

Tr1 - célula T reguladora do tipo 1

Treg - célula T reguladora

TxRE - Elemento Responsivo de Tax

U3 - região única 3

U5 - região única 5

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Prevalência da infecção por HTLV-1/2 no Brasil	3
Figura 2.	Hipóteses de geração de lesão neurológica na infecção por HTLV-1	5
Figura 3.	Estrutura das partículas imaturas e maduras de HTLV-1	6
Figura 4.	Modelo do complexo de receptores para infecção por HTLV-1	9
Figura 5.	Modelo da formação da sinapse virológica na infecção por HTLV-1	13
Figura 6.	Estrutura do genoma proviral de HTLV-1 e seus transcritos	17
Figura 7.	Modelo da transativação gênica mediada pela proteína Tax	18
Figura 8.	Processos celulares alterados pela proteína tax de HTLV-1	20
Figura 9.	Interações de Tax com as vias de ativação de NF- κ B	22
Figura 10.	Funções da proteína HBZ de HTLV-1 em células infectadas	26
Figura 11.	Desenvolvimento e diferenciação das células T reguladoras naturais (nTregs) e induzidas (iTregs) e seus marcadores	33
Figura 12.	Mecanismos de supressão mediados por células T reguladoras	36
Figura 13.	Modelo esquemático da técnica de IL-PCR	47
Figura 14.	Análise da expressão de FoxP3 em subpopulações de células T CD4+	51
Figura 15.	Persistência de clones infectados pelo HTLV-1	57
Figura 16.	Frequência de clones infectados persistentes em ACs e pacientes com PET/MAH	58
Figura 17.	Expressão de <i>tax</i> em células de ACs e pacientes com PET/MAH	59
Figura 18.	Correlação entre a expressão de <i>tax</i> e a carga proviral de HTLV-1 ..	60
Figura 19.	Expressão relativa de <i>IFN-γ</i> e <i>IL-10</i> por PBMCs de ACs e de pacientes com PET/MAH em comparação com indivíduos não infectados	63

Figura 20. Variação entre a expressão de IFN- γ e de IL-10 em portadores assintomáticos do HTLV-1, pacientes com PET/MAH e indivíduos não infectados	65
Figura 21. Associação entre a expressão de IFN- γ e o estado neurológico de indivíduos infectados pelo HTLV-1 em função da carga proviral	67
Figura 22. Frequência de células T CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ em indivíduos não infectados, portadores assintomáticos de HTLV-1 e em pacientes com PET/MAH	71
Figura 23. Frequência de células T CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ de acordo com a intensidade de expressão de CD25	72
Figura 24. Correlação entre a expressão de CD25 em células T CD4 ⁺ e a carga proviral de HTLV-1	74
Figura 25. Correlação entre as frequências de células T CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ e de células T CD4 ⁺ CD25 ^{high} FoxP3 ⁺ e a carga proviral de HTLV-1	74
Figura 26. Determinação de subpopulações de células T CD4 ⁺ pela expressão de CD127	76
Figura 27. Contagens de Tregs em indivíduos infectados pelo HTLV-1	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Subtipos de células T reguladoras	31
Tabela 2.	Aspectos demográficos e clínicos dos indivíduos da pesquisa	55
Tabela 3.	Associação entre carga proviral elevada de HTLV-1 e PET/MAH	56
Tabela 4.	Expressão relativa de <i>tax</i> e <i>HBZ</i> em ACs e pacientes com PET/MAH	61
Tabela 5.	Correlação entre a expressão de <i>tax</i> , <i>HBZ</i> , <i>IL-10</i> e <i>IFN-γ</i> e a carga proviral de HTLV-1	66
Tabela 6.	Frequência e contagens absolutas de leucócitos e linfócitos	68
Tabela 7.	Frequências e contagens de subpopulações de células T CD4 ⁺	69
Tabela 8.	Expressão de CD25 em células T CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ e CD4 ⁺ FoxP3 ⁽⁻⁾	73

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	Expressão relativa de <i>tax</i> e <i>HBZ</i> determinada pelo método de Pfaffl	62
------------------	---------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE ANEXOS

Anexo I.	Termo de consentimento livre e esclarecido	127
-----------------	--------------------------------------------------	-----

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1.	Breve histórico	1
1.2.	Subtipos de HTLV	1
1.3.	Patogênese na infecção por HTLV-1	3
1.4.	Replicação viral	5
1.4.1.	Estrutura das partículas de HTLV-1	5
1.4.2.	Mecanismo de internalização viral	7
1.4.3.	Transmissão da infecção entre células – sinapse virológica	9
1.4.4.	Transcrição reversa e integração proviral de HTLV-1	13
1.4.5.	Organização e expressão do genoma proviral de HTLV-1	16
1.4.6.	Proteína Tax de HTLV-1	19
1.4.7.	Controle temporal da replicação de HTLV-1 pela proteína Rex	23
1.4.8.	Funções das proteínas acessórias de HTLV-1	24
1.4.9.	Regulação da replicação viral pela proteína HBZ de HTLV-1	25
1.5.	Células T reguladoras	30
1.5.1.	Caracterização fenotípica das Tregs	30
1.5.2.	Origem e diferenciação das Tregs	32
1.5.3.	Mecanismos propostos de imunossupressão mediados pelas Tregs	35
1.5.4.	Papel das Tregs nas infecções virais crônicas	38
1.6.	Papel das Tregs na infecção pelo HTLV-1	39
2.	OBJETIVOS	41
2.1.	Objetivo geral	41
2.2.	Objetivos específicos	41
3.	METODOLOGIA	42

3.1.	Tipo de estudo e aspectos éticos	42
3.2.	Critérios de elegibilidade	43
3.2.1.	Critérios de inclusão	43
3.2.2.	Critérios de exclusão	43
3.3.	Casuística, coleta de dados e de material biológico	43
3.4.	Extração de DNA a partir de leucócitos de sangue periférico	44
3.5.	Determinação da carga proviral de HTLV-1 por PCR em tempo real	44
3.6.	Avaliação do perfil de integração dos provírus de HTLV-1 em leucócitos de sangue periférico a partir da técnica de PCR invertido longo (IL-PCR)	45
3.7.	Separação de células mononucleares a partir de sangue periférico	48
3.8.	Marcação das células mononucleares para análise de subpopulações de células T CD4⁺ por citometria de fluxo	49
3.9.	Análise dos dados obtidos por citometria de fluxo	50
3.10.	Extração de RNA de células mononucleares de sangue periférico ..	52
3.11.	Síntese de cDNA a partir do RNA total de células mononucleares ...	52
3.12.	Determinação da expressão de genes virais e celulares em células mononucleares de sangue periférico	53
3.13.	Análise estatística	54
4.	RESULTADOS	54
4.1.	Aspectos demográficos e clínicos dos indivíduos da pesquisa	54
4.2.	Determinação do padrão de integração proviral e da frequência de clones infectados persistentes em portadores assintomáticos do HTLV-1 e pacientes com PET/MAH	57
4.3.	Avaliação da expressão dos genes <i>tax</i> e <i>HBZ</i> de HTLV-1 em PBMCs de portadores assintomáticos do HTLV-1 e em indivíduos com PET/MAH	58

4.4.	Expressão de IL-10 e IFNγ em PBMCs de portadores assintomáticos da infecção pelo HTLV-1 e de indivíduos com PET/MAH	62
4.5.	Correlação entre a expressão de <i>tax</i>, <i>HBZ</i>, <i>IL-10</i> e <i>IFN-γ</i> em PBMCs de ACs e de pacientes com PET/MAH com a carga proviral de HTLV-1	65
4.6.	Associação entre a expressão de IFN-γ e a condição neurológica de indivíduos infectados pelo HTLV-1 em função da carga proviral	66
4.7.	Aspectos imunológicos dos indivíduos da pesquisa	68
4.8.	Caracterização de células T reguladoras em indivíduos infectados pelo HTLV-1	70
4.8.1.	Papel da expressão de CD25 na caracterização de Tregs em indivíduos infectados pelo HTLV-1	71
4.8.2.	Papel da expressão de CD127 na identificação de Tregs em indivíduos infectados pelo HTLV-1	75
4.9.	Frequência de Tregs em indivíduos infectados pelo HTLV-1	78
5.	DISCUSSÃO	79
6.	CONCLUSÕES	97
7.	REFERÊNCIAS	99

1. INTRODUÇÃO:

1.1. Breve histórico:

O vírus linfotrópico para células T humanas do tipo 1 (HTLV-1) foi o primeiro retrovírus descrito em humanos, tendo sido identificado por Robert Gallo e seu grupo de pesquisa em 1980, a partir de uma linhagem de células T (HUT102) estabelecida de um linfoma cutâneo (Gallo, 2005). Contudo, o primeiro evento para a descoberta do HTLV-1 foi a descrição da leucemia/linfoma de células T do adulto (LLTA) por Kiyoshi Takatsuki e seus colaboradores no Japão, em 1976 (Uchiyama *et al.*, 1977), em que relataram uma leucemia com características únicas, tais como células maduras com núcleo lobulado e fenótipo de superfície incomum (Yoshida, 2005). Em 1981, Hinuma *et al.* demonstraram que linhagens celulares estabelecidas de pacientes com LLTA produziam partículas virais e antígenos de superfície que reagiam com anticorpos de pacientes com LLTA, denominando tais vírus de ATLV. Posteriormente, HTLV e ATLV foram reconhecidos como idênticos.

Logo após a descoberta do HTLV-1, até então denominado apenas HTLV, estudos desenvolvidos de forma independente no Japão e ilhas do Caribe indicaram uma associação deste vírus com uma mielopatia de progressão lenta. Em 1985, Gessain *et al.* demonstraram que aproximadamente 60% dos pacientes com paraparesia espástica tropical (PET) testados em Fort-de-France, Martinica, eram soropositivos para HTLV. Independentemente, em 1986, em Kagoshima, Japão, uma das regiões de maior prevalência de LLTA, foi também demonstrado que pacientes manifestando uma forma de paraparesia espástica de progressão lenta apresentavam anticorpos reativos para HTLV, tanto no soro quanto no líquido cefalorraquidiano, sendo por isso denominada mielopatia associada ao HTLV (MAH) (Izumo *et al.* 2000; Izumo, 2010). Posteriormente, a PET associada ao HTLV e a MAH foram descritas como uma única entidade clínica, sendo reconhecidas pelo acrônimo PET/MAH.

1.2. Subtipos de HTLV:

Até o momento, já foram identificados quatro tipos de HTLV: HTLV-1, -2, -3, e -4, que são classificados como deltaretrovírus, pertencentes a família de retrovírus

complexos, caracterizados pela expressão de proteínas reguladoras codificadas por mRNAs cujo *splicing* promove a remoção de dois introns (Manel *et al.*, 2005). A maioria dos indivíduos infectados por HTLV-1 permanece assintomática ao longo da vida, e somente uma pequena parcela (0,5 a 5%) desenvolve alguma doença associada à infecção, sendo as principais a LLTA e a PET/MAH (Gessain *et al.*, 1985; Osame *et al.*, 1986; Nagai & Osame, 2003; Araújo & Silva, 2006).

A infecção por HTLV-1 também tem sido relacionada a outras manifestações, tais como dermatite infecciosa (Bittencourt & Oliveira, 2010), xerose (Lenzi *et al.*, 2003), polimiosite (Higuchi *et al.*, 1995; Douen *et al.*, 1997), uveíte (Merle *et al.*, 2002; Kamoi & Mochizuki, 2012), bexiga neurogênica (Saito *et al.*, 1991; Silva *et al.*, 2007) e neuropatia periférica (Leite *et al.*, 2004), alterações cognitivas (Silva *et al.*, 2003) e disautonômicas (Alamy *et al.*, 2001). Por outro lado, a infecção por HTLV-2, descrito em 1982 por Robert Gallo e colaboradores (Kalyanaraman *et al.*, 1982), raramente é patogênica, havendo poucos relatos na literatura sobre casos de manifestações neurológicas que se assemelham à PET/MAH (Hjelle *et al.*, 1992; Dooneief *et al.*, 1996; Murphy *et al.*, 1997), e nenhuma ligação contundente com o desenvolvimento de desordens linfoproliferativas (Feuer & Green, 2005). Recentemente, em 2005, foram descritos os subtipos HTLV-3 e HTLV-4 a partir de amostras de sangue de caçadores de gorilas nas selvas do Camarões, África Central, e até o momento não foram associados a doenças (Calattini *et al.*, 2005; Wolfe *et al.*, 2005; Mahieux & Gessain, 2011).

Atualmente, não há estimativas corretas do número de indivíduos infectados pelo HTLV-1 em todo o mundo (Hlela *et al.*, 2009). No Brasil, existem poucos estudos que reflitam a realidade de todo o país. Estudos multicêntricos baseados na triagem sorológica de hemocentros de 26 Estados e do Distrito Federal revelaram uma prevalência média de 0,46% de portadores da infecção por HTLV-1/2, sendo as maiores frequências encontradas em capitais das regiões Norte e Nordeste (Figura 1) (Catalan-Soares *et al.*, 2005). Outro estudo de base populacional realizado em Salvador, Bahia, revelou uma prevalência de 1,76% na população geral desta cidade (Dourado *et al.*, 2003). Considerando estas estimativas, espera-se que cerca de um milhão de indivíduos estejam infectados pelo HTLV-1 no Brasil, o que implica em

aproximadamente 10 a 50 mil indivíduos afetados por doenças associadas a esta virose (Carneiro-Proietti *et al.*, 2002).

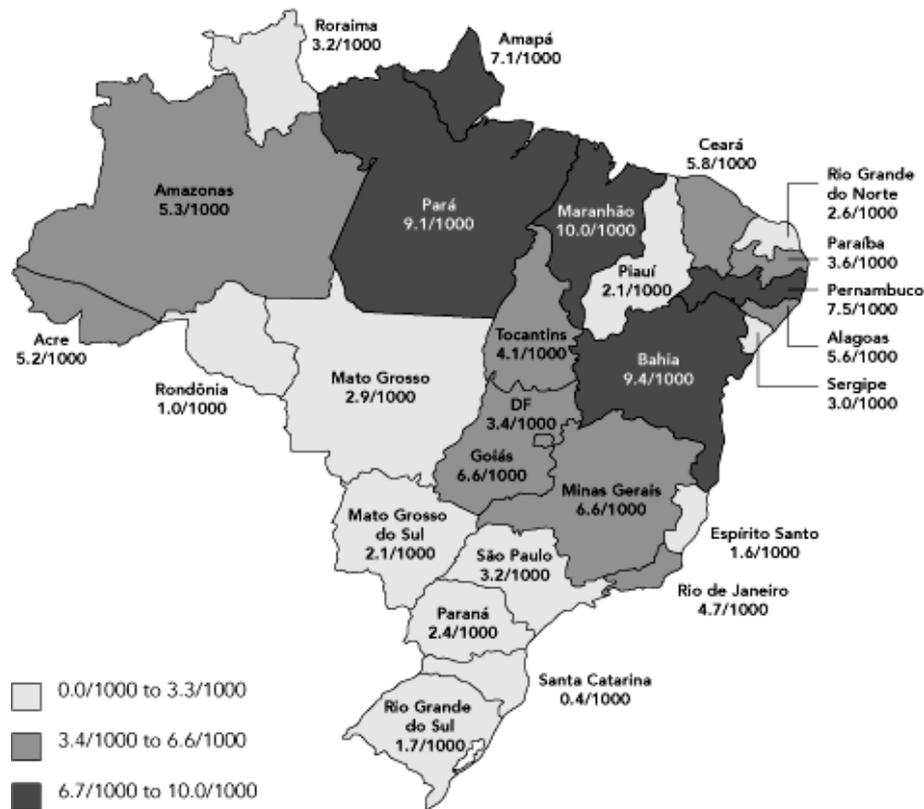


Figura 1. Prevalência da infecção por HTLV-1/2 no Brasil. As taxas de prevalência foram determinadas por triagem sorológica utilizando os resultados de ensaios imunoenzimáticos realizados nos bancos de sangue das capitais de 26 Estados e do Distrito Federal, entre janeiro de 1995 e dezembro de 2000. Os valores estão apresentados como número de indivíduos infectados/1.000 doadores de sangue (Retirado de Catalan-Soares *et al.*, 2005).

1.3. Patogênese na infecção por HTLV-1:

A PET/MAH se manifesta como uma doença desmielinizante, que atinge principalmente o segmento torácico da medula espinhal. A principal área de lesão ocorre no trato cortico-espinhal, sendo que a maioria dos pacientes cita a fraqueza dos membros inferiores como primeiro sintoma (Araújo & Silva, 2006). Clinicamente, a PET/MAH se apresenta como uma paraparesia espástica com sintomas comuns, incluindo dor na região lombar e disfunções urinárias, sendo a incidência três vezes maior em mulheres do que em homens. Além disso, tem sido observado que a

progressão da doença é mais rápida em mulheres, sendo este fato associado ao surgimento dos sintomas após a gravidez e antes da menopausa, sugerindo o envolvimento de hormônios em sua patogênese (Uchiyama, 1997). De modo geral, a PET/MAH evolui em duas etapas, iniciando-se como uma reação inflamatória, que compromete a integridade da barreira hematoencefálica e aumenta o potencial de migração dos linfócitos para o sistema nervoso central (SNC), sendo seguida de um longo estágio de desmielinização (Araújo & Silva, 2006; Lepoutre *et al.*, 2009).

Conforme revisado por Araújo & Silva (2006), o real mecanismo pelo qual a infecção por HTLV-1 resulta no desenvolvimento da PET/MAH ainda é desconhecido. Contudo, existem três hipóteses: (i) a de citotoxicidade direta, em que linfócitos T citotóxicos (CTLs) específicos para HTLV-1 atravessariam a barreira hematoencefálica e eliminariam células da glia infectadas, provocando lesão; (ii) a de mecanismos de autoimunidade, em decorrência de semelhanças antigênicas entre a proteína Tax de HTLV-1 e a riboproteína heterogênea nuclear A1 (hnRNP-A1) expressa por neurônios; (iii) e a de dano indireto, em que respostas de CTLs contra células T infectadas resultariam na produção de citocinas inflamatórias, tais como fator de necrose tumoral α (TNF- α), induzindo a lesão tecidual no SNC (Figura 2). Dessa forma, tem sido sugerido a patogênese da PET/MAH está associada a uma resposta imune exacerbada, em que há o predomínio de respostas do tipo Th1 (Goon *et al.*, 2002), e a presença de níveis elevados de citocinas próinflamatórias, tais como interferon γ (IFN- γ), TNF- α , interleucina (IL)-1, IL-6 e fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) no líquido cefalorraquiano destes pacientes (Lepoutre *et al.*, 2009).

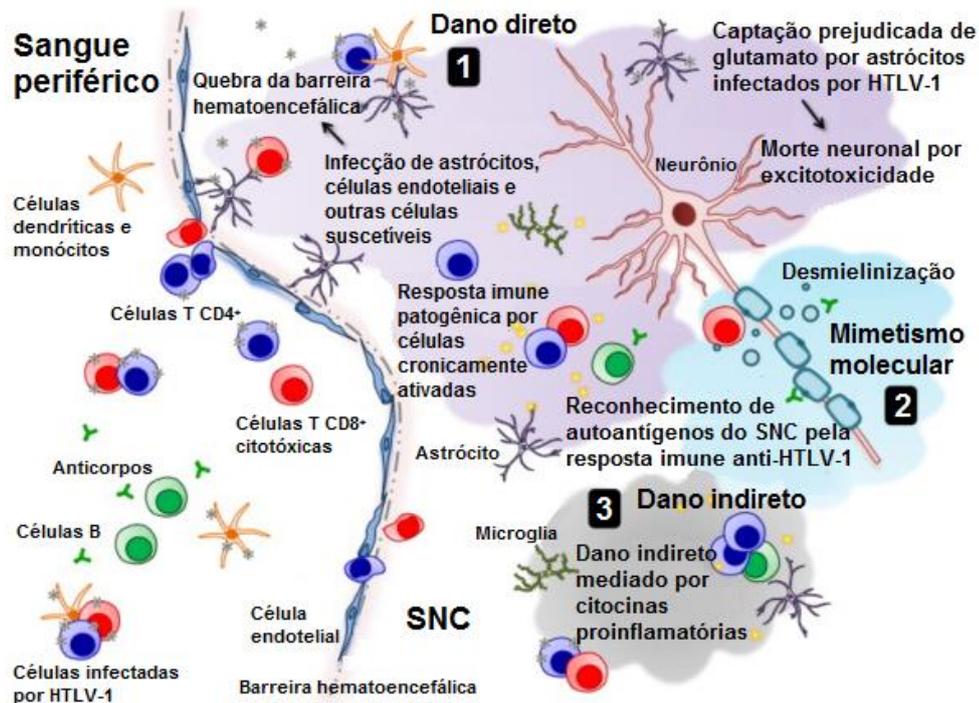


Figura 2. Hipóteses de geração de lesão neurológica na infecção por HTLV-1. Três potenciais mecanismos têm sido propostos para explicar o acometimento neurológico na PET/MAH: (1) o mecanismo de dano direto, que envolve a infecção de células do sistema nervoso central (SNC); (2) o estabelecimento de autoimunidade, devido semelhanças entre determinantes antigênicos da proteína Tax de HTLV-1 e a hnRNP-A1 (riboproteína heterogênea nuclear A1), expressa por células do SNC; e (3) o mecanismo de dano indireto, em decorrência de citotoxicidade mediada por citocinas pró-inflamatórias, que são liberadas durante a eliminação de células T CD4⁺ infectadas por respostas mediadas por CTLs específicas para HTLV-1 (Retirado e adaptado de Oliére *et al.*, 2011).

1.4. Replicação viral:

1.4.1. Estrutura das partículas de HTLV-1:

HTLV-1 é capaz de infectar *in vivo* diferentes tipos celulares, tais como linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, linfócitos B, monócitos, macrófagos (Koyanagi *et al.* 1993) e células dendríticas (DCs) (Jones *et al.*, 2008). Contudo, a infecção produtiva é observada com maior eficiência nos linfócitos T CD4⁺ (Koyanagi *et al.* 1993; Ghez *et al.*, 2010). Estruturalmente, as partículas de HTLV-1 são envelopadas e apresentam em sua superfície espículas compostas por trimeros de duas glicoproteínas: gp46 e gp21 (Figura 3). Ambas derivam da proteína precursora codificada pelo gene *env*, e são geradas após clivagem por enzimas celulares no complexo de Golgi durante a via normal de secreção de proteínas, permanecendo unidas por ligações dissulfeto

(Delamarre *et al.* 1996). A gp46 representa a subunidade de superfície da espícula, exercendo papel na adsorção da partícula viral a receptores presentes na membrana plasmática das células, enquanto a gp21 constitui a porção transmembrana, que ancora o complexo gp46/gp21 ao envelope viral e é responsável pelo processo de fusão de membranas para internalização viral (Ghez *et al.*, 2010). O envelope recobre um capsídeo que, assim como em outros retrovírus, é composto por proteínas derivadas do precursor codificado pelo gene *gag* (do inglês *Group-specific antigen*), que após o brotamento das partículas virais, é clivado pela protease viral. O processamento de Gag gera as proteínas da matriz (MA), do capsídeo (CA) e do nucleocapsídeo que, após reorganização, dão origem a partículas virais estruturalmente maduras (Grigsby *et al.* 2010) (Figura 3). As etapas de formação e brotamento de partículas de HTLV-1 têm início com a oligomerização da proteína precursora Gag na face interna da membrana plasmática da célula infectada, sendo este evento mediado pelas interações do domínio de Gag correspondente a proteína MA e a porção citoplasmática da gp21 (Le Blanc *et al.*, 1999). Após clivagem proteolítica de Gag, as proteínas MA resultantes permanecem associadas à gp21, revestindo a face interna do envelope viral, enquanto as proteínas CA, após sofrerem mudanças conformacionais, originam o capsídeo que abriga o ácido ribonucleico (RNA) genômico associado a nucleoproteínas, transcriptase reversa e integrase (Rayne *et al.*, 2004; Fogarty *et al.*, 2011).

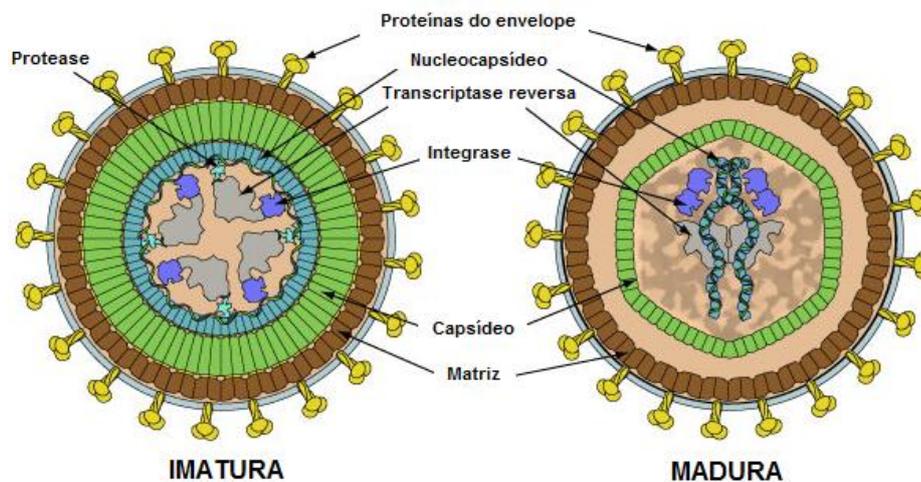


Figura 3. Estrutura das partículas imaturas e maduras de HTLV-1. As partículas de HTLV-1 são envelopadas e apresentam espículas compostas por trimeros das glicoproteínas gp46 e gp21. O envelope recobre um capsídeo composto por proteínas derivadas da proteína precursora Gag que,

após o brotamento das partículas, é clivada pela protease viral. O processamento de Gag gera as proteínas da matriz, do capsídeo e do nucleocapsídeo que, após reorganização, dão origem a partículas virais maduras. O capsídeo abriga um genoma constituído por duas cópias de RNA de fita simples de polaridade positiva, que está associado às nucleoproteínas, à transcriptase reversa e à integrase (Retirado e adaptado de http://viralzone.expasy.org/all_by_species/60.html).

1.4.2. Mecanismo de internalização viral:

As etapas iniciais da infecção por HTLV-1 dependem de interações entre as proteínas do envelope viral e estruturas da membrana celular que atuam como receptores e co-receptores. Manel *et al.* (2003) demonstraram que o transportador de glicose do tipo 1 (GLUT-1) atua como receptor para HTLV-1 e HTLV-2. Contudo, estudos recentes têm demonstrado que outros fatores/co-receptores também estão envolvidos no processo de internalização do HTLV-1, tais como a neuropilina 1 (NP-1) (Ghez *et al.*, 2006; Jin *et al.*, 2010) e os heparan sulfato proteoglicanos (HSPGs) (Piñon *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2005a; Takenouchi *et al.*, 2007). A NP-1 é uma proteína transmembrana que inicialmente foi identificada como um importante fator na orientação de neurônios durante o desenvolvimento embrionário (He & Tessier-Lavigne, 1997) e, posteriormente, como um fator central na regulação da angiogênese (Soker *et al.*, 1998). Com relação às moléculas da família dos HSPGs, estas são compostas por uma proteína central associada a uma ou mais cadeias laterais constituídas por polissacarídeos sulfatados, denominados heparan sulfato glicosaminoglicanos. Devido a sua carga altamente negativa, HSPGs são capazes de se ligar, através de interações eletrostáticas, a diferentes proteínas, tais como fatores de crescimento e seus receptores, quimiocinas, citocinas e proteínas da matriz extracelular e do plasma, desempenhando por isso um importante papel na fisiologia de mamíferos (Bishop *et al.*, 2007). De modo geral, HSPGs participam do processo de infecção por diferentes tipos virais, facilitando a adsorção de partículas às células-alvo antes de interações específicas entre proteínas virais e seus receptores (Ghez *et al.*, 2010).

A importância de NP-1 e dos HSPGs na infecção por HTLV-1 foi demonstrada pela redução da eficiência de infecção de células T CD4⁺ durante o bloqueio da interação entre a proteína de envelope (Env) de HTLV-1 e tais moléculas. A redução da expressão de NP-1 na superfície celular ou a remoção enzimática de HSPG

foram capazes de inibir parcialmente a infecção por HTLV-1, e a formação de sincício mediada por Env (Jones *et al.*, 2008).

Embora células T CD4⁺, que constituem o principal tipo celular acometido pela infecção por HTLV-1, apresentem baixa expressão de HSPG, NP-1 e GLUT-1 quando num estado quiescente, a expressão destas moléculas pode ser induzida durante a ativação celular. Por outro lado, Jones *et al.* (2005b) demonstraram que a ativação celular em si não é um fenômeno essencial a este processo. Células T CD4⁺ infectadas por HTLV-1 secretam níveis aumentados do fator de crescimento tumoral beta (TGF- β), uma citocina com potencial imunossupressor, que também é capaz de induzir o aumento da expressão de receptores para HTLV-1. Considerando os diferentes fatores até então descritos como influentes na adsorção e internalização de HTLV-1, Ghez *et al.* (2010) sugerem que a gp46 interagiria com HSPGs através da sua porção C-terminal, permitindo a adsorção da partícula viral a superfície celular. Isto aumentaria a probabilidade de interações entre gp46 e NP-1. Esta noção é consistente com as observações de que a remoção de HSPGs da superfície celular reduz drasticamente a ligação de gp46 ou de virions às células T CD4⁺ (Jones *et al.*, 2005b). A interação com NP-1 ativaria uma mudança conformacional na gp46, permitindo sua interação com GLUT-1, o que finalmente desencadearia o processo de fusão de membranas mediado pela gp21, necessário à internalização viral (Figura 4). Neste modelo, NP-1 e HSPG representariam o receptor primário de ligação viral, enquanto GLUT-1 seria o receptor de fusão, sendo esta hipótese corroborada pelo fato da superexpressão de GLUT-1 não aumentar o nível de ligação de gp46 de HTLV-1 à superfície celular (Ghez *et al.*, 2010).

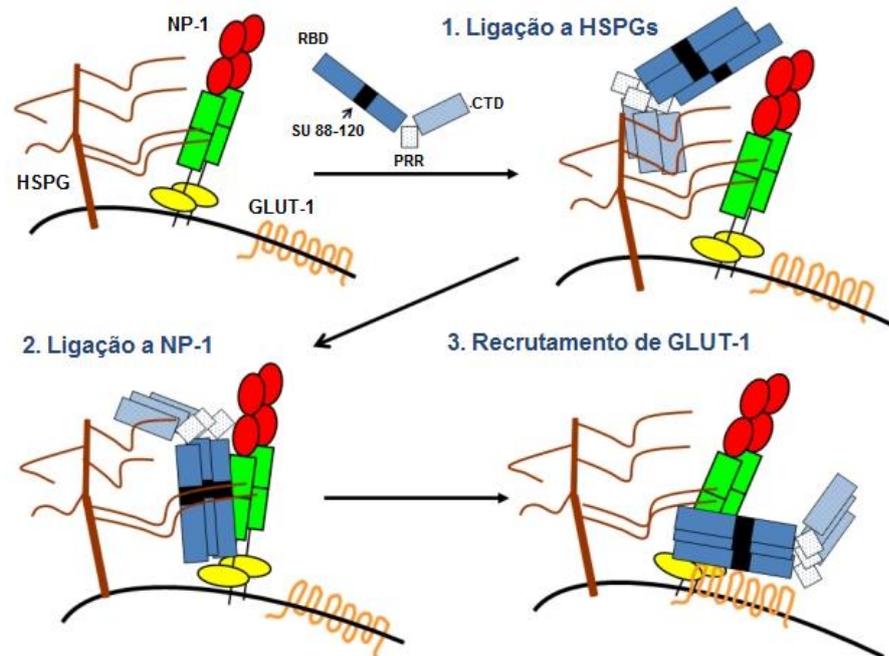


Figura 4. Modelo do complexo de receptores para infecção por HTLV-1. 1) A interação de HSPG com a gp46 permite a adsorção e concentração de vírions na superfície da célula, facilitando o seu recrutamento para NP-1. 2) A região dos aminoácidos 90-94 da gp46 interage com o domínio β da NP-1, sendo esta interação estabilizada por HSPGs. 3) A interação entre gp46 e NP-1 desencadeia uma mudança conformacional na gp46, permitindo a exposição da tirosina 114, que é crucial para a ligação ao receptor de glicose do tipo 1 (GLUT-1). A interação entre GLUT-1 e gp46 promove uma alteração conformacional que expõe o peptídeo de fusão da gp21 (não demonstrado), possibilitando a fusão entre o envelope viral e a membrana celular, permitindo a internalização do genoma viral. A gp46 de HTLV-1 está representada em azul, sendo destacados seus três domínios: o domínio de ligação ao receptor (RBD), a região rica em prolina (PRR) e o domínio C-terminal (CTD). A região destacada em preto dentro do RBD representa a região de 88-120 aminoácidos que contém o motivo KPxR e os resíduos D106/Y114 responsáveis pela ligação à NP-1 ou GLUT-1, respectivamente (Retirado e adaptado de Jones *et al.*, 2011).

1.4.3. Transmissão da infecção entre células – sinapse virológica:

A dificuldade de detecção de partículas livres de HTLV-1 nos fluidos de indivíduos infectados, durante muito tempo, fundamentou o pensamento de que a infecção cursava de modo latente, e que a replicação viral se limitava essencialmente à expansão de populações celulares carregando cópias do provírus de HTLV-1 (Wattel *et al.*, 1996). Tal hipótese era corroborada por algumas características da infecção, tais como a alta estabilidade genética da sequência viral (Van Dooren *et al.*, 2004), o fenômeno de proliferação espontânea *in vitro* de linfócitos de pacientes infectados mesmo na ausência de estímulos mitogênicos

(Mann *et al.*, 1994), e a baixa variabilidade nos níveis da carga proviral (CPV) no indivíduo ao longo do tempo (Matsuzaki *et al.*, 2001; Furtado *et al.*, 2012). Contudo, tanto portadores assintomáticos (ACs) quanto indivíduos com PET/MAH apresentam, no sangue periférico, uma alta frequência de CTLs ativados específicos para HTLV-1, principalmente contra epítomos da proteína Tax (Kannagi *et al.*, 1991; Daenke *et al.*, 1996; Kattan *et al.*, 2009), o que contradiz a hipótese de infecção viral latente. De fato, a expressão de genes virais pode ser detectada *ex vivo* em linfócitos T, embora em baixos níveis, sendo mais elevada em pacientes com PET/MAH do que em ACs (Hanon *et al.*, 2000a; Toulza *et al.*, 2008). Além disso, Asquith *et al.* (2007) ao avaliarem a dinâmica populacional de linfócitos infectados pelo HTLV-1 *in vivo*, utilizando glicose marcada com deutério para calcular a taxa de renovação celular, demonstraram a proliferação seletiva de células T infectadas expressando a proteína Tax, especialmente em populações de células T CD4⁺CD45RO⁺ e CD8⁺CD45RO⁺, cujo fenótipo caracteriza células T de memória (Mackay *et al.*, 1999).

Em contrapartida à síntese de níveis indetectáveis de partículas livres de HTLV-1 por linfócitos normais naturalmente infectados (Fan *et al.*, 1992), tem sido observado que a transmissão eficiente do HTLV-1 requer contato celular, tanto *in vitro* (Yamamoto *et al.*, 1982; Derse *et al.*, 2004; Mazurov *et al.*, 2010) quanto *in vivo*, e que depende da transferência de linfócitos infectados pelo leite materno (Ureta-Vidal *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2004), sêmen (Moriuchi & Moriuchi, 2004) ou por produtos sanguíneos para transfusão (Mahieux & Gessain, 2003). Inicialmente, este contato é favorecido pelo próprio processo de reconhecimento antigênico, mais precisamente, pela formação da estrutura denominada sinapse imunológica (Nejmeddine & Bangham, 2010), que consiste numa região de contato celular especializada formada pela interação entre moléculas de adesão e de sinalização celular, onde são secretadas citocinas ou grânulos líticos (Grakoui *et al.*, 1999). Dessa forma, as interações entre diferentes tipos celulares durante a resposta imunológica resultam numa maior exposição à infecção de células T específicas para HTLV-1 do que populações celulares reativas para outros antígenos, sendo este fenômeno evidente tanto para células T CD4⁺ (Goon *et al.*, 2002) quanto para células T CD8⁺ (Hanon *et al.*, 2000b). Contudo, tem sido descrito que este não é o mecanismo diretamente envolvido na transmissão do HTLV-1. A observação de conjugados formados

espontaneamente *ex vivo* entre células T CD4⁺ de pacientes infectados pelo HTLV-1 e linfócitos autólogos (ou alogenícos), através de microscopia confocal, revelou uma nova estrutura de junção célula-célula, denominada sinapse virológica em função da sua semelhança estrutural à sinapse imunológica (Igakura *et al.*, 2003).

A sinapse virológica é definida como uma área especializada de contato entre células induzida pela infecção viral, que promove a transmissão direcionada do material genético viral sintetizado pela célula infectada para a célula-alvo (Figura 5) (Nejmeddine & Bangham, 2010). Este processo difere da sinapse imunológica, cuja ativação depende do engajamento do receptor de células T (TCR) e de moléculas coestimulatórias, sendo observada a polarização do centro de organização de microtúbulos (MTOC) da célula T responsiva em direção à célula apresentadora de antígeno (APC) (Jenkins *et al.*, 2009). Tem sido demonstrado que tais mecanismos que ativam a remodelação de citoesqueleto, e a polarização de moléculas de adesão e do MTOC para a região de sinapse virológica, são induzidos por proteínas virais (Igakura *et al.*, 2003). Além disso, a polarização de MTOC nas células infectadas é aumentada pela participação de duas moléculas: a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), que interage com a integrina LFA-1 na célula-alvo (Barnard *et al.*, 2005), e/ou a cadeia α do receptor de IL-2 (CD25), cujo papel na polarização seletiva resulta a princípio da sua associação física com ICAM-1 na membrana plasmática das células T (Nejmeddine & Bangham, 2010).

Em linfócitos T individualizados e não-polarizados, a proteína Gag forma grandes inclusões citoplasmáticas, distribuídas randomicamente na periferia celular, sob a membrana plasmática (Figura 5A) (Le Blanc *et al.*, 2002). Após a formação de conjugados entre linfócitos T infectados pelo HTLV-1 e células autólogas, as proteínas Gag e Env são redistribuídas, sendo concentradas na região de contato celular, que é caracterizada pela formação de diversas fendas sinápticas (Igakura *et al.*, 2003; Nejmeddine *et al.*, 2005; Majorovits *et al.*, 2008). Estas sinapses podem constituir sítios de brotamento viral, pois contêm partículas envelopadas com morfologia e tamanho compatíveis com virions de HTLV-1 (Figura 5B) (Majorovits *et al.*, 2008). Igakura *et al.* (2003) demonstraram que a proteína Gag de HTLV-1 e cópias do RNA genômico acumuladas na região de junção celular, após 2h, são transferidas da célula infectada para a célula-alvo. Recentemente, Mazurov *et al.*

(2010) através de um sistema de vetor para replicação viral determinaram a contribuição da proteína Tax na transmissão da infecção por contato celular, utilizando como controle comparativo a influência na infecção pelo vírus da imunodeficiência humana do tipo 1 (HIV-1). Estes autores observaram que a transmissão célula-célula de HTLV-1 foi $>10^4$ vezes mais eficiente do que utilizando partículas virais livres, enquanto a infecção por HIV-1 teve sua eficiência de transmissão elevada em apenas duas vezes. Além disso, a interferência com a polimerização de microtúbulos, através do tratamento com nocodazol, reduziu em 85% a infecciosidade de HTLV-1 nos co-cultivos celulares, enquanto nos controles realizados com HIV-1 a redução foi de 60%. Dessa forma, os autores demonstraram que a proteína Tax participa do processo de transmissão viral, sendo o principal determinante de diferenças entre a transmissão de HTLV-1 e HIV-1.

O desenvolvimento de mecanismos especializados, como por exemplo a sinapse virológica, maximizam a eficiência de transmissão e limitam a exposição de partículas virais a mecanismos de defesa do hospedeiro. Dessa forma, o sequestro de partículas nas fendas sinápticas presumivelmente permite a transferência eficiente de um pequeno número de virions (Nejmeddine & Bangham, 2010). Pais-Correia *et al.* (2010) também relataram que partículas de HTLV-1 podem ser transferidas de uma célula para outra através da região de contato, ou pela periferia da sinapse virológica, através de uma estrutura semelhante a um biofilme na superfície celular, que contém acúmulos de partículas virais, num ambiente rico em carboidratos e protegido da ação de componentes do sistema imune, tais como o complemento e anticorpos (Figura 5B).

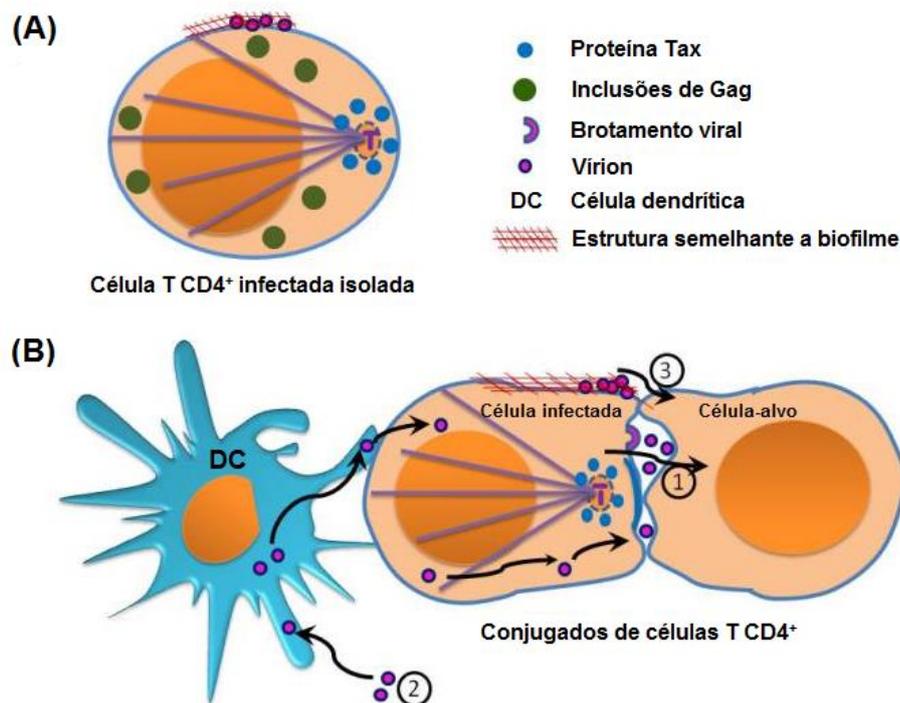


Figura 5. Modelo da formação da sinapse virológica na infecção por HTLV-1. (A) Em linfócitos isolados, as proteínas virais não se encontram polarizadas. (B) HTLV-1 pode ser transmitido entre células pelas seguintes rotas: 1) Transmissão célula-célula através das fendas sinápticas delimitadas por regiões de contato entre a célula infectada e a célula-alvo. 2) Partículas virais livres podem ser internalizadas por células dendríticas (DC) e transferidas para linfócitos durante contato celular. 3) Partículas produzidas podem ser retidas na superfície celular em uma estrutura semelhante a um biofilme antes da transferência lateral para células-alvo através da região adjacente externa à sinapse virológica. (Retirado e adaptado de Nejmeddine & Bangham, 2010).

1.4.4. Transcrição reversa e integração proviral de HTLV-1:

Após a infecção celular, o RNA genômico viral, que é composto por duas moléculas idênticas de RNA de fita simples de polaridade positiva, é transcrito em duas moléculas lineares de ácido desoxirribonucleico (DNA) de dupla-fita pela transcriptase reversa (RT) viral no citoplasma. Este processo duplica as regiões únicas 5' (U5) e 3' (U3) presentes nas extremidades 5' e 3', respectivamente, originando duas repetições terminais longas (*long terminal repeats*, LTRs) idênticas, cada uma consistindo de regiões U3/R/U5, que são características do genoma retroviral em sua forma de DNA (Coffin, 1997). As LTRs contêm sequências promotoras e elementos de estímulo da transcrição, e na 3'-LTR também existem

sinais para poliadenilação dos RNAs mensageiros (mRNAs) virais (Kannian & Green, 2010).

Uma vez concluída a transcrição reversa, o DNA viral é transportado para o núcleo, onde ocorre a etapa de integração ao genoma da célula infectada. Este processo é realizado pela enzima viral integrase, que cliva duas bases da terminação 3' de cada uma das fitas do DNA viral, gerando terminais 3'-OH que permitem a ligação do provírus ao DNA celular por ataque nucleofílico (Coffin, 1997). Embora a integrase seja suficiente para catalisar as etapas básicas de clivagem e ligação do DNA, tem sido demonstrado que diversos componentes do sistema celular de reparo de DNA atuam no estabelecimento do provírus, sendo responsáveis por finalizar o processo de integração (Engelman, 2003). A integração retroviral pode ser influenciada por diferentes fatores, tais como estrutura da cromatina, nível de transcrição gênica, interações DNA-proteína, metilação de CpG, e composição nucleotídica da sequência-alvo do DNA celular (Leclercq *et al.*, 2000). A preferência por sítios de integração varia dentre diferentes gêneros de retrovírus: lentivírus, tais como HIV e o vírus da imunodeficiência símia, se integram predominantemente em genes e unidades transcrpcionais, enquanto a integração de gamaretrovírus, como por exemplo o vírus da leucemia murina (MLV), ocorre geralmente próxima a sítios de iniciação da transcrição e ilhas CpG (Derse *et al.*, 2007). Por outro lado, HTLV-1, que pertence ao gênero deltaretrovírus, não apresenta alvos específicos no DNA humano, sendo sua integração detectada em unidades de transcrição, sítios de iniciação da transcrição e ilhas CpG, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Derse *et al.*, 2007; Meekings *et al.*, 2008). Derse *et al.* (2007) observaram que a integração de HTLV-1 parece não ocorrer de forma essencialmente randômica, quando considerada a sequência de nucleotídeos do DNA alvo, sendo detectada principalmente em regiões ricas em A/T nos pacientes com PET/MAH (Meekings *et al.*, 2008) ou com LLTA (Chou *et al.*, 1996). Além disso, tem sido descrito que a especificidade de integração sofre mais influência das características locais do DNA celular do que da acessibilidade a regiões específicas (Leclercq *et al.*, 2000). Estes dados corroboram evidências de que MLV, HIV-1 e HTLV-1 se integram preferencialmente próximos a regiões de ligação a matriz (MARs). MARs são sequências localizadas na base das alças de DNA, que se ligam a matriz nuclear e estão situadas próximo ao maquinário celular de replicação e

transcrição do DNA nuclear, e de processamento e transporte de RNAs. Não existem sequências consenso que definam as MARs. Contudo, estas regiões costumam exibir trechos ricos em A/T e sítios para ligação de fatores de transcrição e para ligação e clivagem por topoisomerasas I e II (Johnson & Levi, 2005).

Recentemente, Gillet *et al.* (2011) demonstraram que indivíduos infectados pelo HTLV-1 normalmente carregam entre 500 e 5000 clones com diferentes sítios de integração. Clones de células T infectadas são capazes de persistir por muitos anos em pacientes (Cavrois *et al.*, 1998), principalmente aqueles contendo provírus inseridos em regiões de baixa expressão gênica, independentemente do estado clínico (Gillet *et al.*, 2011). Dessa forma, tem sido sugerido que a transmissão de HTLV-1 através da sinapse virológica desempenha um importante papel no início da infecção (Nejmeddine & Bangham, 2010), enquanto a proliferação de células carregando provírus é responsável por manter os níveis de carga proviral, uma vez estabelecida a infecção de forma persistente e alcançado o equilíbrio com os mecanismos de resposta imune (Bangham & Osame, 2005). Em geral, indivíduos infectados apresentam uma intensa e crônica resposta de CTLs ativadas específicos para HTLV-1 (Kannagi *et al.*, 1991; Daenke *et al.*, 1996; Kattan *et al.*, 2009), sugerindo que a expressão de antígenos virais ocorre de forma persistente. E tem sido proposto que este mecanismo é capaz de limitar os níveis de CPV e reduzir o risco de desenvolvimento da PET/MAH (Bangham & Osame, 2005). Tem sido demonstrado que a abundância de clones infectados por HTLV-1 e o nível de expressão viral podem ser influenciados por características do genoma celular adjacente ao sítio de integração do provírus (Zoubak *et al.*, 1994; Gillet *et al.*, 2011). Consequentemente, a expressão de produtos virais, com destaque para a proteína Tax, influencia tanto a proliferação das células infectadas quanto a sua susceptibilidade à lise por CTLs (Bangham & Osame, 2005). Zoubak *et al.* (1994) demonstraram que provírus silenciados se localizam principalmente em regiões do genoma humano pobres em GC (39-44% GC), que apresentam uma baixa concentração de genes. Em contraste, demonstraram que provírus com expressão ativa se localizam em regiões ricas em GC, que apresentam uma alta frequência de genes, e forte atividade de transcrição e recombinação, sendo dotadas de cromatina com estrutura aberta.

Gillet *et al.* (2011) sugerem que a baixa expressão do provírus de HTLV-1, associada ao silenciamento transcricional da região genômica do sítio de integração, permite à célula infectada escapar da eliminação pela resposta imune. Células expressando genes virais sofrem uma forte seleção negativa durante a fase crônica da infecção, o que moldaria *in vivo* a frequência de clones infectados pelo HTLV-1, sendo este processo significativamente mais intenso em ACs do que em pacientes com PET/MAH ou LLTA (Gillet *et al.*, 2011). Além disso, foi observado que a expansão clonal *in vivo* é favorecida pela orientação de integração do provírus no mesmo sentido do gene celular mais próximo, o que poderia resultar da expressão aumentada da proteína Tax (Gillet *et al.*, 2011). Corroborando estes dados, foi demonstrado que a frequência de integração em regiões genômicas ativas está associada à expressão espontânea do provírus e com a PET/MAH (Meekings *et al.*, 2008). Com base em evidências de estudos da genética de HTLV-1 e de indivíduos infectados na fase crônica, Gillet *et al.* (2011) sugerem que indivíduos que permanecem assintomáticos provavelmente estabelecem mecanismos de imunidade anti-HTLV-1 mais efetivos do que pacientes com PET/MAH.

1.4.5. Organização e expressão do genoma proviral de HTLV-1:

O genoma de HTLV-1 apresenta, além dos genes *gag*, *pol* e *env*, que codificam para proteínas estruturais comuns a todos os retrovírus, uma região denominada *pX*, localizada entre o gene *env* e a 3'-LTR (Figura 6) (Boxus *et al.*, 2008). Esta região contém quatro janelas de leitura aberta (ORFs, do inglês *open read frames*) parcialmente sobrepostas que codificam para as proteínas acessórias p12 (ORF I), p13 e p30 (ORF II), e para as proteínas reguladoras Rex (ORF III) e Tax (ORF IV), que atuam em níveis transcricional e pós-transcricional (Nicot *et al.*, 2004; Peloponese *et al.*, 2007), facilitando a transmissão viral e permitindo o estabelecimento de infecção persistente (Collins *et al.*, 1998; Ye *et al.*, 2003; Nicot *et al.*, 2005; Hilaragi *et al.*, 2006). Além disso, a fita complementar do provírus codifica para a proteína denominada Fator básico de zíper de leucina de HTLV-1 (HBZ), que atua como um regulador da expressão de Tax e influencia a proliferação das células T infectadas (Satou *et al.*, 2006) (Figura 6).

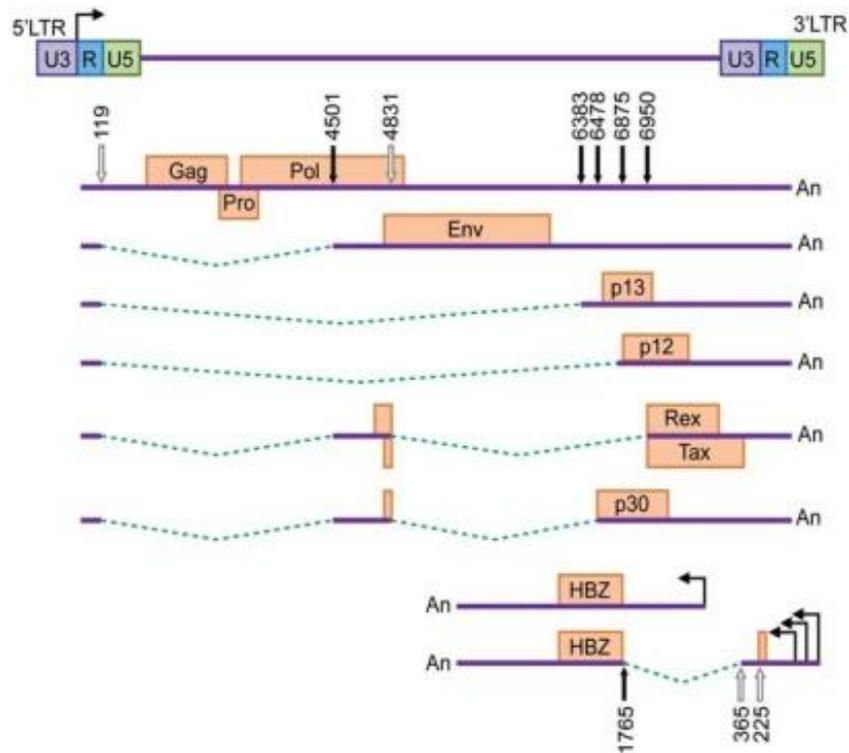


Figura 6. Estrutura do genoma proviral de HTLV-1 e seus transcritos. O DNA proviral com as LTRs, e os transcritos que não são submetidos ao *splicing*, ou que sofrem a retirada de um ou dois íntrons, estão apresentados em escala. Os nomes dos genes estão destacados em caixas de texto, que representam a região codificante para as proteínas. Linhas sólidas representam exons, enquanto linhas pontilhadas indicam íntrons. Sítios de *splicing* estão indicados por setas e os números representam as posições dos nucleotídeos relativos aos RNAs virais (Retirado de Kannian & Green, 2010).

Durante a fase inicial do processo de replicação de HTLV-1, os primeiros ciclos de transcrição do genoma proviral dependem exclusivamente da função de fatores celulares (Kannian & Green, 2010). Nas LTRs localizadas nas extremidades 5' e 3' do provírus, mais precisamente na região U3, está presente uma seqüência promotora da transcrição, denominada Elemento Responsivo de Tax (TxRE) (Felber *et al.*, 1985). Esta seqüência constitui uma repetição de 21pb do motivo 5'-TGACG(T/A)(C/G)(T/A)-3', flanqueada por seqüências ricas em GC, e é análoga ao Elemento Responsivo ao cAMP (CRE) (5'-TGACGTCA-3'), que permite a ligação do fator de transcrição celular CREB (Beimling & Moelling, 1992; Kannian & Green, 2010). Estudos *in vitro* demonstraram que Tax não é capaz de ligar-se diretamente as seqüências TxRE (Giam & Xu, 1989). Contudo, é capaz de interagir com o domínio básico de zíper de leucina (bZIP) do fator CREB, estimulando a sua

dimerização (Giebler *et al.*, 1997) e, conseqüentemente, aumentando a sua afinidade pelos motivos TxRE das LTRs de HTLV-1 (Lundblad *et al.*, 1998). Além disso, Tax recruta co-ativadores, tais como CBP/p300, para os sítios de iniciação da transcrição, desempenhando assim sua principal função: a de transativador da expressão viral (Azran *et al.*, 2004) (Figura 7).

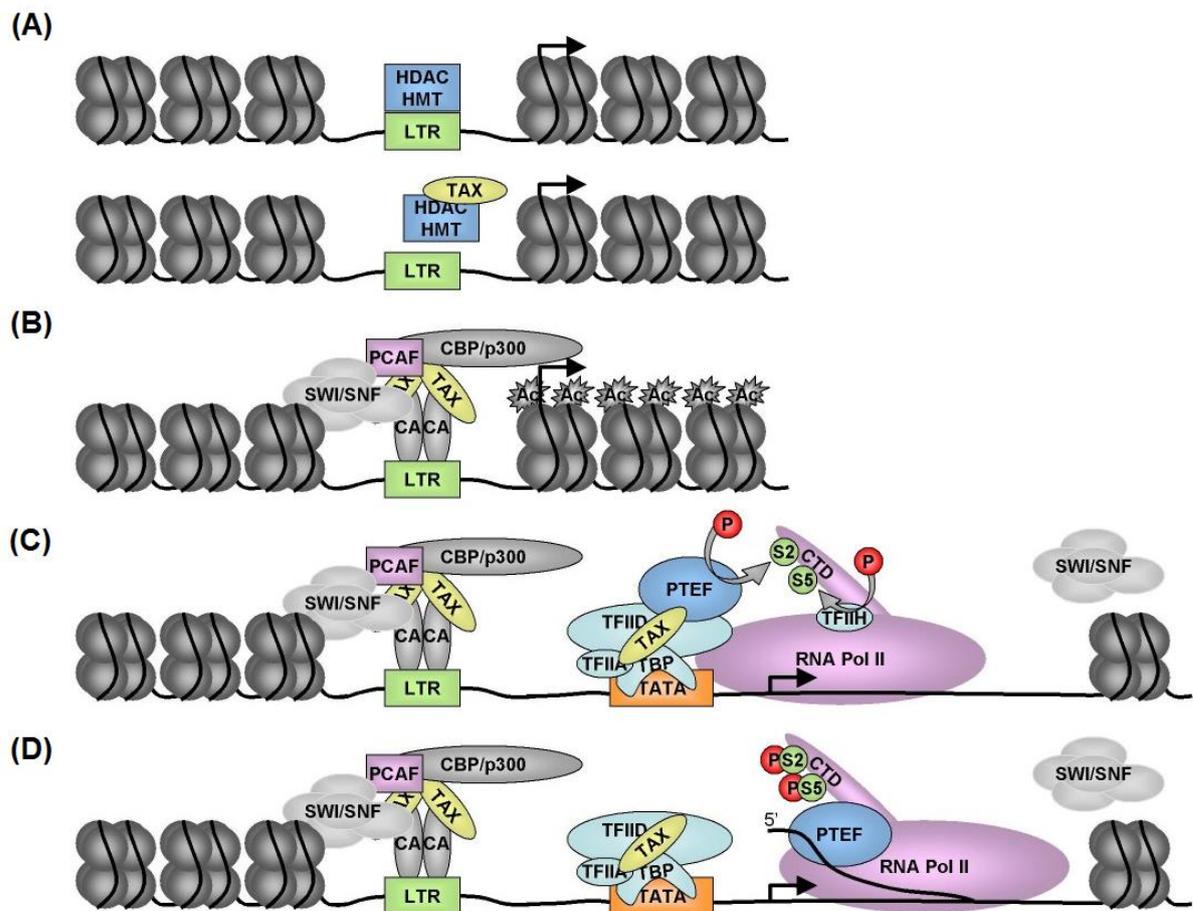


Figura 7. Modelo da transativação gênica mediada pela proteína Tax. (A) Tax libera a repressão transcripcional das LTRs por interação direta com histonas deacetilases, promovendo a dissociação das histonas do DNA. (B) Tax recruta os fatores de transcrição CREB/ATF (CA), enzimas modificadoras de histonas e de remodelação da cromatina (SWI/SNF, P/CAF and CBP/p300), (C) permitindo a ligação de fatores da transcrição basais a seqüências TATA box. Uma vez formado o complexo de iniciação, Tax recruta o fator P-TEFb, levando a fosforilação de CTD, permitindo o início da síntese de mRNAs pela RNA pol II. (D) Além disso, sua interação com SWI/SNF previne a interrupção do alongamento da fita de RNA (Retirado de Boxus *et al.*, 2008).

1.4.6. Proteína Tax de HTLV-1:

A proteína viral Tax é uma fosfoproteína de 40kDa, originalmente descrita como uma proteína nuclear (Smith & Greene, 1992), sendo posteriormente observada sua capacidade de migrar do núcleo para o citoplasma (Alefantis *et al.*, 2005). No núcleo, a localização de Tax se sobrepõe aos sítios de transcrição (Semmes & Jeang, 1996), enquanto no citoplasma, está associada ao complexo de Golgi e às regiões de contato entre células (Nejmeddine *et al.*, 2005). Diferentes funções têm sido atribuídas à proteína Tax, sendo observada sua interação com membros de várias famílias de fatores de transcrição, incluindo CREB/ATF, o fator de resposta ao soro (SRF), o fator nuclear de células T ativadas (NFAT), e o fator nuclear κ B (NF- κ B) (Figura 8) (Azran *et al.*, 2004; Boxus *et al.*, 2008). Dessa forma, Tax regula a expressão de genes virais e a função de diferentes genes celulares relacionados ao controle dos processos de proliferação, diferenciação e morte celular, de reorganização do citoesqueleto, e de reparo do DNA (Figura 8) (Neuveut & Jeang, 2000; Wu *et al.*, 2004; Nejmeddine *et al.*, 2005; Saggiaro, 2011). Através da interação com CREB/ATF, Tax reprime a expressão de diversos genes celulares, incluindo *ciclina A*, *c-myb* e *p53* (Boxus & Willems, 2012). A atividade do fator de transcrição p53 é central para a manutenção da integridade celular, de modo que a sua inativação, seja por mutação ou silenciamento gênico, aumenta a chance de instabilidade genética, favorecendo a oncogênese (Pise-Masison & Brady, 2005). Contudo, Schavinsky-Khrapunsky *et al.* (2008) demonstraram que a interferência da proteína Tax na função de p53 se comporta de modo dose-dependente em linfócitos T primários. Em pequenas doses, Tax estimula o sistema de reparo de DNA controlado por p53, enquanto em altas doses promove o seu bloqueio. Kinjo *et al.* (2010) recentemente descreveram que Tax compromete a estabilidade genômica por induzir a formação de quebras na dupla-hélice de DNA, fenômeno este relacionado à formação de espécies de oxigênio reativo. Estes autores sugerem que o bloqueio do ciclo celular induzido por este processo decorre de um mecanismo semelhante ao da resposta clássica de reparo do DNA, cujo desfecho pode ser determinado pela extensão das lesões.

Além disso, Tax favorece a proliferação celular, acelerando tanto a transição da fase G1 para S do ciclo celular (Iwanaga *et al.*, 2008) quanto o processo de

replicação do DNA (Kannian & Green, 2010). Estudos de dinâmica celular *in vivo* revelaram que células infectadas pelo HTLV-1 persistem em decorrência das funções desempenhadas por Tax que, provavelmente, em conjunto com outras proteínas virais, aumenta ativamente a taxa de divisão das células infectadas (Figura 8) (Asquith *et al.*, 2007). Segundo Boxus & Willems (2012), o bloqueio do ciclo celular resultante da expressão de Tax parece ser um efeito colateral originado da proliferação descontrolada e subsequente instabilidade genômica. Dessa forma, a evasão do bloqueio do ciclo celular permitiria a proliferação de células, mesmo contendo defeitos no DNA, e o acúmulo de lesões. Enquanto mutações letais afetariam negativamente o destino da célula infectada, a fixação de mutações promotoras de crescimento favoreceria a leucemogênese (Boxus & Willems, 2012).

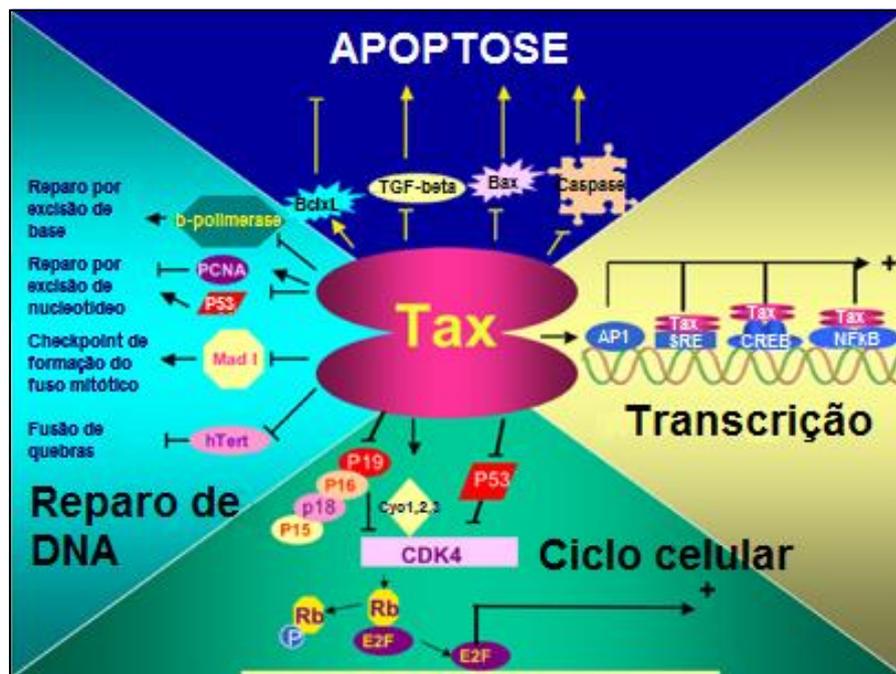


Figura 8. Processos celulares alterados pela proteína tax de HTLV-1. A proteína Tax é capaz de induzir a ativação dos fatores de transcrição AP-1 (Proteína ativadora 1), SRF, CREB/ATF, e NF- κ B, de aumentar a expressão de fatores anti-apoptóticos (Bcl_L e inibidores de caspase) e regular negativamente a expressão de proteínas proapoptóticas (Bax). Além disso, Tax reprime a atividade de p53, da DNA polimerase β na excisão de bases, da transcriptase reversa da telomerase humana (hTert), da proteína Antígeno Nuclear da Proliferação Celular (PCNA) e da proteína de *checkpoint* mitótico MAD-1, e interfere com a função de diferentes reguladores de ciclo celular, incluindo ciclinas e inibidores de kinases dependentes de ciclina (CDK) (Retirado e adaptado de Kfoury *et al.*, 2005).

Outro evento chave para o estabelecimento de persistência viral é a ativação do NF- κ B, que desempenha um papel central no controle da expressão de várias citocinas e seus receptores, na modulação de uma grande variedade de genes envolvidos na sobrevivência de linfócitos, no desenvolvimento de tecidos linfóides e nos mecanismos de apoptose, proliferação e inflamação (Grassmann *et al.*, 2005; Boxus *et al.*, 2008; Higuchi & Fujii, 2009). A atividade de NF- κ B é estritamente controlada em células T normais, sendo mantido no citoplasma numa forma inativa por associação ao seu inibidor (I κ B). Sob determinadas circunstâncias, NF- κ B é transitoriamente ativado pela fosforilação do seu inibidor pela I κ B kinase (IKK), num processo desencadeado em resposta a sinalização por citocinas inflamatórias e receptores Toll-*like*, estimulação antigênica, e por diferentes membros da família de proteínas do TNF, tais como CD40L e linfotoxina β (Li & Verma, 2002; Vallabhapurapu & Karin, 2009). Contudo, nas células T infectadas pelo HTLV-1, a proteína Tax interage de forma direta com a subunidade γ de IKK, estimulando a sua função (Sun & Yamaoka, 2005) e rendendo a ativação constitutiva de NF- κ B (Figura 9) (Ballard *et al.*, 1988; Sun & Yamaoka, 2005; Higuchi & Fujii, 2009). Este fato é corroborado pela expressão aumentada de diversas citocinas e seus respectivos receptores nas células infectadas, como por exemplo, da IL-2 e de CD25, que estimulam a proliferação de linfócitos T, e são controlados pela via de sinalização de NF- κ B (Ballard *et al.*, 1988; Boxus *et al.*, 2008).

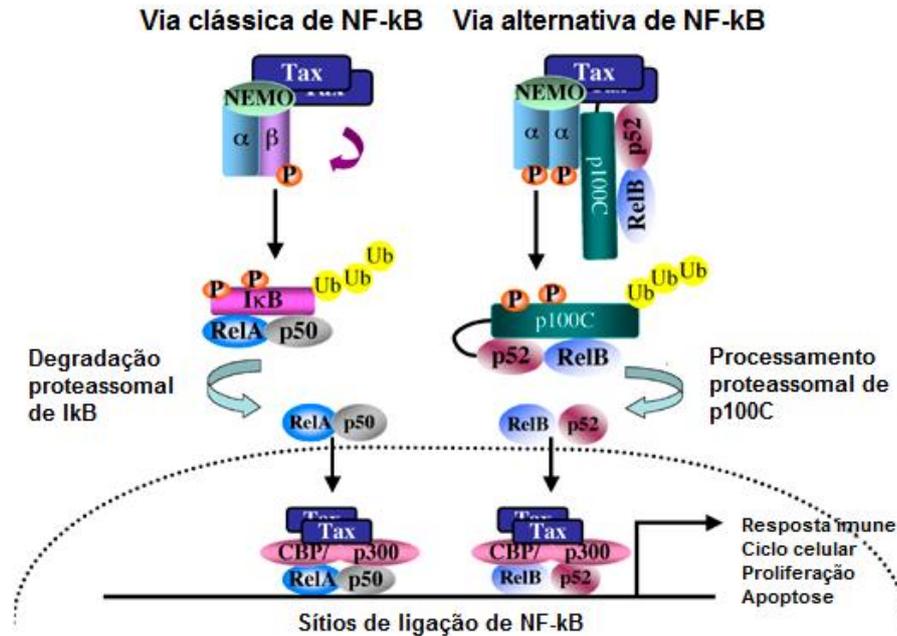


Figura 9. Interações de Tax com as vias de ativação de NF-κB. A proteína Tax interfere com a sinalização por NF-κB tanto no núcleo quanto no citoplasma. No citoplasma, dímeros de Tax interagem com a subunidade NEMO não-catalítica da IKK (IκB kinase), e facilitam o recrutamento de Tax para as suas subunidades catalíticas α ou β, induzindo a subsequente fosforilação, ubiquitinação e degradação proteossomal de IκB (Inibidor de κB), ou o processamento da região inibidora C-terminal de p100 (p100C) nas vias clássica e alternativa, respectivamente. Durante a transcrição, Tax interage com NF-κB e recruta o co-ativador transcricional CBP/p300, induzindo a expressão de genes de citocinas controlados por NF-κB, reguladores de ciclo celular, e genes relacionados à apoptose, dentre outros (Retirado e adaptado de Hiscott *et al.*, 2006).

Além do estímulo à proliferação, tem sido descrito que a expressão de Tax interfere com os mecanismos de sinalização da apoptose (Saggiaro, 2011). O processo de apoptose pode ser desencadeado por duas vias: uma extrínseca, geralmente mediada por receptores de membrana, e uma intrínseca, que é ativada por desequilíbrios bioquímicos nas mitocôndrias. Ambas as vias induzem a ativação de um grupo de proteases denominadas caspases, que desencadeiam uma cascata de eventos que resultam no desmantelamento da arquitetura celular. No entanto, este processo prepara a célula para remoção por fagócitos, evitando a liberação do seu conteúdo citoplasmático e conseqüente dano tecidual (Taylor *et al.*, 2008). Tem sido associado à proteína Tax o papel de induzir ou inibir a morte celular por apoptose mediante diferentes estímulos associados à ativação das vias intrínseca e extrínseca, conforme revisado por Saggiaro (2011). Contudo, o transcriptoma de

células expressando Tax demonstrou uma regulação positiva de fatores anti-apoptóticos e a supressão de mecanismos pró-apoptóticos (de la Fuente *et al.*, 2003). Além disso, foi observado que a expressão constitutiva ou transitória de Tax eleva os níveis da forma ativa da proteína Ras (Vajente *et al.*, 2009). Estas proteínas são pequenas GTPases que atuam como interruptores moleculares, alternando entre os estados inativo (ligado a guanosina difosfato) ou ativo (ligado a guanosina trifosfato). Vias de sinalização controladas por Ras possuem um importante papel na proliferação e sobrevivência da célula, e se mostraram essenciais à atividade anti-apoptótica desempenhada por Tax (Stoppa *et al.*, 2012). Por isso, tem sido amplamente reconhecido que a inibição da apoptose por Tax supera possíveis potenciais apoptóticos (Saggiaro, 2011).

1.4.7. Controle temporal da replicação de HTLV-1 pela proteína Rex:

Com relação à expressão do genoma de HTLV-1, tem sido demonstrado que este processo pode ser dividido em duas fases: na primeira predomina a síntese de proteínas acessórias e reguladoras, enquanto a produção de componentes estruturais ocorre em uma segunda etapa (Li *et al.*, 2012). Os primeiros mRNAs virais a serem traduzidos codificam para proteínas reguladoras Tax e Rex (Rende *et al.*, 2011), que são sintetizadas a partir do mesmo transcrito após maturação pelo processo de *splicing* para a retirada de dois íntrons (Figura 6) (Kannian & Green, 2010). Por outro lado, as proteínas estruturais de HTLV-1 são expressas a partir de mRNAs imaturos, não submetidos ao processo de *splicing*, exceto *env*, cujo mRNA é submetido a remoção de um único íntron (Figura 6) (Kannian & Green, 2010). Fisiologicamente, mRNAs imaturos são retidos no núcleo da célula até que o seu *splicing* seja concluído (Flint, 2000). Contudo, a proteína viral Rex interfere com este processo, promovendo uma redistribuição celular de mRNAs, mediando a exportação nuclear de transcritos virais imaturos, como por exemplo os que codificam para as proteínas Gag, Pro e Pol (Li *et al.*, 2009; Rende *et al.*, 2011). Por isso, durante as fases iniciais de expressão do provírus, se observa uma predominância na exportação de mRNAs virais maduros, o que está diretamente ligado a expressão de proteínas acessórias e reguladoras, cuja expressão não depende da função de Rex (Li *et al.*, 2012). Proporcionalmente ao acúmulo da

proteína Rex, se observa um aumento progressivo da exportação nuclear de mRNAs virais imaturos, levando a produção de componentes estruturais e enzimáticos necessários à formação de partículas virais (Younis & Green, 2005). Por isso, Rex é considerada um regulador positivo, que controla a mudança entre os estágios de latência e de replicação viral (Li *et al.*, 2012).

1.4.8. Funções das proteínas acessórias de HTLV-1:

Contudo, a expressão de produtos virais estimulada pela proteína Tax expõe a célula infectada às respostas do sistema imune, principalmente aos mecanismos citotóxicos mediados por células T CD8⁺ (Asquith *et al.*, 2005; Asquith *et al.*, 2007). Para evitar o reconhecimento antigênico por CTLs, a replicação de HTLV-1 apresenta alguns mecanismos de regulação negativa, que são mediados pelas proteínas acessórias p12, p13 e p30 e pela proteína reguladora HBZ. Embora estas proteínas sejam dispensáveis à replicação viral *in vitro*, elas desempenham papel no estabelecimento e manutenção da infecção *in vivo* (Edwards *et al.*, 2011).

Tem sido demonstrado que a p12 de HTLV-1 interfere com o processo de apresentação de antígenos pela célula infectada através da ligação à cadeia α das moléculas do complexo de histocompatibilidade do tipo I (MHC-I), prevenindo a sua associação à β 2-microglobulina. Dessa forma, a constituição de complexos funcionais de MHC-I é reduzida, assim como a chance de reconhecimento da célula infectada e sua eliminação por CTLs (Edwards *et al.*, 2011). Além disso, p12 também é capaz de estimular a proliferação celular, num processo que envolve a ativação de NFAT em decorrência da liberação de cálcio do retículo endoplasmático para o citoplasma (Edwards *et al.*, 2011).

Por sua vez, a proteína p13, na sua forma ubiquitinada, é capaz de interagir com Tax, inibindo a sua associação com o co-ativador transcrricional CBP/p300, reduzindo assim o seu potencial transativador (Andresen *et al.*, 2011). Enquanto isso, a proteína p30 realiza um processo de regulação pós-transcrricional, inibindo o *splicing* dos mRNAs de *tax* através da ligação ao sítio de junção de exons, provocando a retenção destes mRNAs no núcleo e, conseqüentemente, reduzindo

os níveis de síntese de Tax (Nicot *et al.*, 2004). Dessa forma, as funções de p13 e p30 contrabalançam as atividades de Tax, induzindo a replicação viral para um estado de latência (Edwards *et al.*, 2011).

1.4.9. Regulação da replicação viral pela proteína HBZ de HTLV-1:

Tem sido descrito que a proteína HBZ também regula negativamente a expressão de Tax. A proteína HBZ é um fator nuclear que contém três domínios: um domínio de ativação transcricional na sua região N-terminal, um domínio central, e um domínio bZIP na sua porção C-terminal (Gaudray *et al.*, 2002; Hivin *et al.*, 2005; Hivin *et al.*, 2006). A sua expressão se dá a partir de mRNAs codificados por uma ORF presente na fita complementar do provírus de HTLV-1, que está sob controle de seqüências promotoras da 3'-LTR (Figura 6) (Cavanagh *et al.*, 2006; Yoshida *et al.*, 2008). A existência de transcrição da fita anti-senso do genoma de HTLV-1 foi inicialmente demonstrada por Larocca *et al.* (1989), enquanto as evidências de uma proteína foram obtidas apenas 13 anos depois (Gaudray *et al.*, 2002). Desde então, múltiplos sítios de iniciação da transcrição foram identificados nas regiões U3 e R da 3'-LTR (Satou *et al.*, 2006; Cavanagh *et al.*, 2006; Yoshida *et al.*, 2008), e determinam a expressão de três isoformas de mRNAs de *HBZ*: duas resultantes de *splicing* (*HBZ SP1* e *SP2*) e uma que não sofre *splicing* (*HBZ US*) (Cavanagh *et al.*, 2006; Murata *et al.*, 2006; Satou *et al.*, 2006; Yoshida *et al.*, 2008; Barbeau & Mesnard, 2011). Usui *et al.* (2008) observaram que mRNAs de *HBZ* resultantes de *splicing* são mais abundantes, numa proporção quatro vezes maior do que a forma sem *splicing*, e dão origem a uma proteína com maior tempo de meia-vida (Yoshida *et al.*, 2008).

Assim como Tax, HBZ também interage com diferentes fatores de transcrição através do seu domínio bZIP, podendo ser destacados: CREB (Lemasson *et al.*, 2007), CREB-2 (Gaudray *et al.*, 2002), e as subunidades c-Jun e JunB do fator de transcrição AP-1 (Basbou *et al.*, 2003; Matsumoto *et al.*, 2005). Dessa forma, HBZ compete com Tax pela associação a estes fatores e, com isso, bloqueia a sua ligação aos promotores da 5'-LTR de HTLV-1, reduzindo os níveis de expressão viral mediada por Tax (Gaudray *et al.*, 2002; Arnold *et al.*, 2006). Complementando este

mecanismo, HBZ também interage com o co-ativador celular p300 através do seu domínio N-terminal, efetuando o seu desligamento de promotores virais (Figura 10) (Clerc *et al.*, 2008).

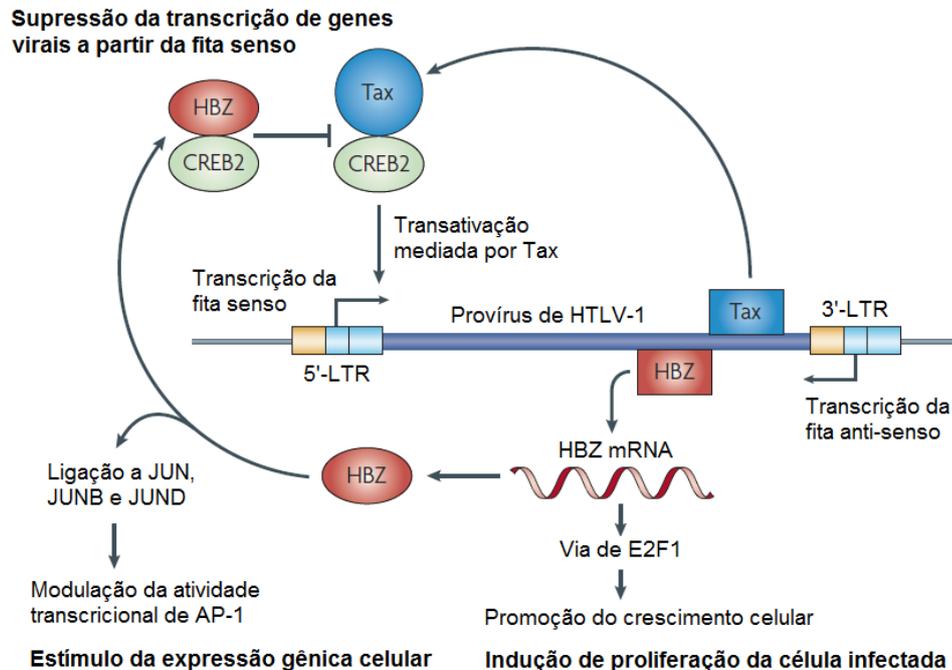


Figura 10. Funções da proteína HBZ de HTLV-1 em células infectadas. O efeito de HBZ sobre CREB-2 e AP-1 está apresentado, assim como o efeito do mRNA de HBZ sobre o fator de transcrição E2F1 e genes induzidos. Evidências indicam que HBZ antagoniza o efeito transcripcional de Tax sobre a 5'-LTR do provírus de HTLV-1 (Retirado e adaptado de Matsuoka & Jeang, 2007).

As proteínas Tax e HBZ apresentam efeitos opostos na regulação de vias de sinalização celulares. Além da transcrição mediada por CREB e AP-1, HBZ também suprime a via clássica de ativação de NF- κ B através da interação com a sua subunidade p65, sem interferir com os mecanismos de ativação pela via alternativa (Zhao *et al.*, 2009; Barbeau & Mesnard, 2011). A via clássica de ativação de NF- κ B está relacionada principalmente com eventos da imunidade inata e da inflamação e, por isso, a sua inibição pela proteína HBZ facilitaria a fuga de células infectadas da resposta imune (Zhao & Matsuoka, 2012).

Esta dualidade entre as atividades de Tax e HBZ é corroborada pela cinética de expressão destas proteínas. Análises *in vitro* revelaram que células T CD4⁺ isoladas de pacientes com PET/MAH expressam, espontaneamente, mRNAs codificados pela fita senso a partir da 5'-LTR do provírus. Inicialmente, são detectados os mRNAs de *tax* e, posteriormente, de *gag*, sendo o pico de expressão observado após 24h de incubação. Por outro lado, a transcrição de mRNAs de *HBZ* a partir da fita anti-senso, sob controle da 3'-LTR, se eleva após 24h de cultivo das células infectadas, atingido o platô com 48h de incubação. Dessa forma, a taxa de transcrição da fita anti-senso é proporcionalmente inversa a expressão dos genes controlados pelo promotor da 5'-LTR (Barbeau & Mesnard, 2011). Esta mesma cinética foi observada *in vivo* por Li *et al.* (2009) que, usando coelhos infectados por HTLV-1 como modelo experimental, demonstraram que a expressão inicial de mRNAs de *tax* é progressivamente substituída pela expressão de *HBZ*.

Conforme demonstrado em linhagens celulares infectadas, ambas as LTRs de HTLV-1 são funcionalmente equivalentes, apresentando uma distribuição equilibrada de fatores de transcrição (CREB, ATF-1, c-Fos, c-Jun) e co-fatores (p300/CBP, RNA polimerase II) (Lemasson *et al.*, 2004), incluindo a proteína Tax, que ativam a transcrição senso/anti-senso (Landry *et al.*, 2009). Dessa forma, Tax e CREB são capazes de ativar a transcrição do gene *HBZ* através da 3'-LTR, embora a influência da proteína Tax neste processo não seja tão significativa como na expressão dos genes sob controle da 5'-LTR (Landry *et al.*, 2009; Zhao & Matsuoka, 2012). Complementando este fato, Barbeau & Mesnard (2011) observaram que a síntese de transcritos anti-senso a partir da 3'-LTR é estimulada na ausência da 5'-LTR e, por isso, sugerem que ambas as LTRs competem por um número limitado de fatores envolvidos na formação de complexos de iniciação da transcrição das fitas senso e anti-senso. Dessa forma, é provável que a transcrição da fita senso, especialmente estimulada pela proteína Tax, contribua para manter a transcrição da fita complementar em baixos níveis, aproximadamente 20 a 50 vezes menor (Barbeau & Mesnard, 2011). Por outro lado, quando a expressão de Tax é reduzida por diferentes mecanismos, incluindo a regulação negativa por proteínas virais, tais como Rex e p30, ou por hipermetilação da 5'-LTR, a transcrição anti-senso é favorecida (Usui *et al.*, 2008).

Evidências têm demonstrado que as proteínas Tax e HBZ são fatores importantes no desenvolvimento da LLTA e da PET/MAH (Grassmann *et al.*, 2005; Higuchi *et al.*, 2009; MacNamara *et al.*, 2010; Zhao & Matsuoka, 2012). A expressão isolada de Tax é capaz de estimular a proliferação celular, e inibir os mecanismos de apoptose e de *checkpoint* do ciclo celular, provocando assim o acúmulo de lesões no DNA e induzindo a transformação e imortalização *in vitro* e *in vivo* de células T primárias tanto de humanos quanto de roedores (Boxus *et al.*, 2008; Kannian & Green, 2010). Contudo, apesar da proteína Tax exercer uma gama diversificada de funções, células T transformadas deixam de expressá-la em 60% dos casos de LLTA (Zhao & Matsuoka, 2012). Por outro lado, a expressão de HBZ, embora não seja suficiente para promover a imortalização de linfócitos T *in vitro*, é capaz de induzir a proliferação de células T, e de aumentar a infecciosidade e a persistência de HTLV-1 *in vivo* (Arnold *et al.*, 2006), podendo ser detectada na maioria dos casos de LLTA (Satou *et al.*, 2006), e correlacionada com a severidade da PET/MAH (Saito *et al.*, 2009). Por isso, é provável que HBZ desempenhe um importante papel na LLTA, proporcionando a manutenção de células transformadas (Satou *et al.*, 2006), e no desenvolvimento da PET/MAH (MacNamara *et al.*, 2010).

Recentemente, o estabelecimento de linhagens de camundongos transgênicos para HBZ, com expressão gênica restrita à população de células T CD4⁺, possibilitou a reprodução de algumas alterações imunológicas e manifestações clínicas apresentadas por indivíduos infectados pelo HTLV-1. Estes animais desenvolveram linfomas de células T, dermatites e alveolites com exuberante infiltrado de células T CD4⁺, além de um aumento da frequência de células T, principalmente de células T reguladoras (Tregs) CD4⁺ expressando o fator de transcrição FoxP3 (do inglês *Forkhead box P3*) e de células T CD4⁺ efetoras e de memória, assim como tem sido descrito em indivíduos infectados, principalmente naqueles com altas cargas provirais (Asquith *et al.*, 2007; Toulza *et al.*, 2008; Toulza *et al.*, 2010; Bittencourt & Oliveira, 2010; Satou *et al.*, 2011). Nestes camundongos transgênicos, o aumento da população de Tregs mostrou-se relacionado à sinalização pelo TGF- β (Satou *et al.*, 2011; Zhao & Matsuoka, 2012).

As Tregs constituem uma subpopulação de células T CD4⁺ responsável por efetuar mecanismos de supressão da resposta imune na periferia, e tem seu

desenvolvimento, diferenciação e homeostase induzido por TGF- β (Hori *et al.*, 2003). A sinalização proporcionada por TGF- β é mediada por um grupo de proteínas denominadas Smad, que transduzem o sinal proporcionado pela ligação desta citocina aos seus receptores de membrana em estímulo para a transcrição de genes-alvo no núcleo (Zhao *et al.*, 2011), sendo este processo crítico no desenvolvimento de Tregs (Zhao & Matsuoka, 2012). Embora tenha sido observado que a proteína Tax suprime a expressão de FoxP3 nas células T (Yamano *et al.*, 2005), foi demonstrado que HBZ estimula a expressão deste fator de transcrição através da via de sinalização de TGF- β , favorecendo a interação de Smad3 e p300 (Satou *et al.*, 2011). Este processo resulta num aumento da expressão de Foxp3 e, conseqüentemente, na formação de células T *naïve* CD4⁺FoxP3⁺ (Satou *et al.*, 2011), o que explicaria a frequência aumentada de Tregs durante a infecção por HTLV-1 (Zhao & Matsuoka, 2012). Contudo, Tregs de camundongos transgênicos para HBZ apresentam função supressora prejudicada. Provavelmente, este fenômeno decorre da inibição de FoxP3 e NFAT por ligação à HBZ, conforme demonstrado por ensaios de imunoprecipitação (Satou *et al.*, 2011). No caso de FoxP3, essa interação ocorre com o seu domínio *forkhead* (Satou *et al.*, 2011), que é responsável pela sua ligação ao DNA (Sakaguchi *et al.*, 2008), sugerindo que HBZ interfira com a sua função transcricional, que é central na função e homeostase das Tregs (Hori *et al.*, 2003; Fontenot *et al.*, 2003). Estes dados corroboram resultados observados em humanos por Asquith *et al.* (2007), que demonstraram que Tregs infectadas exibem perda da função supressora, não sendo capazes de impedir a proliferação de células T CD4⁺ efetoras, ou a lise de células infectadas por CTLs. Além disso, no modelo experimental murino foi observado que Tregs expressando HBZ apresentaram redução na expressão do antígeno 4 de linfócito T citotóxico (CTLA-4), do receptor de TNF induzido por glicocorticoide (GITR) e de CD25 (Satou *et al.*, 2011), que são moléculas de superfície relacionadas à homeostase e função supressora destas células (Vignali *et al.*, 2008), o que explicaria o desequilíbrio funcional observado.

1.5. Células T reguladoras:

1.5.1. Caracterização fenotípica das Tregs:

As Tregs representam um dos principais componentes da regulação do sistema imune, e constituem subpopulações de células T especializadas em suprimir respostas de células T efetoras e APCs. As Tregs exercem um papel central na manutenção da tolerância nos tecidos periféricos, inibindo respostas autoimunes promovidas por células T autoreativas, e durante a inflamação, limitando o nível de ativação de células T efetoras (Workman *et al.*, 2009).

A primeira descrição desta subpopulação de células T com atividade imunossupressora ocorreu no início dos anos 1970 (Gershon *et al.*, 1972). Contudo, apesar dos esforços, a pesquisa acerca destas células foi abandonada até o final dos anos 1980 em decorrência das dificuldades na sua correta identificação e isolamento (Cools *et al.*, 2007). Em 1995, Sakaguchi *et al.* demonstraram que a expressão de CD25 poderia ser utilizada como marcador fenotípico das Tregs. Em humanos, tem sido observado que as Tregs se concentram principalmente nas populações de células T CD4⁺CD25^{high} (Liu *et al.*, 2006). Posteriormente, a sua importância foi demonstrada em camundongos deficientes para Tregs, que desenvolviam um amplo espectro de doenças autoimunes, e comprovada *in vitro* pela inibição da ativação, proliferação e produção de IL-2 por células T CD4⁺ efetoras (Thornton & Shevach, 1998). O mesmo pode ser observado em humanos, em que a manifestação de doenças autoimunes, tais como esclerose múltipla, diabetes do tipo 1, psoríase, artrite reumatoide e miastenia gravis, geralmente é acompanhada de disfunções na população de Tregs (Baecher-Allan *et al.*, 2011). Contudo, a caracterização molecular destas células ainda permanece ambígua. Diferentes subpopulações de células T são capazes de desempenhar funções supressoras (Shevach, 2006; Cools *et al.*, 2007), conforme apresentado na tabela 1, e a maioria das moléculas propostas como marcadores não é expressa exclusivamente por Tregs, uma vez que também são expressas em diferentes níveis de intensidade por linfócitos T CD4⁺ ativados, como por exemplo: CD25, CTLA-4, GITR, OX40, CD28, CD80/86, L-selectina, dentre outras (Cools *et al.*, 2007; Aerts *et al.*, 2008; Toulza *et al.*, 2008; Workman *et al.*, 2009; Baecher-Allan *et al.*, 2011).

Tabela 1. Subtipos de células T reguladoras.

Tipo celular	Fenótipo	Mecanismo sugerido de imunossupressão
Tregs CD4 ⁺ naturais (derivadas do timo)	CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺	Dependente de contato celular <i>in vitro</i> (CTLA-4); dependente de contato celular e da secreção de citocinas <i>in vivo</i> (IL-10 e TGF-β)
iTregs CD4 ⁺ (induzidas na periferia)		
Tr1	CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁽⁻⁾ IL-10 ^{high}	Contato celular e secreção de IL-10
Th3	CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ TGF-β ^{high}	Secreção de TGF-β
TGF-β ⁺ /IL-10 ⁺	CD4 ⁺ CD25 ⁽⁻⁾ FoxP3 ⁽⁻⁾ TGF-β ⁺ /IL-10 ⁺	Secreção de IL-10 e TGF-β
iTr35	CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺	Secreção de IL-35

NOTA. Tregs, células T reguladoras; iTregs, Tregs induzidas; Tr1, Tregs do tipo 1; Th3, células T auxiliares do tipo 3; iTr35, Tregs produtoras de IL-35 (Retirado e adaptado de Cools *et al.*, 2007).

Recentemente tem sido demonstrado que a ausência ou baixa expressão da cadeia α do receptor de IL-7 (CD127) pode ser usada como marcador de Tregs CD4⁺CD25⁺, e que a sua expressão correlaciona inversamente com a função supressora destas células (Liu *et al.*, 2006; Seddiki *et al.*, 2006a; Hartigan-O'Connor *et al.*, 2007), enquanto é altamente expressa em células T efetoras e de memória (Aerts *et al.*, 2008). *In vitro*, células T CD4⁺CD25⁺CD127^{-/low} se mostraram hipoproliferativas e capazes de suprimir respostas à aloantígenos (Liu *et al.*, 2006), independente do nível de expressão de CD25 (Hartigan-O'Connor *et al.*, 2007). Contudo, Klein *et al.* (2010) demonstraram que uma expressiva parcela de células T CD4⁺CD127^{-/low} não expressa FoxP3, sugerindo que o nível de expressão de CD127 não é um parâmetro totalmente confiável para a identificação das Tregs em humanos. Além disso, tem sido evidenciado que uma parcela de células T CD4⁺FoxP3⁺ expressa altos níveis de CD127 (Klein *et al.*, 2010). Contudo, Di Caro *et al.* (2011) demonstraram que a sinalização por IL-7 promove a maturação das Tregs CD127⁺FoxP3⁺ em Tregs CD25^{high}CD127⁽⁻⁾FoxP3⁺. Dessa forma, o fator de transcrição FoxP3 tem sido considerado o melhor marcador para a identificação de Tregs na população de células T CD4⁺, tanto em humanos quanto em

camundongos, pois sua expressão se mostra restrita às células com função supressora (Workman *et al.*, 2009; Baecher-Allan *et al.*, 2011).

O fator de transcrição FoxP3 desempenha um papel crucial no desenvolvimento e função das Tregs, pois bloqueia a função de fatores de transcrição da família Rel, tais como NFAT e NF- κ B, e conseqüentemente a expressão de seus genes-alvo. Dessa forma, FoxP3 atua como um repressor da transcrição de IL-2 e de outras citocinas, tais como IL-4 e IFN- γ , programando a célula para não exercer funções estimuladoras da resposta imune (Cools *et al.*, 2007). Por isso, embora as Tregs expressem CD25, estas células são totalmente dependentes da produção exógena de IL-2 (Workman *et al.*, 2009), cuja sinalização regula a expressão de FoxP3 e promove a manutenção destas células nos tecidos periféricos (Bayer *et al.*, 2008).

Além disso, tem sido demonstrado que, assim como a IL-2, a sinalização por IL-7 através do seu receptor cognato, CD127, também regula a sobrevivência, captação de glicose, proliferação e diferenciação de Tregs na periferia (Fry & Mackall, 2005; Palmer *et al.*, 2008). A IL-7 é produzida constitutivamente por células estromais não hematopoiéticas em diferentes órgãos, incluindo timo, medula óssea, pele, intestino e fígado, dentre outros (Krawczenko *et al.*, 2005), e tem como alvo a maioria das células T e B (Fry & Mackall, 2005). Nas Tregs, a sinalização por IL-7 é capaz de promover a elevação dos níveis de FoxP3 acumulado no núcleo e de estimular a expressão de CD25, enquanto regula negativamente a expressão de CD127, conforme demonstrado *in vitro* por Di Caro *et al.* (2011).

1.5.2. Origem e diferenciação das Tregs:

As Tregs podem ser divididas em duas populações distintas de acordo com a sua origem: aquelas que são naturalmente geradas no timo (nTregs) e aquelas do tipo induzida (iTregs), que se diferenciam a partir de células T precursoras CD4⁺FoxP3⁽⁻⁾ presentes nos tecidos periféricos (Figura 11) (Workman *et al.*, 2009). Em humanos, as nTregs FoxP3⁺ constituem cerca de 5 a 10% das células T CD4⁺ no sangue periférico (Sakaguchi, 2005; Cools *et al.*, 2007), e seu número e função

se mantém mesmo após os 70 anos de idade (Vukmanovic-Stejic *et al.*, 2006). O desenvolvimento das nTregs no timo segue eventos semelhantes aos da seleção de células T convencionais, dependendo da: (i) transdução de sinais gerados pela ligação do TCR aos complexos MHC-autopeptídeos apresentados por APCs tímicas, embora o nível ideal de afinidade/avidez desta ligação para a seleção ainda seja controverso; (ii) da presença de moléculas co-estimulatórias, tais como CD28, CD80/86 e CD40; e (iii) da presença de IL-2 e TGF- β (Workman *et al.*, 2009).

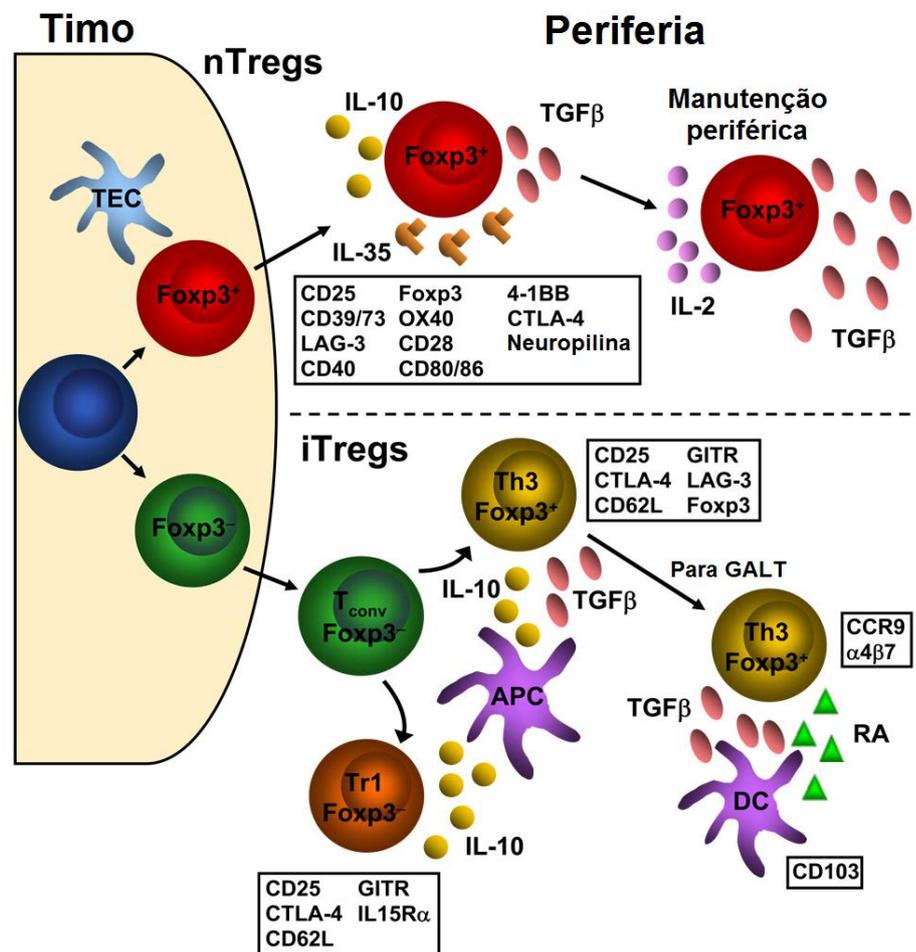


Figura 11. Desenvolvimento e diferenciação das células T reguladoras naturais (nTregs) e induzidas (iTregs) e seus marcadores. As nTregs se diferenciam a partir de células T convencionais (T_{conv}) *naïve* em Tregs Foxp3⁺ no timo. Na periferia, Tregs naturais expressam diversas proteínas de superfície que servem como marcadores celulares, indicados na caixa de texto. Contudo, nenhum destes marcadores é exclusivo de Tregs, e também são expressos por células T_{conv} ativadas. nTregs exercem sua função supressora sobre células T através da secreção das citocinas IL-10, IL-35 e TGF- β . Tem sido demonstrado que TGF- β e IL-2 exercem um importante papel na manutenção das Tregs. Por sua vez, células T_{conv} *naïve* podem ser induzidas a se diferenciar em

diferentes subpopulações de iTregs: células Tr1 Foxp3⁽⁻⁾ ou células Th3 Foxp3⁺ na presença de IL-10 e/ou TGF- β secretado por APCs, tais como células dendríticas (DC) e macrófagos, que compartilham marcadores de superfície similares aos das nTregs. iTregs Foxp3⁺ podem se acumular em tecidos linfoides associados à mucosa gastrointestinal (GALT) em decorrência da expressão de CCR9 e da integrina $\alpha 4\beta 7$ em resposta ao TGF- β e o ácido retinóico (RA) produzidos por DCs. TEC, célula epitelial tímica (Retirado e adaptado de Workman *et al.*, 2009).

Apesar do timo envolver e ter sua função reduzida após a puberdade (Tosi, 1982; Hirokawa *et al.*, 1994), a sua participação na geração de Tregs durante a idade adulta ainda se faz presente, mesmo em indivíduos com mais de 80 anos de idade, embora com menor relevância, podendo ser demonstrada pela detecção de nTregs *naïve* (CD45RA⁺) expressando a molécula de adesão da célula endotelial e plaqueta 1 (PECAM-1), um marcador de emigração tímica recente (Miyara *et al.*, 2009; Booth *et al.*, 2010). Contudo, aproximadamente 80% das nTregs em indivíduos adultos expressam CD45RO⁺ (Booth *et al.*, 2010), um marcador de células T de memória (Roth, 1994). Por isso, Vukmanovic-Stejic *et al.* (2006) sugerem que, em adultos, as Tregs derivam predominantemente não de linhagens tímicas, e sim de populações periféricas de células T de memória CD4⁺CD45RO⁺CD25⁽⁻⁾FOXP3⁽⁻⁾.

Com relação às iTregs, tem sido demonstrado que estas se diferenciam a partir de células T imaturas após estimulação por DCs, num processo que depende do subtipo e do estado de ativação dessas células, na presença de citocinas imunossupressoras (Enk, 2005; Cools *et al.*, 2007). Duas principais subpopulações de iTregs têm sido descritas com base nas citocinas que participam do seu processo de formação: as células T CD4⁺ reguladoras do tipo 1 (Tr1), que são geradas na presença de IL-10, e as células T auxiliares do tipo 3 (Th3), que são induzidas por TGF- β (Figura 11) (Workman *et al.*, 2009). Conforme descrito por Horwitz e colaboradores (Yamagiwa *et al.*, 2001), no processo de formação das células Th3, linfócitos T CD4⁺CD25⁽⁻⁾ *naïve* passam a expressar FoxP3 (Shevach 2006), cuja função estabiliza a sinalização positiva proporcionada por TGF- β e induz a geração de um forte potencial imunossupressor dependente de contato (Fantini *et al.*, 2004). Contudo, diferente das nTregs e de células Th3, células Tr1 não expressam FoxP3 *in vitro* ou *in vivo* (Vieira *et al.*, 2004).

A atividade das iTregs é exercida pela secreção das mesmas citocinas responsáveis pela indução da sua diferenciação (Workman *et al.*, 2009). Dessa forma, células Tr1 expressam altos níveis de IL-10 e níveis moderados de IL-5, IFN- γ , e TGF- β (Roncarolo *et al.*, 2001; Roncarolo *et al.*, 2006), enquanto células Th3 expressam altos níveis de TGF- β (Tabela 1) (Faria & Weiner, 2006). Contudo, ambos os tipos de iTregs, assim como nTregs, são capazes de suprimir respostas mediadas por células T auxiliares do tipo 1 (Th1) e tipo 2 (Th2) (Cools *et al.*, 2007).

1.5.3. Mecanismos propostos de imunossupressão mediados pelas Tregs:

A atividade imunossupressora das Tregs não se resume a um mecanismo único. Ao invés disso, estas células apresentam um arsenal de funções para controlar processos de autoimunidade e respostas adaptativas exacerbadas. Os mecanismos descritos até então podem ser divididos em quatro modos básicos de ação: citólise, disfunção metabólica, modulação de APCs e secreção de citocinas imunossupressoras (Figura 12) (Tang & Bluestone, 2008; Workman *et al.*, 2009).

Tem sido descrito que, em humanos, iTregs expressam preferencialmente granzima B, enquanto nTregs CD4⁺CD25⁺ ativadas expressam granzima A. Ambos os subtipos de Tregs são capazes de realizar a citólise de células-alvo, tais como células T CD4⁺ e CD8⁺ ativadas, DCs imaturas e maduras, e monócitos CD14⁺, por mecanismos de citotoxicidade dependentes de perforina e de adesão celular mediada pela integrina β 2 (CD18), porém independente da participação de Fas/FasL (Figura 12) (Grossman *et al.*, 2004).

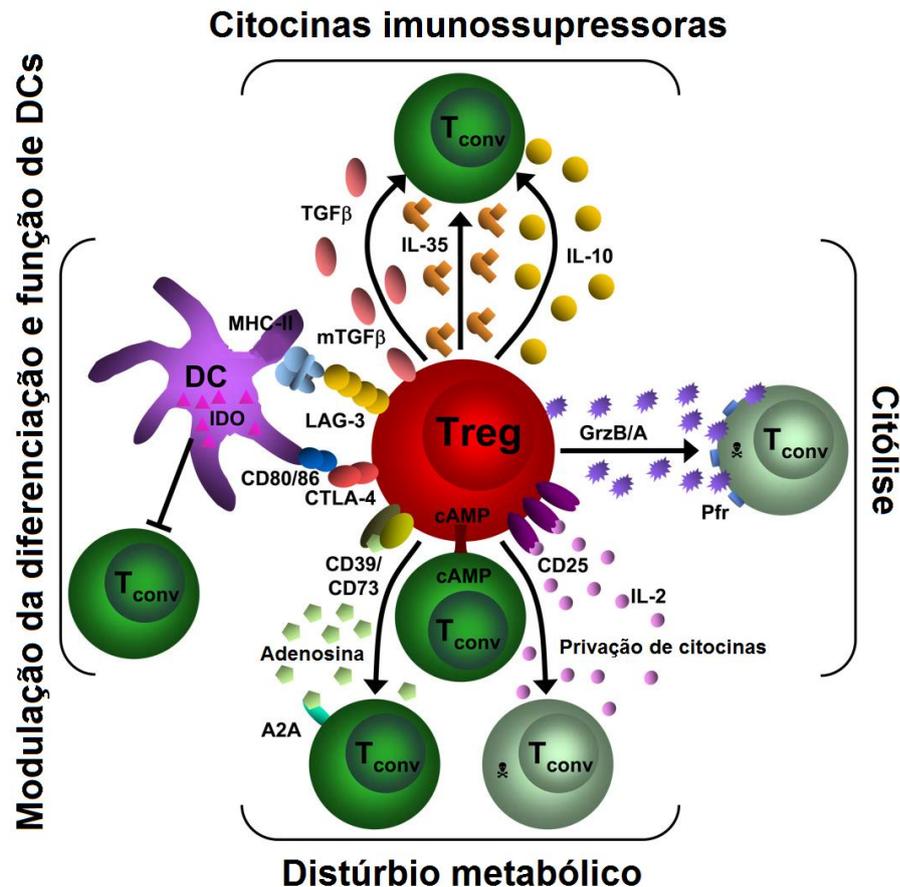


Figura 12. Mecanismos de supressão mediados por células T reguladoras. Um dos modos primários de supressão é a citólise de células T convencionais (T_{conv}) induzida por granzima A/B (GrzB/A) e perforina (Pfr). As Tregs também são capazes de induzir distúrbios metabólicos: (i) pela privação de IL-2, num mecanismo dependente da alta expressão de CD25 (Subunidade α do receptor de IL-2), resultando em apoptose da célula-alvo; (ii) pela sinalização por AMP cíclico (cAMP) ou; (iii) pela imunossupressão mediada pelo receptor de adenosina A2A em resposta a adenosina produzida por CD39/CD73. A diferenciação e função de células dendríticas (DC) também pode ser modulada pelas Tregs através das interações de CD80/86 e CTLA-4 ou da proteína do gene 3 de ativação de linfócitos (LAG-3) e MHC-II. Esta sinalização induz o aumento da enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) em DCs, que promove a degradação do triptofano e reduz a função ativadora de células T. Contudo, o principal mecanismo de inibição é mediado pela secreção de citocinas, tais como IL-10, IL-35 e TGF- β (Retirado e adaptado de Workman *et al.*, 2009).

Além dos mecanismos de citotoxicidade, tem sido demonstrado que as Tregs são capazes de induzir distúrbios metabólicos nas células-alvo (Tang & Bluestone, 2008), promovendo o aumento da concentração de cAMP por dois mecanismos: por transferência direta através de junções comunicantes ou, indiretamente, pela geração de adenosina através das ectonucleotidases CD39 e CD73, com a subsequente ativação do receptor de adenosina A2A nas células T convencionais e

a indução da produção intracelular de cAMP (Figura 12) (Deaglio *et al.*, 2007). A elevação dos níveis de cAMP tem sido associada a inibição da proliferação e diferenciação celular, e em linfócitos promove a inibição seletiva da expressão de citocinas, incluindo IL-2 e IFN- γ , pelo bloqueio da atividade de NF- κ B e pela ativação de repressores transcricionais (Sojka *et al.*, 2008). Além disso, a expressão constitutiva de altos níveis de CD25 pelas Tregs confere uma vantagem competitiva pelo consumo de IL-2 sobre células T *naïve*, que expressam CD25 somente após engajamento do TCR. Dessa forma, tem sido demonstrado *in vitro* que Tregs são capazes de desencadear o processo de apoptose em células T efetoras como consequência da privação de IL-2 (Figura 12) (Pandiyan *et al.*, 2007; Tang & Bluestone, 2008).

Outro mecanismo supressor desempenhado pelas Tregs é a modulação da função das DCs, primariamente mediada pela interação das moléculas CTLA-4 e gene 3 de ativação de linfócitos (LAG-3) da superfície de Tregs, respectivamente com CD80/CD86 e moléculas do complexo principal de histocompatibilidade do tipo II (MHC-II) expressas por APCs (Workman *et al.*, 2009). Estas interações resultam na expressão da enzima indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), que está envolvida na degradação do triptofano, promovendo um decréscimo na função ativadora de células T (Figura 12) (Sojka *et al.*, 2008; Workman *et al.*, 2009).

Embora o contato com células-alvo seja considerado importante para a supressão de células T efetoras e inibição da produção de IL-2 e IFN- γ , num processo mediado por engajamento de GITR e CTLA-4 na superfície das Tregs e ligação de CD80/CD86 nas células-alvo, a secreção de citocinas inibitórias, tais como IL-10, TGF- β e IL-35, tem sido considerada o principal mecanismo de ação das Tregs (Figura 12) (Cools *et al.*, 2007). Recentemente, Vignali e colaboradores (Chaturvedi *et al.*, 2011) demonstraram que, em humanos, a supressão de células T convencionais por Tregs, através de mecanismos independentes de contato, é mediada preferencialmente pela secreção IL-35, enquanto a participação de IL-10 e TGF- β se mostrou secundária. Como consequência, células T foram convertidas em iTregs produtoras de IL-35, denominadas iTr35 (Chaturvedi *et al.*, 2011).

1.5.4. Papel das Tregs nas infecções virais crônicas:

As consequências da supressão de respostas imunes pelas Tregs durante os processos infecciosos têm se mostrado controversas. Conforme revisado por Belkaid (2008), a remoção de células T CD4⁺CD25⁺ de populações de leucócitos de sangue periférico ou de órgãos linfoides de indivíduos infectados por HIV, vírus da hepatite C (HCV) ou B (HBV) resulta no aumento de respostas vírus-específicas *in vitro*. Corroborando estes dados, tem sido demonstrado que, em indivíduos infectados pelo HIV, a frequência de Tregs correlaciona inversamente com a magnitude da ação de CTLs HIV-específicas. Além disso, tem sido sugerido que a progressão da doença está associada a uma frequência reduzida de Tregs (Cools *et al.*, 2007). Ou seja, estes dados sugerem que Tregs suprimem mecanismos de imunidade vírus-específicos capazes de controlar a infecção, contribuindo para a replicação viral sem controle, e com isso desempenhariam um papel negativo para o hospedeiro. Por outro lado, tem sido demonstrado que indivíduos com hepatite C apresentam frequência elevada de Tregs CD4⁺CD25⁺, se comparados com indivíduos saudáveis, e que o dano hepático correlaciona inversamente com a produção de TGF- β por estas células durante respostas HCV-específicas. Além disso, tem sido observado que os indivíduos cronicamente infectados pelo HIV apresentam número reduzido de Tregs circulantes, que correlaciona com a hiperativação imune (Cools *et al.*, 2007; Belkaid, 2008; Workman *et al.*, 2009). Dessa forma, é provável que as Tregs desempenhem um importante papel no controle das respostas inflamatórias crônicas e do dano tecidual em infecções virais persistentes (Belkaid, 2008).

Ainda que as Tregs preservem a homeostase das respostas imunes na periferia, alguns estudos sugerem que os seus mecanismos de ação limitam uma gama de respostas efetoras responsáveis pela eliminação de patógenos. Assim, a sua função supressora poderia induzir falha no controle da infecção, aumentando a chance de estabelecimento de infecções persistentes. Contudo, a atuação das Tregs é capaz de limitar o dano tecidual colateral provocado por respostas exacerbadas no sítio de inflamação. Dessa forma, um equilíbrio entre estes processos provavelmente seria benéfico ao hospedeiro (Belkaid *et al.*, 2006; Workman *et al.*, 2009).

1.6. Papel das Tregs na infecção pelo HTLV-1:

A dinâmica da população de Tregs nas infecções pelo HTLV-1 tem se mostrado controversa. Inicialmente, Jacobson e colaboradores (Yamano *et al.*, 2005) observaram que pacientes com PET/MAH apresentam frequência reduzida de células FoxP3⁺ na população de células T CD4⁺CD25⁺ do sangue periférico, se comparados com ACs e indivíduos saudáveis. Também demonstraram que a infecção de Tregs por HTLV-1 afeta a expressão de FoxP3, sendo este efeito decorrente da expressão de Tax, conforme demonstrado por ensaios de transfecção utilizando células T CD4⁺CD25⁺ de indivíduos saudáveis. Este fenômeno se mostrou restrito a ação de Tax, pois células transfectadas com o gene *env* de HTLV-1 não apresentaram tal interferência (Yamano *et al.*, 2005). Adicionalmente, foi relatado que a frequência de células T CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ correlaciona negativamente com a CPV de HTLV-1, sugerindo que a interferência com Tregs contribuiria para o desenvolvimento de distúrbios inflamatórios nos indivíduos infectados (Oh *et al.*, 2006). Posteriormente, Michaëlsson *et al.* (2008) confirmaram estas observações, demonstrando que a frequência de células CD127^{-/low} na população de células T CD4⁺CD25^{high} se encontrava reduzida em pacientes com PET/MAH.

Por outro lado, Bangham e colaboradores (Toulza *et al.*, 2008) relataram que indivíduos infectados pelo HTLV-1 apresentam frequências elevadas de células T CD4⁺FoxP3⁺, se comparados a indivíduos saudáveis, e isto correlacionava negativamente com a taxa de lise *in vitro* de células autólogas infectadas pela ação de CTLs. Outros grupos de pesquisa obtiveram dados semelhantes. Best *et al.* (2009) descreveram que pacientes com PET/MAH apresentam frequência aumentada de Tregs CD4⁺FoxP3⁺ e frequências reduzidas de DCs plasmocitóides em comparação aos ACs, e que indivíduos com PET/MAH e ACs com CPV alta apresentam perfis equivalentes de respostas inflamatórias. Toulza *et al.* (2010) sugerem que este aumento da frequência de células T FoxP3⁺ é induzido pela quimiocina CCL22, que está envolvida com a migração e sobrevivência de Tregs, e foi detectada em altos níveis no plasma de indivíduos infectados, sendo produzida principalmente por células infectadas expressando Tax. Com relação ao estado funcional destas células, pacientes com PET/MAH apresentam níveis elevados de Tregs ativadas, que são definidas como células T CD4⁺CD45RA⁽⁻⁾FoxP3^{high}, que

expressam altos níveis de CTLA-4 e são imunossupressoras, enquanto ACs apresentaram frequências aumentadas de células não-Tregs secretoras de citocinas, caracterizadas como células T $CD4^+CD45RA^{(-)}FoxP3^{low}$ (Satou *et al.*, 2012), que não apresentam expressão estável de FoxP3, não exibem função supressora *in vitro*, secretam IL-2 e IFN- γ , e apresentam potencial de diferenciação em células Th17 (Miyara *et al.*, 2009).

Dessa forma, as hipóteses formuladas por diferentes grupos de pesquisa acerca do papel das Tregs na modulação da função de CTLs na infecção pelo HTLV-1, e na manutenção de um estado assintomático, têm se mostrado contraditórias. Enquanto alguns grupos indicam que a frequência de Tregs se encontra aumentada na infecção pelo HTLV-1, e sugerem que a supressão de CTLs HTLV-1-específicas permite a fuga de células infectadas da vigilância do sistema imune, resultando no aumento da CPV (Toulza *et al.*, 2008; Best *et al.*, 2009; Toulza *et al.*, 2010), que é considerada fator de risco para o desenvolvimento da PET/MAH (Nagai *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 2007), outros grupos afirmam que a frequência de Tregs estaria reduzida, permitindo a ocorrência de respostas exacerbadas de CTLs contra células infectadas, o que representa um dos fatores da lesão neurológica na PET/MAH (Yamano *et al.*, 2005; Oh *et al.*, 2006; Michaëlsson *et al.*, 2008).

Existem diferentes mecanismos postulados para explicar a desmielinização e morte de células do SNC na medula espinhal de pacientes com PET/MAH. Acredita-se que a lesão resulte não da morte de neurônios decorrente da infecção viral, ou de mecanismos de autoimunidade, e sim da reação inflamatória desencadeada pelo reconhecimento de células T infectadas por linfócitos T citotóxicos $CD8^+$ no SNC, com consequente liberação de citocinas próinflamatórias, como o TNF- α , cujo efeito em altas concentrações pode induzir a morte celular por apoptose, provocando indiretamente a lesão medular (Hollsberg & Hafler, 1992; Araújo & Silva, 2006; Ollière *et al.*, 2011). Contudo, o evento ou mecanismo que promove o desequilíbrio do estado assintomático e desencadeia o desenvolvimento de doenças ainda é desconhecido.

Tem sido proposto que a CPV de HTLV-1, que em altos níveis é considerada fator de risco para o desenvolvimento de doenças, é determinada por processos de

seleção positivos e negativos das células infectadas (Bangham *et al.*, 2009). Eventos como a expressão de genes virais, tais como *tax* e *HBZ*, que estão envolvidos na proliferação e sobrevivência das células infectadas, e a ação supressora de Tregs atuam positivamente na manutenção da CPV durante a fase crônica da infecção. Por outro lado, células expressando antígenos virais seriam negativamente selecionadas pela intensa resposta de CTLs específicas, comumente presente nos indivíduos infectados pelo HTLV-1, estimulando a produção de citocinas inflamatórias (Asquith & Bangham, 2008). Por isso, a expressão proviral em si, que é influenciada pelo sítio de integração, a frequência de Tregs e o perfil de produção de citocinas provavelmente são fatores determinantes para a patogênese da PET/MAH. Dessa forma, a identificação precoce dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 que estão evoluindo e possuem maior risco de desenvolver doença é um dos maiores problemas de saúde pública relacionados a esta infecção. Portanto, a identificação de marcadores biológicos que auxiliem no prognóstico dos indivíduos infectados, com maior risco para o acometimento neurológico, possibilitaria um melhor acompanhamento clínico, assim como o início precoce de medidas terapêuticas, diminuindo o impacto social da infecção pelo HTLV-1.

2. OBJETIVOS:

2.1. Objetivo Geral:

- Avaliar parâmetros da resposta imune e da dinâmica da infecção pelo HTLV-1, em portadores assintomáticos da infecção e indivíduos com PET/MAH, que possam ser utilizados como marcadores biológicos para o desenvolvimento de PET/MAH.

2.2. Objetivos Específicos:

- Avaliar a associação de níveis elevados de carga proviral com o desenvolvimento da PET/MAH;

- Avaliar o padrão de integração do DNA proviral do HTLV-1 e a frequência de clones infectados predominantes que persistem ao longo do tempo, em portadores assintomáticos e em pacientes com PET/MAH;
- Avaliar o nível de expressão de genes virais (*tax* e *HBZ*) *ex vivo* e *in vitro* em PBMCs de portadores assintomáticos da infecção pelo HTLV-1 e em indivíduos com PET/MAH;
- Avaliar *in vitro* a expressão de genes de citocinas (*IFN- γ* e *IL-10*), usando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, em PBMCs de portadores assintomáticos e em pacientes com PET/MAH, em comparação a grupo-controle composto por indivíduos não infectados.
- Caracterizar e avaliar a frequência de células T reguladoras em indivíduos infectados pelo HTLV-1, assintomáticos e com acometimento neurológico, comparando com os resultados de grupo-controle composto por indivíduos não infectados.

3. METODOLOGIA:

3.1. Tipo de estudo e aspectos éticos:

O Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) possui um Programa de Extensão-Pesquisa-Ensino-Serviço (PEPES) em HTLV, que atende pacientes do Estado do Rio de Janeiro e de outras regiões do país. Neste Centro são realizados os diagnósticos sorológico e molecular, e o aconselhamento e atendimento médico especializado aos indivíduos infectados assintomáticos e de portadores de doenças, sendo acompanhada uma coorte com cerca de 700 indivíduos infectados.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IPEC/Fiocruz em 29 de junho de 2007, sob registro CAAE 0013.0.009.000-07, e trata-se de um estudo de corte transversal do tipo caso-controle, aninhado a uma coorte, realizado com amostras de conveniência de pacientes com diagnóstico de infecção pelo HTLV-1, devido aos critérios de inclusão e exclusão aplicados, e que apresentavam definição clínica do estado neurológico quanto ao desenvolvimento de PET/MAH e outras alterações neurológicas.

3.2. Critérios de Elegibilidade:

3.2.1. Critérios de inclusão:

Foram incluídos no estudo indivíduos de ambos os sexos, maiores de 18 anos, portadores de infecção pelo HTLV-1, que não apresentavam outras co-infecções virais persistentes (HIV, HCV), e que não estavam sob uso de drogas imunomoduladoras nos últimos seis meses, e que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo I).

3.2.2. Critérios de exclusão:

Não preencher os critérios de inclusão citados acima ou se recusar a participar do estudo.

3.3. Casuística, coleta de dados e de material biológico:

Os indivíduos incluídos na pesquisa foram distribuídos em três grupos:

- 1) Grupo AC: 38 indivíduos assintomáticos infectados pelo HTLV-1;
- 2) Grupo PET/MAH: 45 pacientes portadores de PET/MAH;
- 3) Grupo NI: 12 indivíduos não infectados (Grupo-controle para comparação).

Os dados clínicos e laboratoriais dos indivíduos do estudo foram extraídos do sistema de prontuários eletrônicos do IPEC/Fiocruz, mantendo-se a sua confidencialidade e privacidade, e com exceção dos indivíduos saudáveis, todos se enquadraram nos critérios propostos para inclusão. De acordo com a avaliação clínica periódica destes pacientes, foram coletados 10mL de sangue periférico em EDTA, que foram utilizados na realização dos ensaios descritos a seguir.

3.4. Extração de DNA a partir de leucócitos de sangue periférico.

O DNA proveniente de leucócitos de sangue periférico foi obtido por extração com o kit Puregene Blood Core kit B (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. Foram adicionados 300µL de sangue periférico colhido em EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) a um microtubo de 1,5mL contendo 900µL de solução para lise de hemácias. Após homogeneização, o material foi incubado a temperatura ambiente por 1 min., ou até observação da lise das hemácias, sendo posteriormente centrifugado a 16.000 × g por 20 segundos para sedimentação dos leucócitos. O sobrenadante foi descartado utilizando-se uma micropipeta, sendo deixado um resíduo de aproximadamente 50µL. Após a ressuspensão das células, foram adicionados 300µl de solução de lise celular e, após homogeneização, as amostras foram mantidas por 1 min. a temperatura ambiente. Subsequentemente, 100µL de solução de precipitação de proteínas foram adicionados nas amostras, que foram agitadas vigorosamente por 15 segundos, e centrifugadas a 16.000 × g por 1 min. para sedimentação do precipitado protéico. O sobrenadante resultante foi vertido para um microtubo de 1,5mL contendo 300µL de isopropanol P.A. (Merck) e, após homogeneização por inversão (50 vezes), o DNA precipitado foi sedimentado por centrifugação a 16.000 × g por 1 min. Após descarte do sobrenadante, o DNA foi lavado duas vezes com 600µL de etanol a 75% por centrifugação a 16.000 × g por 1 min. O sobrenadante da última lavagem foi completamente removido com o auxílio de uma micropipeta, e o DNA precipitado secado ao ar por 5 min., sendo homogeneizado em 100µL de solução de reidratação. A amostra obtida foi incubada durante a noite a temperatura ambiente para total dissolução do DNA, e estocada a -20°C até a sua utilização.

3.5. Determinação da carga proviral de HTLV-1 por PCR em tempo real.

A CPV de HTLV-1 foi determinada pela técnica de PCR em tempo real descrita por Silva *et al.* (2007) utilizando o equipamento Smart Cycler II (Cepheid). As reações foram realizadas em duplicatas com o reagente TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), num volume final de 25µL, utilizando 200ng de DNA de leucócitos de sangue periférico. Como referência, foi amplificado um segmento

de 79pb do gene da β -globina humana, utilizando 50 pmoles dos iniciadores β -glob-F (5'-GCAAGAAAGTGCTCGGTGC-3') e β -glob-R (5'-TCACTCAGTGTGGCAAAGGTG-3') e 2,5 pmoles da sonda β -glob (5'-TAGTGATGGCCTGGCTCACCTGGAC-3') marcada com 5'-FAM e 3'-TAMRA. Para detecção das células infectadas foi realizada a amplificação de um segmento de 159pb do gene *tax* de HTLV-1, utilizando 15 pmoles de cada um dos iniciadores SK43 (5'-CGGATACCCAGTCTACGTGT-3') e SK44 (5'-GAGCCGATAACGCGTCCATCG-3') e 5 pmoles da sonda SK45 (5'-ACGCCCTACTGGCCACCTGTC-3') marcada com 5'-FAM e 3'-TAMRA. As reações foram submetidas ao seguinte ciclo de amplificação: ativação/desnaturação inicial a 95°C por 10 min., seguida de 47 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e de anelamento/extensão a 60°C por 1 min., sendo a fluorescência detectada ao final de cada ciclo. Para determinar o número total de células em cada reação foi construída uma curva-padrão utilizando diluições na base 2 de uma amostra-padrão de DNA genômico humano (Promega), com concentrações variando de 800ng a 30ng. A curva-padrão para determinação do número de células infectadas foi construída com diluições na base 2 do DNA obtido da linhagem TARL-2, que apresenta uma cópia do provírus de HTLV-1 por célula, com concentrações variando de 400ng a 2ng. O limite de detecção desta técnica foi de uma (01) célula infectada a cada 10.000 células, e ambas as curvas-padrão apresentaram coeficiente de determinação (R^2) >0,998. A CPV de HTLV-1 na população de leucócitos de sangue periférico foi calculada pela seguinte fórmula:

$$[(\text{número de cópias do gene } tax)/(\text{número de cópias do gene } \beta\text{-globina}/2)] \times 100$$

3.6. Avaliação do perfil de integração dos provírus de HTLV-1 em leucócitos de sangue periférico a partir da técnica de PCR invertido longo (IL-PCR).

O perfil de integração do provírus de HTLV-1 no genoma celular foi avaliado pela técnica de IL-PCR descrita por Etoh *et al.* (1997), conforme exemplificado na figura 13. Inicialmente, foi realizada a digestão de 1 μ g de DNA de leucócitos de sangue periférico com 5U da enzima de restrição *EcoRI* (New England Biolabs) a 37°C por 2h num volume total de reação de 50 μ L, sendo a reação finalizada por incubação a 75°C por 15 min. A enzima *EcoRI* é capaz de fragmentar o DNA celular,

porém não apresenta sítio para corte no genoma de HTLV-1, gerando assim fragmentos de DNA celular de diferentes tamanhos, alguns contendo o provírus. Após separação em duplicatas ou triplicatas, 300ng do DNA digerido (15 μ L) foram incubados durante a noite a 4°C com 2U da enzima T4 DNA ligase (New England Biolabs) num volume final de 300 μ L, para permitir a autocircularização dos fragmentos gerados. As amostras foram em seguida adicionadas de 5 μ L de glicogênio a 5 μ g/ μ L e de 30 μ L de solução saturada de cloreto de amônio (Qiagen), e o DNA foi precipitado com a adição de 750 μ L de etanol P.A. (Merck) a -20°C. Após homogeneização por inversão (50 vezes), os microtubos foram incubados por 4h em freezer a -20°C para facilitar a precipitação, e posteriormente centrifugados a 12.000 \times g por 10 min. a 4°C. Seguindo o descarte do sobrenadante, o DNA sedimentado foi lavado uma vez com 500 μ L de etanol a 75% por centrifugação a 16.000 \times g por 1 min. a temperatura ambiente. Após a remoção completa do sobrenadante com auxílio de uma micropipeta, o DNA foi secado ao ar por 1 min. e adicionado de 30 μ L de água ultrapura (Invitrogen). As amostras de DNA circularizado foram então digeridas durante a noite a 37°C com 10U da enzima de restrição *Mlu*I (New England Biolabs), num volume final de 50 μ L. A *Mlu*I pertence ao grupo de enzimas de restrição consideradas de corte raro, pois reconhece a seqüência 5'-CGCG-3', que se apresenta em baixa freqüência no genoma humano, havendo por isso poucos sítios de clivagem. Contudo, a enzima *Mlu*I apresenta um sítio de corte na região pX do genoma de HTLV-1, linearizando os círculos de DNA que contêm o provírus, e permitindo a inversão da seqüência de DNA celular, que passa a se localizar entre as seqüências do DNA proviral. As amostras de DNA foram adicionadas de 150 μ L de água ultrapura e novamente purificadas conforme descrito anteriormente, sendo o DNA reidratado num volume final de 30 μ L de água. As amostras resultantes foram submetidas à PCR com o kit GeneAmp XL PCR (Applied Bioystems), seguindo as instruções do fabricante. As reações foram realizadas com 10 μ L do DNA processado, num volume final de 50 μ L, utilizando-se a seguinte mistura: 15 μ L de tampão de reação 3,3X concentrado, 4 μ L de 10mM dNTPs, 2,2 μ L de 25mM MnSO₄, 40 pmoles dos iniciadores U3 (5'-AGTCTGGGCCCTGACCTTTTCAGACTTCTGTTTC-3') e U5 (5'-TGCCTGACCCTGCTTGCTCAACTCTACGTCTTTG-3'), 1 μ L da enzima *Tth* DNA polimerase (4U) e água ultrapura suficiente para completar 40 μ L.

As reações foram preparadas e mantidas em banho de gelo e posteriormente submetidas ao seguinte ciclo de amplificação: ativação/desnaturação inicial a 94°C por 1 min., seguida de 37 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min. e de anelamento/extensão a 68°C por 7 min., e um ciclo de extensão final a 72°C por 10 min. Os amplicons foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1% contendo 1X GelRed (Biotium) em tampão Tris-Borato-EDTA 1X (Invitrogen) a 80 Volts por 3h, sendo os resultados revelados por transiluminação com ultravioleta e fotodocumentados.

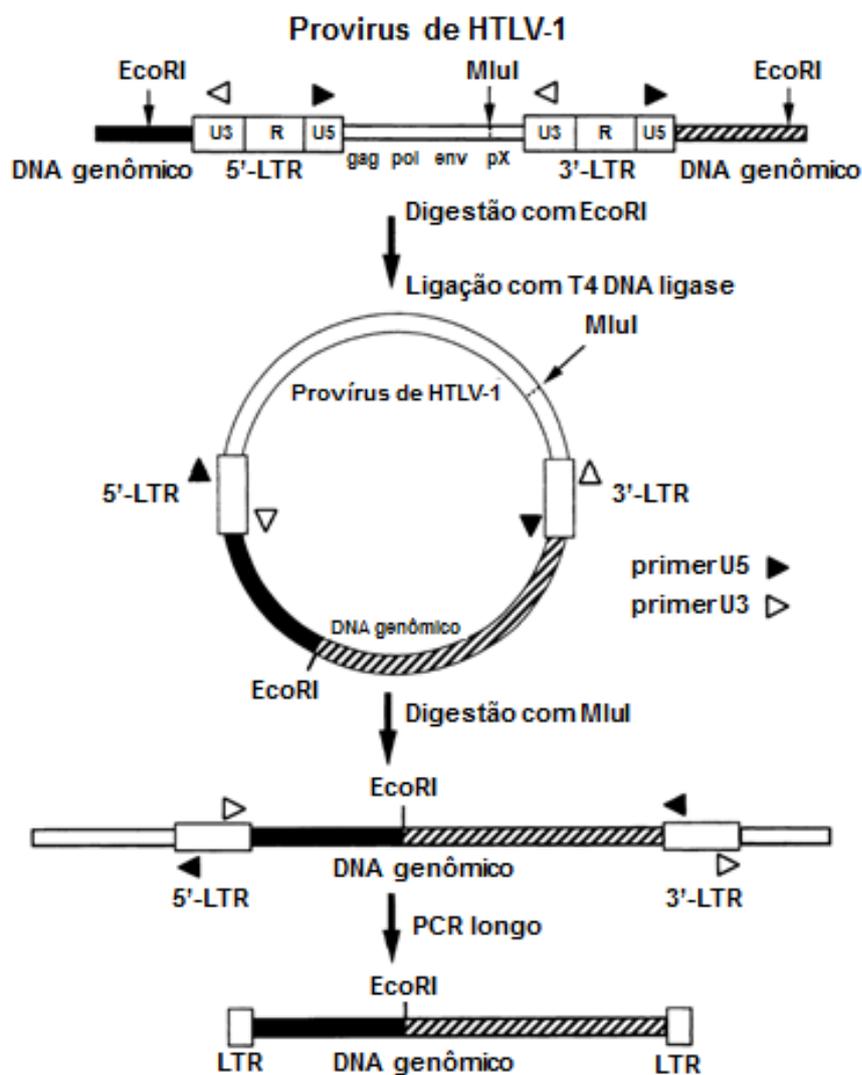


Figura 13. Modelo esquemático da técnica de IL-PCR. O DNA genômico após digestão com a enzima *EcoRI* é diluído e os fragmentos obtidos circularizados com T4 DNA ligase. Os círculos podem ser compostos apenas de DNA celular ou de DNA proviral com DNA celular adjacente. Setas, par de iniciadores usados na IL-PCR. Uma vez que a LTR está presente em ambas as extremidades do

provírus, estes iniciadores poderiam amplificar tanto o DNA genômico adjacente quanto o provírus de HTLV-1. Por isso, os círculos de DNA contendo provírus são previamente linearizados por digestão com a enzima de restrição *MluI* para evitar amplificação do DNA proviral (Retirado e adaptado de Etoh *et al.*, 1997).

3.7. Separação de células mononucleares a partir de sangue periférico.

Células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) foram obtidas por centrifugação em gradiente de densidade utilizando o reagente Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich), seguindo as recomendações do fabricante e boas práticas laboratoriais em ambiente estéril (cabine de fluxo laminar classe II B2, Veco). Em tubos de 15mL de fundo cônico, foram aplicados de 5mL de sangue periférico em EDTA sobre 5mL de Histopaque 1077. Os tubos foram centrifugados a $400 \times g$ por 30 min. a temperatura ambiente. Dessa forma, o sangue foi separado em três fases: uma superior, composta pelo plasma, uma interfase contendo um anel composto por células mononucleares, uma fase intermediária composta de Histopaque, e uma fase inferior, constituída de granulócitos e hemácias agregadas. Após descarte da fase superior, o anel de células mononucleares foi coletado e transferido para outro tubo, sendo o volume completado para 15mL com tampão fosfato salino (PBS) pH7,4 (Sigma) contendo 1mM EDTA e 0,25% de soro albumina bovina (Sigma). Após centrifugação a $250 \times g$ por 10 min. a temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado e as células lavadas por centrifugação a $250 \times g$ por 10 min. com 10mL de PBS, por duas vezes. Após a última lavagem, as células foram ressuspensas em 5mL de meio de cultivo celular RPMI 1640 (Invitrogen) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen), sendo retirada uma alíquota de 0,2mL para contagem diferencial de leucócitos em um contador de células automático (XT1800i, Symex). Em geral, as amostras apresentaram percentual somado de monócitos e linfócitos superior a 90%, conforme esperado, e considerando a contagem leucocitária obtida, a suspensão celular foi ajustada para 10^6 PBMCs/mL em RPMI 1640 adicionado de 10% de SFB. Quando necessária incubação, um volume de 10mL foi transferido para garrafas de 25cm^2 para cultivo celular (Corning), que foram mantidas por 20h a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2 . Após o período de incubação, as células foram coletadas, transferidas para tubos de 15mL de fundo

cônico e centrifugadas a $250 \times g$ por 10 min a temperatura ambiente. Após descarte do sobrenadante e ressuspensão das células, foi adicionado 1mL de Trizol (Invitrogen) a 4°C , sendo a amostra incubada a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente, as amostras foram transferidas para microtubos de 1,5mL e preservadas a -20°C .

3.8. Marcação das células mononucleares para análise de subpopulações de células T CD4⁺ por citometria de fluxo.

O preparo de amostras para análise de subpopulações de células T CD4⁺ por citometria de fluxo foi realizado com o kit para marcação intracelular da eBioscience, seguindo as instruções do fabricante. Em tubos de 75 x 12mm para citometria de fluxo, foram adicionados 100 μL da suspensão celular contendo 10^6 PBMCs. Inicialmente, foi realizada a marcação de proteínas de superfície utilizando os anticorpos monoclonais nos volumes indicados pelo fornecedor (eBioscience): anti-CD4 marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC), anti-CD25 marcado com ficoeritrina (PE), e anti-CD127 marcado com PE-Cianina 7 (Cy7). As células foram homogeneizadas e incubadas por 30 min. a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Como controles para compensação dos canais de detecção da fluorescência, foram realizadas marcações individuais com cada um dos anticorpos monoclonais utilizados e, para definição da região de células não marcadas, foi realizado um controle negativo que não recebeu a adição dos anticorpos. Após a incubação, os tubos foram adicionados de 2mL de PBS pH 7,4 contendo 1mM EDTA e 0,25% de soro albumina bovina, e centrifugados a $250 \times g$ por 7 min a 4°C . O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 1mL de solução de permeabilização/fixação 1X (eBioscience), diluída previamente ao uso. A suspensão celular foi incubada em banho de gelo por 30 min., sendo posteriormente centrifugada a $250 \times g$ por 7 min a 4°C . Após descarte do sobrenadante, as células foram lavadas uma vez por centrifugação a $250 \times g$ por 7 min a 4°C com 2mL da solução de permeabilização 1X (eBioscience), preparada previamente ao uso. Em seguida, o sobrenadante foi descartado com auxílio de uma micropipeta, e deixado um resíduo de aproximadamente 50 μL , sendo adicionado o anticorpo monoclonal anti-FoxP3 marcado com alofocianina (APC) no volume indicado pelo fabricante

(eBioscience). Os tubos foram incubados em banho de gelo por 30 min., e posteriormente as células lavadas duas vezes por centrifugação a $250 \times g$ por 7 min a 4°C com 2mL da solução de permeabilização 1X. Finalmente, as células foram ressuspensas em 500 μL de formol a 1% tamponado em PBS pH 7,4 e mantidas sob refrigeração até a análise no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson), em que foi coletado um total de 100.000 eventos com o programa CellQuest, sendo a análise posteriormente realizada com o programa Summit v4.3.

3.9. Análise dos dados obtidos por citometria de fluxo.

A análise da expressão das moléculas CD4, CD25, CD127 e da proteína FoxP3 foi realizada com o programa Summit v4.3. Inicialmente, a região de linfócitos foi determinada de acordo com as características de tamanho e granulosidade, conforme exemplificado na figura 14A, sendo em seguida determinado o percentual de células T CD4⁺ neste compartimento. Posteriormente, a população de linfócitos T CD4⁺ (Figura 14A) foi subdividida de acordo com a expressão de CD25, conforme a análise descrita por Klein *et al.* (2010) (Figura 14B): (i) células CD25⁽⁻⁾ (Quadrante rosa); células CD25⁺ (Quadrante verde claro); (iii) células CD25^{high}, que representam as células com maior nível de expressão de CD25 e; (iv) células CD25⁺ nos compartimentos de 2%, 5%, 10% e 15% (Quadrantes amarelo, vermelho, verde escuro e azul, respectivamente) das células com maior intensidade de expressão de CD25. A expressão de FoxP3 foi avaliada na população total de células T CD4⁺ (Figura 14A) e nas subpopulações de células T CD4⁺ definidas de acordo com a expressão de CD25 (Figura 14C). A expressão de CD127 foi utilizada como um marcador auxiliar da caracterização das Tregs, sendo avaliada em conjunto com a expressão de CD25 nas populações de células T CD4⁺ (Figura 14D), quando da presença ou ausência de expressão de FoxP3 (Figura 14E). Além dos valores percentuais obtidos, os resultados também foram apresentados em números absolutos, que foram calculados a partir da contagem de linfócitos obtida no hemograma correspondente à amostra de sangue colhida em EDTA.

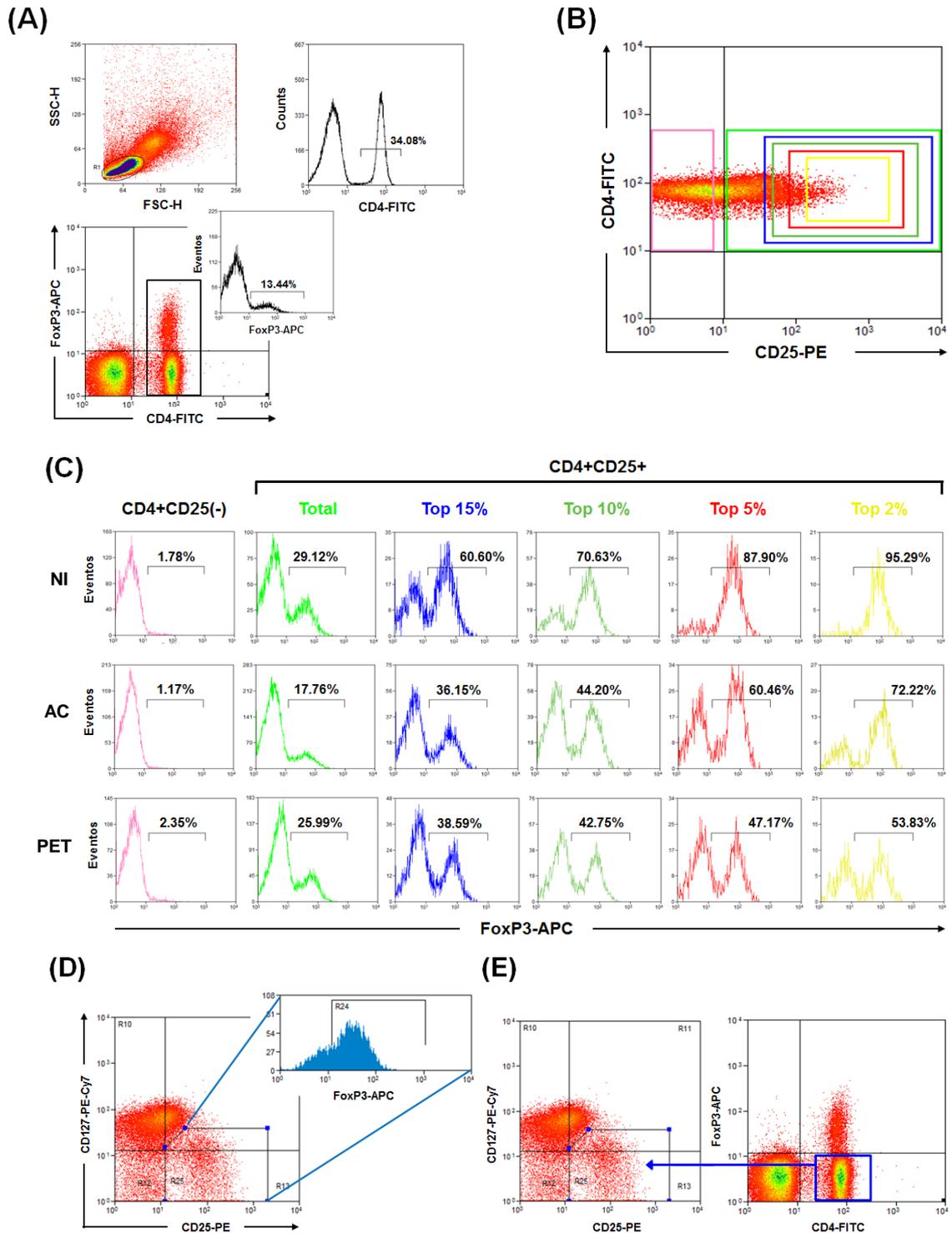


Figura 14. Análise da expressão de FoxP3 em subpopulações de células T CD4⁺. (A) Linfócitos foram selecionados de acordo com suas propriedades de tamanho (FSC, *forward scatter*) e granulosidade (SSC, *side scatter*). Os quadrantes foram determinados usando controles positivos para cada uma das moléculas avaliadas. (B) Células T CD4⁺ foram subdivididas em células CD25⁻, células CD25⁺ (Total) e em células CD25⁺ top 2%, 5%, 10% e 15% mais brilhantes de acordo com a intensidade de fluorescência, onde foram determinados (C) os respectivos percentuais de células FoxP3⁺ (Klein *et al.*, 2010) nos grupos de indivíduos não infectados, de portadores assintomáticos da

infecção por HTLV-1 e de pacientes com PET/MAH. (D) Células T CD4⁺ foram avaliadas quanto ao nível de expressão de CD25 e CD127, sendo o percentual de células FoxP3⁺ calculado na população de células T CD4⁺CD25⁺CD127^{-low}. (E) A expressão de CD25 e CD127 também foi avaliada na população de células T CD4⁺FoxP3⁽⁻⁾.

3.10. Extração de RNA de células mononucleares de sangue periférico.

O RNA total de PBMCs frescos ou incubados por 20h foi obtido por extração utilizando o reagente Trizol (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. As amostras de PBMCs preservadas a -20°C em Trizol foram incubadas por 5 min. a temperatura ambiente para permitir a completa dissociação de nucleoproteínas. Após homogeneização, as amostras foram adicionadas de 0,2mL de clorofórmio P.A. (Merck), sendo agitadas manualmente de forma vigorosa por 15 segundos. Após incubação por 3 min. a temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 12.000 × g por 15 min. a 4°C, resultando na formação de uma fase aquosa, em que se encontra exclusivamente o RNA, uma interfase, e uma fase orgânica (fenol-clorofórmio), que contém DNA e proteínas. A fase aquosa foi coletada e transferida para outro microtubo contendo 500µL de isopropanol P.A. (Merck). Após homogeneização, as amostras foram incubadas por 10 min. a temperatura ambiente e, posteriormente, centrifugadas a 12.000 × g por 10 min. a 4°C para sedimentação do RNA precipitado. O sobrenadante foi totalmente removido, e o sedimento lavado com 1mL de etanol a 75% por centrifugação a 7.500 × g por 5 min. a 4°C. Após completa remoção do sobrenadante com micropipeta, o RNA foi secado ao ar por 5 min. e reidratado em 15µL de solução de 10mM Tris/1mM EDTA (Qiagen). Após quantificação por espectrofotometria, as amostras de RNA total foram prontamente transcritas em cDNA.

3.11. Síntese de cDNA a partir do RNA total de células mononucleares.

A transcrição reversa do RNA total obtido de PBMCs foi realizada com a enzima SuperScript III (Invitrogen) utilizando hexâmeros randômicos (Invitrogen). Em cada reação foram utilizados 2µg de RNA total, que foram diluídos em água ultrapura (Invitrogen) para o volume de 12µL. Inicialmente, as amostras de RNA

foram incubadas a 65°C por 5 min. na presença de 100ng de hexâmeros randômicos (1µL) e de dNTPs (1µL da mistura de dNTPs a 10mM cada), sendo transferidas e mantidas em um banho de gelo por 1 min., permitindo assim a desnaturação das moléculas de RNA e o anelamento dos iniciadores. Posteriormente, estas amostras foram adicionadas de 6µL da mistura de reação contendo: 4µL do tampão de reação 5X concentrado, 1µL de 100mM ditioneitol e 1µL de SuperScript™ III (200U), num volume final de 20µL. Após homogeneização, as reações foram incubadas a 50°C por 50 min., sendo a enzima inativada ao final por incubação a 70°C por 15 min. As amostras resultantes de DNA complementar (cDNA) foram prontamente submetidas à PCR em tempo real ou preservadas a -20°C.

3.12. Determinação da expressão de genes virais e celulares em células mononucleares de sangue periférico.

A expressão de mRNAs virais e celulares foi detectada pela técnica de PCR em tempo real utilizando o equipamento Rotor-Gene Q (Qiagen). As reações foram realizadas com o reagente Rotor Gene Probe PCR kit (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante, num volume final de 25µL, utilizando 100ng de cDNA obtido das reações de transcrição reversa. Como referência para a avaliação da expressão gênica, foi escolhido o gene constitutivo para a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Tanto a expressão de GAPDH quanto a expressão de mRNAs de IL-10 e IFN-γ foram detectadas utilizando-se kits contendo iniciadores e sondas com sequências e concentrações pré-estabelecidas (Applied Biosystems). A detecção de mRNAs de *tax* de HTLV-1 seguiu a mesma metodologia descrita anteriormente para a amplificação de um fragmento de 159pb do gene *tax* na determinação da CPV, enquanto a detecção de mRNAs de *HBZ* utilizou a metodologia descrita por Saito *et al.* (2009), utilizando 15pmoles dos iniciadores HBZ-F (5'-AGAACGCGACTCAACCGG-3') e HBZ-R (5'-TGACACAGGCAAGCATCG A-3'), e 5 pmoles da sonda HBZ (5'-TGGATGGCGGCCTCAGGGCT-3') marcada com 5'-FAM e 3'-TAMRA. A sonda para HBZ se anela na região de junção dos exons e, por isso, detecta somente isoformas de mRNA que sofreram *splicing* e que contribuem mais significativamente para a síntese de proteínas. As reações foram realizadas em duplicatas e submetidas ao seguinte ciclo de amplificação:

ativação/desnaturação inicial a 95°C por 3 min., seguida de 50 ciclos de desnaturação a 95°C por 5 segundos e de anelamento/extensão a 60°C por 15 segundos, sendo a fluorescência detectada ao final de cada ciclo. A eficiência de amplificação da PCR para GAPDH foi determinada com a construção de uma curva utilizando-se diluições contendo 100ng, 50ng e 25ng de cDNA de um indivíduo não infectado. Por outro lado, a eficiência de amplificação das PCRs para Tax e HBZ foram determinadas com diluições na base 2 de amostras de cDNA obtidos por transcrição reversa do RNA total de células da linhagem MT2 infectada pelo HTLV-1, com concentrações variando de 100ng a 3,125ng. As curvas obtidas apresentaram coeficiente $R^2 > 0,996$. A análise da expressão gênica relativa foi realizada pelos métodos descritos por Livak & Schmittgen (2001) e Pfaffl (2001), conforme indicado.

3.13. Análise estatística.

A elaboração dos gráficos e a análise estatística foram realizadas no programa GraphPad Prism 5. As variáveis quantitativas foram inicialmente submetidas ao teste de Kolmogorov-Smirnoff para determinar se a sua distribuição seguia a normalidade. As variáveis cuja dispersão foi considerada normal foram testadas utilizando testes paramétricos, tais como correlação de Pearson, ANOVA e teste *t* de Student, utilizando correção de Welch quando apropriado. Enquanto isso, as variáveis assimétricas foram avaliadas por testes não-paramétricos, tais como Kruskal-Wallis, Mann-Whitney e correlação de Spearman. A associação entre variáveis qualitativas foi definida pelo método de qui-quadrado. Foram considerados significativos resultados com $p < 0,05$.

4. RESULTADOS:

4.1. Aspectos demográficos e clínicos dos indivíduos da pesquisa

Respeitando os critérios de inclusão e exclusão propostos, foram incluídos no estudo 83 indivíduos infectados pelo HTLV-1, sendo 38 ACs e 45 pacientes com PET/MAH, e 12 indivíduos não infectados (NI). Os grupos de ACs e de pacientes com PET/MAH apresentaram médias de idade semelhantes ($55,8 \pm 10,8$ anos e

56,6 ± 12,6 anos, respectivamente), que foram maiores que as do grupo-controle NI (38,3 ± 14,2 anos) (Tabela 2). Os indivíduos com acometimento neurológico incluídos na pesquisa apresentaram tempo de duração médio da PET/MAH de 14 ± 8,1 anos (Tabela 2), o que caracteriza um estágio crônico da doença. Subtraindo-se a idade média dos pacientes (56,6 anos) do tempo médio de doença (14 anos) foi observada uma idade média de início de manifestação de doença de 42,6 anos. Além disso, foi observada uma frequência de PET/MAH 3,1 vezes maior em mulheres do que em homens (Tabela 2).

TABELA 2. Aspectos demográficos e clínicos dos indivíduos da pesquisa.

Grupos	Idade ^a (média ± DP)	Proporção (homem:mulher)	Duração da doença ^a (média ± DP)	Tempo de seguimento ^a (média ± DP)	CPV (% PBL) Mediana** [P _{25%} - P _{75%}] ^b
NI	38,3 ± 14,2	1 : 1,4	N.A.	N.A.	N.A.
AC	55,8 ± 10,8	1 : 0,7	N.A.	12,3 ± 3,5	4,31 [1,11 - 6,85]
PET/MAH	56,6 ± 12,6	1 : 3,1	14,0 ± 8,1	7,1 ± 4,7	6,28 [3,80 - 12,22]

NOTA. CPV, carga proviral; PBL, leucócitos de sangue periférico; NI, não-infectados; AC, portadores assintomáticos; PET/MAH, Paraparesia espástica tropical/Mielopatia associada ao HTLV-1; DP, desvio-padrão; N.A., não se aplica.

^a Valores em anos;

^b [P_{25%} - P_{75%}], [Percentil 25% - Percentil 75%].

** Comparação entre as medianas de CPV dos grupos AC e PET/MAH (Mann-Whitney, $p < 0,01$).

Uma vez que a infecção pelo HTLV-1 se caracteriza por um longo intervalo de tempo entre o momento da infecção e o desenvolvimento de doenças associadas, o tempo de seguimento clínico dos indivíduos incluídos na pesquisa se mostrou uma variável importante, principalmente no grupo de ACs, para assegurar a ausência de alterações neuro-hematológicas. ACs e pacientes com PET/MAH estavam sendo acompanhados no ambulatório de HTLV do IPEC por 12,3 ± 3,5 anos e 7,1 ± 4,7 anos, respectivamente (Tabela 2). Outro fator que tem se mostrado importante no acompanhamento da evolução da infecção nos portadores de HTLV-1 é a CPV (Nagai *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 2007). Foi evidenciado que indivíduos com PET/MAH apresentaram medianas de CPV mais elevadas que ACs (Tabela 2).

Para verificar a associação destes níveis elevados de CPV de HTLV-1 com o desenvolvimento da PET/MAH, os grupos de ACs e de pacientes com PET/MAH foram subdivididos em: (1) indivíduos com CPV igual ou inferior a 5% e (2) com CPV igual ou superior a 5% (Tabela 3A). Num segundo momento, estes mesmos indivíduos foram redistribuídos em dois grupos, considerando como ponto de corte CPV de 10% (Tabela 3B). Após realização do teste qui-quadrado, foi observado que a razão de chance (RC) de manifestação neurológica aumenta concomitantemente com o nível de CPV. Indivíduos com CPV maior que 5% tiveram 2,74 vezes mais chance de apresentar PET/MAH ($p=0,026$) (Tabela 3A), valor este que se elevou para 4,25 vezes quando considerada CPV maior que 10% ($p=0,028$) (Tabela 3B).

Tabela 3. Associação entre carga proviral elevada de HTLV-1 e PET/MAH.

(3A)

Estado clínico	Carga proviral de HTLV-1		Total	χ^2 p valor	RC (IC _{95%})
	<5,00%	>5,00%			
PET/MAH	14	31	45	0,026	2,74 (1,11 – 6,72)
AC	21	17	38		
Total	35	48	83		

(3B)

Estado clínico	Carga proviral de HTLV-1		Total	χ^2 p-valor	RC (IC _{95%})
	<10,00%	>10,00%			
PET/MAH	30	15	45	0,028*	4,25 (1,27 - 14,21)
AC	34	4	38		
Total	64	19	83		

NOTA. Carga proviral como % de células infectadas pelo HTLV-1/leucócitos de sangue periférico; AC, portador assintomático; PET/MAH, paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1. A significância estatística (p valor bi-caudal) da associação entre o estado clínico dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 e a carga proviral com pontos de corte a (A) 5,00% ou (B) 10,00% foi avaliada pelo teste de qui-quadrado (χ^2). As razões de chances (RC) também foram calculadas e os valores apresentados. * p -valor corrigido por Yates.

4.2. Determinação do padrão de integração proviral e da freqüência de clones infectados persistentes em portadores assintomáticos do HTLV-1 e pacientes com PET/MAH:

Um dos eventos-chave no estabelecimento de infecção persistente pelo HTLV-1, assim como em outras retrovíroses, é a integração do genoma viral no DNA celular. Clones de células T infectadas pelo HTLV-1 são capazes de persistir por anos em pacientes, como pode ser observado nos resultados da IL-PCR, conforme indicado pelas setas na figura 15. Foram observados predominantemente padrões estocásticos de integração proviral, em que o rastro de amplificação gerado representa clones minoritários, enquanto as bandas que se destacam são referentes a populações clonais infectadas predominantes (Figura 15). O perfil de integração foi oligoclonal em cinco de seis pacientes com PET/MAH e em três de cinco ACs. Dessa forma, nenhuma associação foi observada entre o padrão de integração de HTLV-1 e a condição clínica dos indivíduos avaliados ($p=0,545$, Teste qui-quadrado).

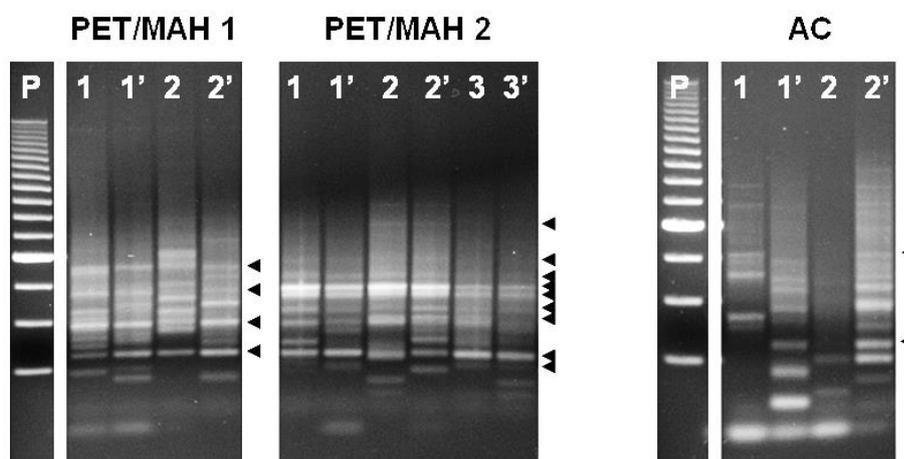


Figura 15. Persistência de clones infectados pelo HTLV-1. A avaliação do perfil de integração proviral de HTLV-1 foi realizada em leucócitos de sangue periférico de ACs e de pacientes com PET/MAH. Amostras de DNA obtidas ao longo de uma média de 36,4 meses (IC_{95%} [23,1 – 49,7]) entre as datas da primeira e da última coleta foram utilizadas na avaliação do perfil de integração proviral por IL-PCR. As amostras do paciente PET/MAH 1 apresentaram um intervalo de 46 meses entre a primeira e última amostra, as do paciente PET/MAH 2 um intervalo de 66 meses, as do AC tiveram um intervalo de 27 meses. As bandas formadas no gel de agarose após eletroforese foram consideradas referentes a clones predominantes infectados pelo HTLV-1 quando presentes em

ambas as duplicatas, e visualmente destacadas do rastro de fundo, que representa a amplificação de sítios de integração de clones minoritários. Os resultados apresentados de dois pacientes com PET/MAH e de um AC são representativos de seis pacientes com PET/MAH e de cinco ACs. Setas indicam clones persistentes infectados com HTLV-1. P, marcador de peso molecular de 500bp. A IL-PCR foi realizada em duplicata.

Por outro lado, embora não tenham sido observadas diferenças no padrão de integração proviral entre os grupos de indivíduos infectados, pacientes com PET/MAH apresentaram maior frequência de clones infectados persistentes ($5,82 \pm 1,71$ clones) em comparação a ACs ($3,25 \pm 1,72$ clones) ($p=0,046$) (Figura 16).

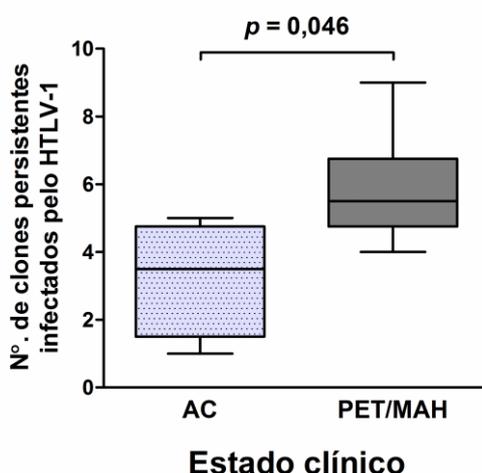


Figura 16. Frequência de clones infectados persistentes em ACs e pacientes com PET/MAH. A clonalidade de populações de células infectadas pelo HTLV-1 foi avaliada pela IL-PCR. Bandas observadas no gel de agarose após eletroforese foram consideradas como referente a clones predominantes infectados pelo HTLV-1 quando presentes em ambas as duplicatas e visualmente destacadas do rastro de fundo. Clones infectados foram considerados persistentes quando suas bandas apareceram em pelo menos uma das duplicatas de todas as amostras testadas de um mesmo paciente. A significância estatística da diferença entre a média do número de clones persistentes definidos em cada grupo foi calculada pelo teste *t* de Student.

4.3. Avaliação da expressão dos genes *tax* e *HBZ* de HTLV-1 em PBMCs de portadores assintomáticos do HTLV-1 e em indivíduos com PET/MAH:

Da mesma forma que pacientes com PET/MAH apresentaram mediana de CPV mais elevada que a de ACs (Tabela 2), e uma maior frequência de populações

clonais predominantes infectadas persistentes (Figura 16), estes indivíduos também apresentaram maior expressão relativa de mRNAs de *tax* em PBMCs frescos (0h) em comparação a ACs ($p < 0,001$) (Figura 17A). Contudo, o gene *tax* de HTLV-1 foi fracamente expresso *ex vivo* por PBMCs frescos em relação aos níveis de transcrição celular basal definidos pela detecção de mRNAs de *GAPDH* (10.000 a 100.000 vezes menor).

Porém, Hanon *et al.* (2000a) demonstraram que a incubação de PBMCs por 20h, na ausência de estímulos mitogênicos, é suficiente para estimular a expressão proviral. Conforme observado na Figura 17B, a incubação de PBMCs acarretou um aumento de 10.000 a 100.000 vezes da expressão de mRNAs de *tax*, quando comparado com os valores obtidos com PBMCs frescos (Figura 17A). Embora, tenha sido observada uma redução na diferença dos níveis de expressão de *tax* entre ACs e pacientes com PET/MAH, que culminou na perda de significância estatística (Figura 17B). Além disso, a expressão de *tax* por PBMCs *ex vivo* (0h) e *in vitro* (20h) correlacionou positivamente com a CPV, independentemente do estado clínico quando avaliada a 0h (Figura 18A), ou apenas nos pacientes com PET/MAH após 20h de incubação (Figura 18B).

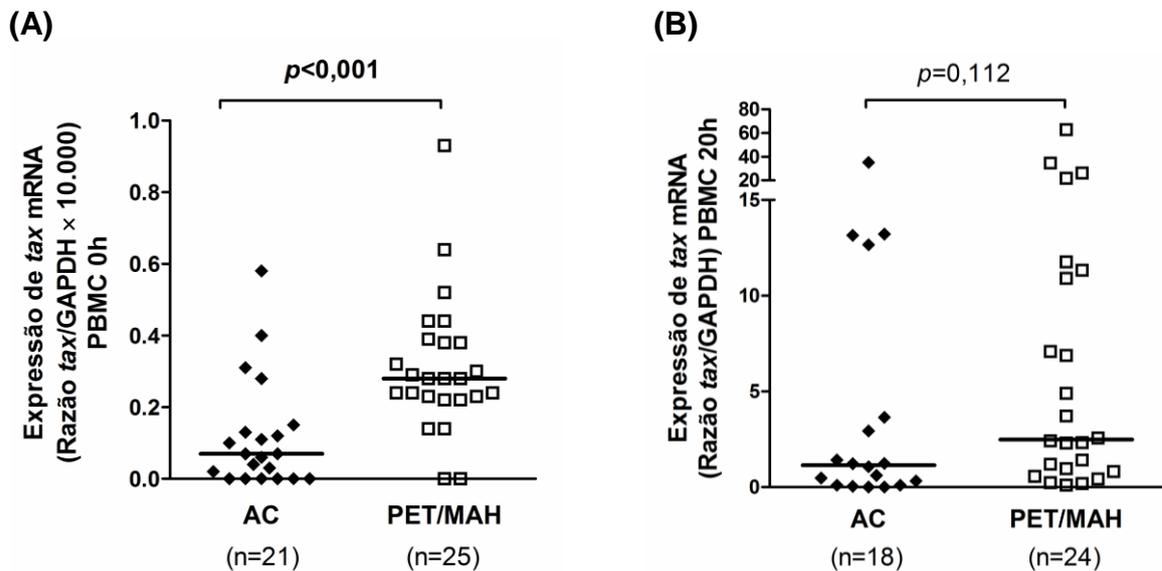
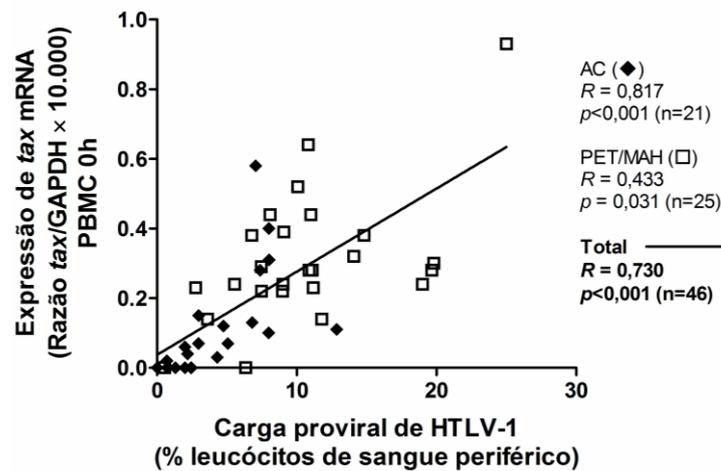


Figura 17. Expressão de *tax* em células de ACs e pacientes com PET/MAH. (A) A expressão *ex vivo* de mRNAs de *tax* em PBMCs frescos (0h) de ACs (n=21) e de pacientes com PET/MAH (n=25) foi definida como a razão entre a expressão de *tax* de HTLV-1 e de *GAPDH*, que foi arbitrariamente multiplicada por 10.000 para se trabalhar com menos casas decimais. Os valores de expressão de *GAPDH* foram calculados através de curva-padrão determinada com diluições do cDNA obtido pela transcrição reversa do RNA total de PBMCs de indivíduo não infectado. Por outro lado, os valores de

expressão de *tax* foram obtidos através de curva-padrão definida com diluições do cDNA referente a transcrição reversa do RNA total da linhagem MT2. **(B)** A expressão de *tax* em PBMCs incubados por 20h sem estimulação (AC, n=18 e PET/MAH, n=24) foi calculada conforme descrição anterior, e representa a razão entre os valores de expressão de *tax* e de *GAPDH*, sem a multiplicação por 10.000 (Teste de Mann-Whitney).

(A)



(B)

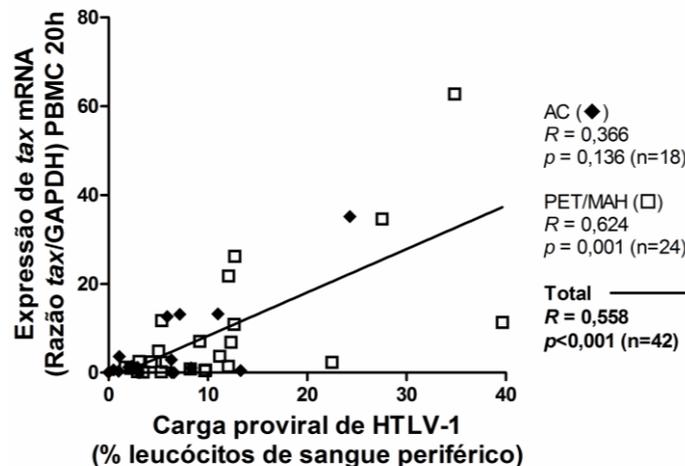


Figura 18. Correlação entre a expressão de *tax* e a carga proviral de HTLV-1. A expressão de mRNAs de *tax* foi avaliada em **(A)** PBMCs frescos (0h) e **(B)** incubados por 20h sem estímulo de ACs e de pacientes com PET/MAH, e está apresentada como a razão entre a expressão dos genes *tax* e *GAPDH*. Os resultados em (A) foram arbitrariamente multiplicados por 10.000 para se trabalhar com menos casas decimais. Os valores de expressão de *tax* foram definidos a partir de curva-padrão estabelecida com diluições do cDNA referente ao RNA total extraído da linhagem celular MT2, enquanto a curva-padrão de *GAPDH* foi determinada com diluições do cDNA produzido a partir do RNA total de PBMCs de um indivíduo não infectado. A correlação foi calculada pelo Teste de Spearman, e foram considerados significativos $p < 0,05$.

A expressão relativa ($-\Delta\Delta Ct$) dos genes virais *tax* e *HBZ*, utilizando a expressão de *GAPDH* como referência, em PBMCs incubados por 20h provenientes de ACs e pacientes com PET/MAH foi avaliada pelos métodos descritos por Livak &

Schmittgen (2001) e por Pfaffl (2001). No método de Livak & Schmittgen (2001) são pré-requisitos que os valores de eficiência de amplificação das PCRs (Ef_{PCR}) dos genes avaliados sejam semelhantes, e que este valor se aproxime de 2, ou seja 100%. Por outro lado, na metodologia descrita por Pfaffl (2001), os valores reais de Ef_{PCR} de cada gene avaliado são levados em consideração. A PCR em tempo real para *tax* apresentou uma Ef_{PCR} de 1,96, o que significa que 96% das fitas eram duplicadas a cada ciclo de amplificação, enquanto as PCRs para *HBZ* e *GAPDH* apresentaram Ef_{PCR} de 1,87 e 1,84 respectivamente. Não foram observadas diferenças significativas na expressão de *tax* e de *HBZ* entre os grupos de ACs e de pacientes com PET/MAH quando considerados os valores de expressão relativa calculados pelos métodos descritos tanto por Livak & Schmittgen (2001) (Tabela 4) quanto por Pfaffl (2001) (Quadro 1). Foi observado que pacientes com PET/MAH expressaram 4,5 vezes mais mRNAs de *tax* do que ACs, considerando-se o método de Livak & Schmittgen (2001) (Tabela 4), e este valor passou para 4,38 vezes quando corrigido pela Ef_{PCR} com o método de Pfaffl (2001) (Quadro 1B). Quanto à expressão de *HBZ*, pacientes com PET/MAH expressaram 3,01 vezes mais mRNAs de *HBZ* do que ACs pelo método de Livak & Schmittgen (2001) (Tabela 4), ou 2,49 vezes quando corrigido pelo método de Pfaffl (2001) (Quadro 1C).

Tabela 4. Expressão relativa de *tax* e *HBZ* em ACs e pacientes com PET/MAH.

Gene alvo	Ct_{alvo}	Ct_{GAPDH}	ΔCt (media $Ct_{alvo} - media Ct_{GAPDH}$)	$\Delta\Delta Ct$ (media $\Delta Ct_{PET/MAH} - media \Delta Ct_{AC}$)	Expressão normalizada ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
<i>Tax</i>					
AC	23,48 ± 4,24	18,18 ± 0,81	5,26 ± 4,53	0,00 ± 4,53	1,00 (0,04 – 23,10)
PET/MAH	21,20 ± 2,53	18,08 ± 0,75	3,09 ± 2,60	-2,17 ± 2,60	4,50 (0,74 – 27,28)
<i>HBZ</i>					
AC	34,03 ± 4,47	18,18 ± 0,81	16,04 ± 4,63	0,00 ± 4,63	1,00 (0,04 – 24,76)
PET/MAH	32,48 ± 2,75	18,08 ± 0,75	14,45 ± 2,72	-1,59 ± 2,72	3,01 (2,19 – 19,84)

NOTA. A expressão relativa de mRNAs de *tax* e de *HBZ* por PBMCs incubados por 20h, sem estimulação, entre indivíduos assintomáticos (ACs) e pacientes com PE T/MAH foi determinada pelo método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ descrito por Livak & Schmittgen (2001). Valores estão apresentados como média ± desvio-padrão. Ct, *Cycle threshold*.

Quadro 1. Expressão relativa de *tax* e *HBZ* determinada pelo método de Pfaffl.

(A)

$$\text{Expressão relativa (ER)} = \frac{\frac{\Delta\text{Ct}_{\text{alvo}} (\text{média Ct}_{\text{controle}} - \text{média Ct}_{\text{teste}})}{\text{Ef}_{\text{PCR alvo}}}}{\frac{\Delta\text{Ct}_{\text{ref}} (\text{média Ct}_{\text{controle}} - \text{média Ct}_{\text{teste}})}{\text{Ef}_{\text{PCR ref}}}}$$

(B)

$$\text{ER} = \frac{\frac{\Delta\text{Ct}_{\text{tax}} (\text{AC} - \text{PET/MAH})}{\text{Ef}_{\text{PCR tax}}}}{\frac{\Delta\text{Ct}_{\text{GAPDH}} (\text{AC} - \text{PET/MAH})}{\text{Ef}_{\text{PCR GAPDH}}}} = \frac{\frac{(23,48 - 21,20)}{1,96}}{\frac{(18,18 - 18,08)}{1,84}} = \frac{4,64}{1,06} = 4,38 \text{ X}$$

(C)

$$\text{ER} = \frac{\frac{\Delta\text{Ct}_{\text{HBZ}} (\text{AC} - \text{PET/MAH})}{\text{Ef}_{\text{PCR HBZ}}}}{\frac{\Delta\text{Ct}_{\text{GAPDH}} (\text{AC} - \text{PET/MAH})}{\text{Ef}_{\text{PCR GAPDH}}}} = \frac{\frac{(34,03 - 32,48)}{1,87}}{\frac{(18,18 - 18,08)}{1,84}} = \frac{2,64}{1,06} = 2,49 \text{ X}$$

Quadro 1. Expressão relativa de mRNAs de *tax* e de *HBZ* por PBMCs incubados por 20h, sem estimulação, entre indivíduos assintomáticos (ACs) e pacientes com PET/MAH. (A) A expressão relativa foi determinada pelo método descrito por Pfaffl (2001). Para tal é realizada a subtração entre as médias dos Ct (*Cycle threshold*) obtidos para o gene alvo nos grupos de controle e de teste ($\Delta\text{Ct}_{\text{alvo}}$). Em seguida, a eficiência de amplificação da PCR do gene alvo ($\text{Ef}_{\text{PCR alvo}}$) é elevada à $\Delta\text{Ct}_{\text{alvo}}$. Da mesma forma, a Ef_{PCR} do gene de referência ($\text{Ef}_{\text{PCR ref}}$) é elevada à ΔCt do gene de referência ($\Delta\text{Ct}_{\text{ref}}$). A razão entre os valores obtidos corresponde à expressão relativa (ER) do gene avaliado. Através do método descrito, os níveis de expressão relativa **(B)** de *tax* e **(C)** de *HBZ* foram calculados utilizando a expressão de *GAPDH* como referência.

4.4. Expressão de IL-10 e IFN- γ em PBMCs de portadores assintomáticos da infecção pelo HTLV-1 e de indivíduos com PET/MAH:

Com relação à expressão da citocina imunossupressora IL-10, não foram observadas diferenças entre os níveis detectados em PBMCs de ACs e de pacientes com PET/MAH ($p=0,717$) (Figura 19A), embora tenham sido inferiores aos níveis

observados em indivíduos não infectados ($p=0,005$ e $p=0,006$, respectivamente). Com relação à expressão da citocina pró-inflamatória $IFN-\gamma$, esta foi mais elevada em pacientes com PET/MAH, tanto em comparação com ACs ($p<0,001$) quanto com indivíduos não infectados ($p=0,001$) (Figura 19B). Por outro lado, não foram observadas diferenças significativas entre ACs e indivíduos não infectados ($p=0,161$). Contudo, dentre os ACs, quatro indivíduos apresentaram níveis de expressão de $IFN-\gamma$ muito abaixo dos valores observados nos demais indivíduos da pesquisa (Figura 19B), e que poderiam estar diminuindo a mediana calculada. Após a remoção destes dados, foi obtida significância estatística da diferença de expressão de $IFN-\gamma$ entre ACs e indivíduos não infectados ($p=0,003$, Teste de Mann-Whitney). Com o intuito de reduzir a influência de vieses na análise estatística, a remoção destes dados foi avaliada. Tal intervenção foi completamente descartada, pois se averiguou que os resultados derivavam de indivíduos com diferentes níveis de CPV, variando de 0,35% a 6,59%, e por isso não representavam indivíduos com características semelhantes.

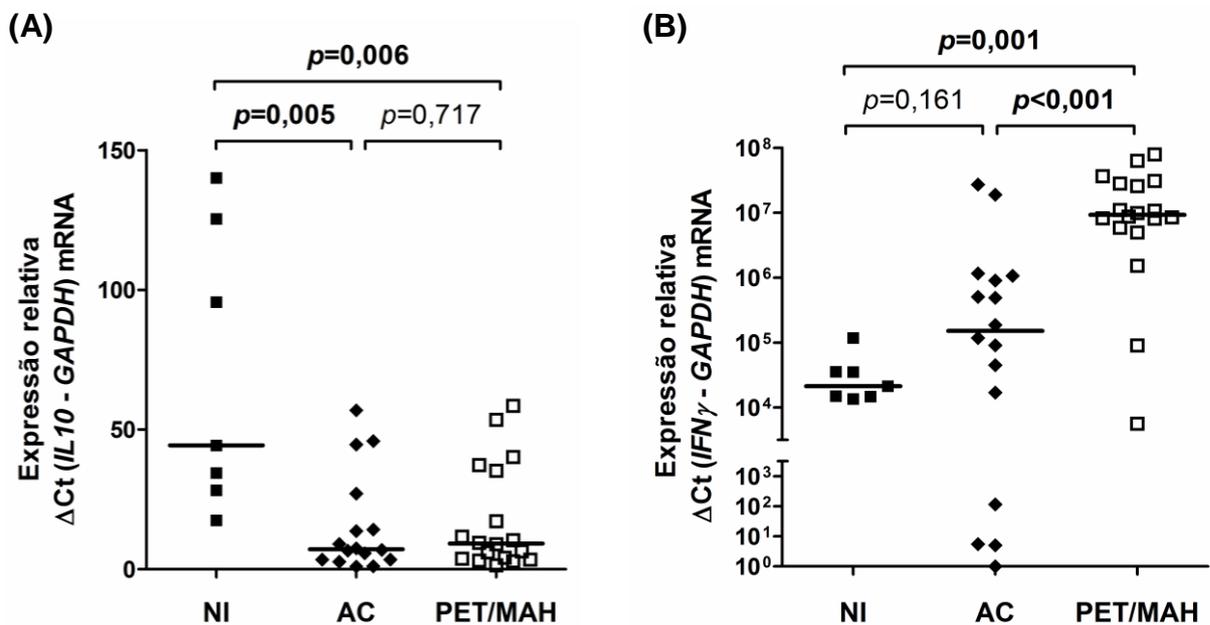


Figura 19. Expressão relativa de $IFN-\gamma$ e $IL-10$ por PBMCs de ACs e de pacientes com PET/MAH em comparação com indivíduos não infectados. A quantificação de mRNAs de $IFN\gamma$ e $IL10$ em PBMCs de indivíduos não infectados, ACs e pacientes com PET/MAH foi realizada após 20h de incubação. Os níveis de expressão relativa (A) de $IFN\gamma$ e (D) de $IL10$ foram determinados utilizando a variação entre os Ct da PCR em tempo real para os genes testados e os Ct de $GAPDH$ (ΔCt), que foi utilizado como referência. Posteriormente os valores de $\Delta Ct_{alvo-GAPDH}$ foram transformados de \log_2

para escala linear. O menor valor obtido na análise de cada gene foi considerado o normalizador, cuja expressão foi arbitrada como igual a 1. Foram considerados significativos $p < 0,05$ calculados pelo teste de Mann-Whitney.

Por sua vez, a diferença entre os níveis de expressão de IFN- γ e de IL-10 também foi avaliada. Uma vez que o desenvolvimento da PET/MAH está associado a processos inflamatórios, a expressão de IFN- γ foi considerada a variável-teste, enquanto a expressão de IL-10 foi definida como referência. Dessa forma, a diferença entre os níveis de expressão de IFN- γ e de IL-10 foram definidos pela fórmula: $\Delta Ct = (\text{média } Ct_{\text{IFN}\gamma} - \text{média } Ct_{\text{IL10}})$. Contudo, valores negativos nesta análise indicam maior expressão de IFN- γ frente à expressão de IL-10, pois o número de cópias de mRNAs e o Ct obtido na RT-PCR em tempo real são variáveis inversamente proporcionais. Por isso, para facilitar a compreensão dos resultados, os valores de $\Delta Ct(\text{IFN}\gamma - \text{IL10})$ foram convertidos para $-\Delta Ct$ (Figura 20). Foi observado que pacientes com PET/MAH expressaram, em média, mais IFN- γ do que IL-10 ($-\Delta Ct = 5,10$, ou seja, 34,30 vezes), enquanto ACs apresentaram níveis semelhantes de expressão de IFN- γ e de IL-10 ($-\Delta Ct = 0,27$, ou seja, 1,21 vezes). Por outro lado, indivíduos não infectados expressaram mais IL-10 do que IFN- γ ($-\Delta Ct = -6,61$, ou seja, 97,68 vezes). Contudo, somente foram significativas diferenças observadas entre o grupo de pacientes com PET/MAH e os grupos de ACs e de indivíduos não infectados (Figura 20).

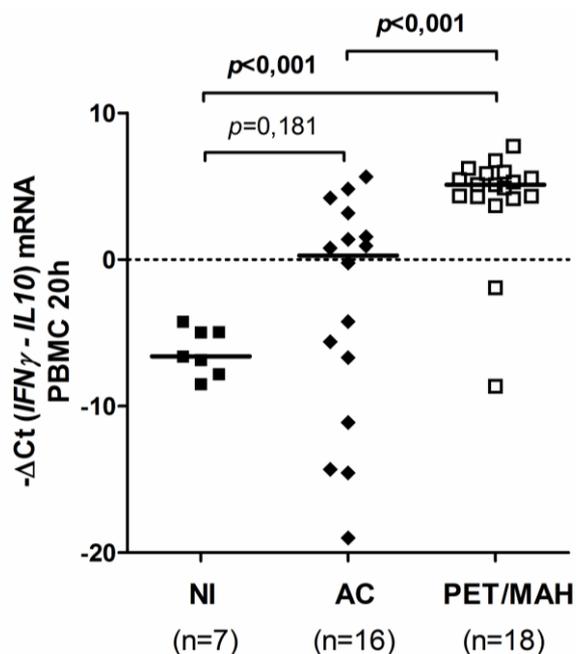


Figura 20. Variação entre a expressão de IFN- γ e de IL-10 em portadores assintomáticos do HTLV-1, pacientes com PET/MAH e indivíduos não infectados. A variação entre a expressão de mRNAs (Δ Ct) de IFN- γ e de IL-10 foi obtida pela subtração entre os Ct obtidos na quantificação destes dois genes (Δ Ct = média Ct IFN γ – média Ct IL10), e os valores estão apresentadas como - Δ Ct. A significância estatística foi determinada pelo teste de Mann-Whitney.

4.5. Correlação entre a expressão de *tax*, *HBZ*, *IL-10* e *IFN- γ* em PBMCs de ACs e de pacientes com PET/MAH com a carga proviral de HTLV-1:

A expressão de genes virais e de citocinas também foi avaliada em função da CPV de HTLV-1, que representa a proporção de células infectadas em leucócitos no sangue periférico. Foi observado que a expressão de mRNAs de *tax* correlacionou positivamente com a CPV apenas no grupo de pacientes com PET/MAH ($p<0,001$), enquanto a expressão do gene *HBZ* correlacionou positivamente com a CPV, independentemente do estado neurológico (Tabela 5).

Com relação à expressão de citocinas, não foi observada correlação entre a expressão de IL-10, que constitui uma citocina de caráter imunossupressor, e a CPV tanto em ACs ($p=0,115$) quanto em pacientes com PET/MAH ($p=0,313$) (Tabela 6). Por outro lado, a expressão da citocina pró-inflamatória IFN- γ , que é induzida em respostas imunes do tipo Th1, correlacionou positivamente com a CPV apenas em pacientes com PET/MAH ($p=0,002$) (Tabela 5).

Tabela 5. Correlação entre a expressão de *tax*, *HBZ*, *IL-10* e *IFN- γ* e a carga proviral de HTLV-1.

Gene	Amostra (N)	Coeficiente de correlação (R) ^a	p-valor
<i>tax</i>			
AC	18	0,337	0,172
PET/MAH	24	0,677	<0,001
Total	42	0,553	<0,001
<i>HBZ</i>			
AC	15	0,557	0,031
PET/MAH	20	0,803	<0,001
Total	35	0,655	<0,001
<i>IL-10</i>			
AC	16	-0,410	0,115
PET/MAH	18	0,313	0,207
Total	34	-0,009	0,958
<i>IFN-γ</i>			
AC	16	0,321	0,225
PET/MAH	18	0,682	0,002
Total	34	0,672	<0,001

NOTA. Os níveis de expressão gênica relativa de *tax*, *HBZ*, *IL10* e *IFN γ* foram correlacionados com a carga proviral de HTLV-1 em portadores assintomáticos (AC) e pacientes com paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1 (PET/MAH). Foram considerados significativos $p < 0,05$ determinados pelo Teste de Spearman.

^a R, coeficiente de correlação de Spearman.

4.6. Associação entre a expressão de IFN- γ e a condição neurológica de indivíduos infectados pelo HTLV-1 em função da carga proviral.

Uma vez que a expressão de IFN- γ correlacionou com a CPV de HTLV-1, que em altos níveis tem sido considerada fator de risco para o desenvolvimento da PET/MAH (Tabela 3A e 3B), a associação entre o estado inflamatório, definido pela

diferença entre os níveis de expressão de IFN- γ e de IL-10 [$-\Delta\text{Ct}(\text{IFN}\gamma - \text{IL}10)$], e a condição neurológica dos indivíduos infectados foi avaliada em função dos níveis de CPV. Para tal, ACs e pacientes com PET/MAH foram separados em dois grupos: um composto de indivíduos com CPV menor que 5%, e outro com CPV igual ou maior que 5%. Pacientes com PET/MAH e CPV<5% e ACs com CPV>5% apresentaram medianas de $-\Delta\text{Ct}(\text{IFN}\gamma - \text{IL}10)$ semelhantes, que tenderam a zero, indicando que os níveis de expressão de IFN- γ e IL-10 são equivalentes nestes dois grupos (Figura 21A). Por outro lado, pacientes com PET/MAH e CPV>5% expressaram níveis elevados de IFN- γ frente aos de IL-10, cuja mediana de $-\Delta\text{Ct}(\text{IFN}\gamma - \text{IL}10)$ foi estatisticamente superior a obtida em ACs com CPV<5% ($p=0,002$) que, por sua vez, expressaram baixos níveis de IFN- γ (Figura 21A). Dessa forma, a expressão elevada de IFN- γ em relação a IL-10 mostrou-se associada à condição neurológica dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 ($\chi^2 p=0,023$; OR=8,00), sendo observado que um indivíduo expressando mais IFN- γ do que IL-10 tem oito vezes mais chance de ser portador da PET/MAH do que AC (Figura 21B).

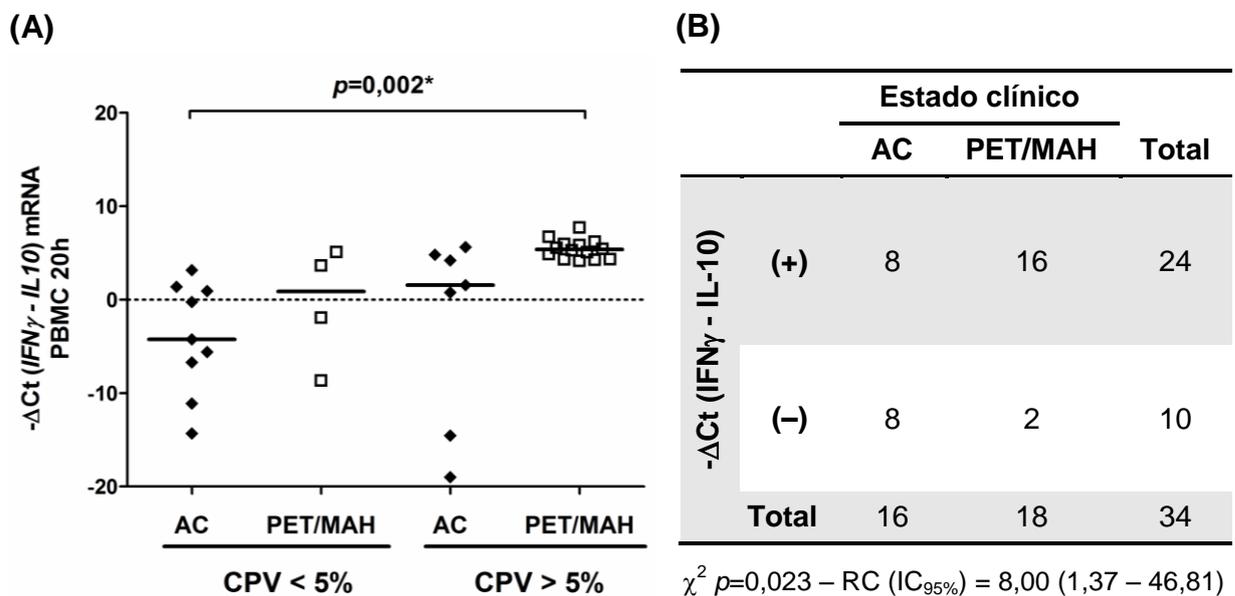


Figura 21. Associação entre a expressão de IFN- γ e o estado neurológico de indivíduos infectados pelo HTLV-1 em função da carga proviral. (A) Os indivíduos da pesquisa, tanto portadores assintomáticos (AC) quanto mielopatas (PET/MAH), foram divididos em dois grupos: um composto por indivíduos com CPV<5% e outro com CPV>5%, sendo comparadas as médias das diferenças de expressão entre IFN- γ e IL-10 [$\Delta\text{Ct} = (\text{Ct IFN}\gamma - \text{Ct IL}10)$], que estão apresentadas como $-\Delta\text{Ct}$. A significância estatística foi avaliada pelo teste *t* de Student, com correção de Welch onde

indicado por (*). **(B)** Posteriormente, foi verificada a associação entre $-\Delta Ct(\text{IFN}\gamma - \text{IL}10)$ e a condição neurológica dos indivíduos infectados pelo HTLV-1, em que valores positivos (+) indicam indivíduos em que a expressão de IFN- γ foi superior a de IL-10, enquanto valores negativos (-) indicam expressão de IFN- γ inferior a de IL-10. Diferenças significativas na distribuição dos resultados nos grupos de ACs e de pacientes com PET/MAH foram avaliadas pelo teste de qui-quadrado (χ^2).

4.7. Aspectos imunológicos dos indivíduos da pesquisa:

Continuando a caracterização dos indivíduos da pesquisa, alguns aspectos imunológicos foram avaliados, tais como leucometria e linfometria, cujos valores foram obtidos de hemogramas, assim como a contagem de células T CD4⁺, que foi definida por ensaios de citometria de fluxo. Foi observado que indivíduos não infectados apresentaram contagens absolutas de leucócitos maior que a de indivíduos infectados (HTLV-1 Total), e esta diferença se manteve estatisticamente significativa apenas em comparação com o grupo de pacientes com PET/MAH ($p < 0,05$) (Tabela 6). Apesar de não terem sido observadas diferenças significativas nas médias das frequências e das contagens absolutas de linfócitos no sangue periférico dos grupos avaliados (Tabela 6), indivíduos infectados pelo HTLV-1, ACs ou pacientes com PET/MAH, apresentaram média de frequência de células T CD4⁺ maior que a de indivíduos não infectados ($p < 0,01$). Contudo, esta diferença não se manteve significativa nas contagens absolutas (Tabela 6).

Tabela 6. Frequência e contagens absolutas de leucócitos e linfócitos.

Grupos	Leucometria (células/mm ³)	Linfócitos (%)	Linfócitos (células/mm ³)	Células T CD4 ⁺ (%)	Células T CD4 ⁺ (células/mm ³)
NI	7478 ± 1105 *	31,91 ± 6,56	2400 ± 625	38,89 ± 5,11	940 ± 316
AC	7154 ± 2555	31,58 ± 11,08	2067 ± 570	45,78 ± 7,74 **	949 ± 321
PET/MAH	6308 ± 1839 *	35,25 ± 9,83	2258 ± 941	46,73 ± 10,44 **	1080 ± 504
HTLV-1 total	6719 ± 2243 *	33,46 ± 10,55	2163 ± 782	46,30 ± 9,26 **	1015 ± 426

NOTA. NI, indivíduos saudáveis não infectados; AC, portadores assintomáticos; PET/MAH, Paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1. Valores em média ± desvio-padrão.

* Comparação entre NI × AC, NI × PET/MAH, NI × HTLV-1 total ($p < 0,05$ pelo Teste *t* de Student).

** $p < 0,01$, Teste *t* de Student com correção de Welch quando apropriado.

As células T CD4⁺ foram posteriormente avaliadas quanto à expressão de CD25 e CD127, que representam, respectivamente, as cadeias α de alta afinidade dos receptores de IL-2 e IL-7. Foi observado que ACs e indivíduos com PET/MAH apresentaram frequências de células T CD4⁺CD25⁺ mais elevadas que a de indivíduos não infectados, tanto percentualmente quanto em valores absolutos ($p < 0,05$) (Tabela 7). O mesmo foi observado quando a análise foi realizada no compartimento CD25^{high}, que é constituído por células com marcação mais intensa para CD25, conforme exemplificado na figura 14, e cujo fenótipo concentra a população de Tregs ($p < 0,05$) (Tabela 7). Quanto à frequência de células T CD4⁺ expressando baixos níveis de CD127 (-/low), não foram observadas diferenças significativas entre indivíduos infectados e não infectados pelo HTLV-1. Contudo, pacientes com PET/MAH apresentaram frequência aumentada de células T CD4⁺CD127^(-/low) em comparação com ACs ($p < 0,05$) (Tabela 7).

Tabela 7. Frequências e contagens de subpopulações de células T CD4⁺.

Grupos	CD4 ⁺ CD25 ⁺ (%)	CD4 ⁺ CD25 ⁺ (células/mm ³)	CD4 ⁺ CD25 ^{high} (%)	CD4 ⁺ CD127 ^{-/low} (%)
NI	26,78 ± 8,68	241,20 ± 77,31	1,58 ± 0,93	44,54 ± 6,04
AC	43,08 ± 12,30 *	417,20 ± 213,60 *	4,06 ± 2,93 *	45,49 ± 13,28
PET/MAH	46,78 ± 14,54 *	518,40 ± 337,80 *	4,79 ± 2,89 *	57,61 ± 12,76 **
HTLV-1 total	45,09 ± 13,61 *	468,50 ± 285,50 *	4,45 ± 2,09 *	52,14 ± 14,17

NOTA. NI, indivíduos não infectados; AC, portadores assintomáticos; PET/MAH, paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1; Células CD4⁺CD25^{high}, células com expressão mais intensa de CD25 na população de células T CD4⁺. Células CD4⁺CD25⁺CD127^{-/low}, percentual de células que expressam CD25 e baixos níveis de CD127 na população de células T CD4⁺. Valores em média ± desvio-padrão.

* Comparação entre NI × AC, NI × PET/MAH, NI × HTLV-1 total, $p < 0,05$ (Teste *t* de Student).

** Comparação entre AC × PET/MAH, $p < 0,05$ (Teste *t* de Student).

4.8. Caracterização de células T reguladoras em indivíduos infectados pelo HTLV-1.

As Tregs naturais (nTregs) são células T CD4⁺ caracterizadas por altos níveis de expressão de CD25 (CD25^{high}), baixa presença de CD127 (CD127^{-/low}) e pela expressão do fator de transcrição FoxP3 (Cools *et al.*, 2007; Workman *et al.*, 2009; Baecher-Allan *et al.*, 2011; DiCaro *et al.*, 2011). Dessa forma, para avaliar possíveis alterações do fenótipo das nTregs, e definir o melhor parâmetro de identificação destas células nos indivíduos infectados pelo HTLV-1, foram realizadas análises usando diferentes combinações dos marcadores citados anteriormente.

Inicialmente, a frequência de células FoxP3⁺ foi avaliada exclusivamente na população de células T CD4⁺. Considerando todos os indivíduos incluídos no estudo (12 NI, 38 ACs e 45 pacientes com PET/MAH), não foram observadas diferenças significativas na frequência de células T CD4⁺FoxP3⁺ entre os grupos de indivíduos infectados e não infectados (Figura 22). Contudo, a frequência destas células em ACs e em pacientes com PET/MAH com alta CPV (>5%) se mostrou aumentada em comparação tanto com os indivíduos saudáveis quanto com indivíduos infectados com baixos níveis de CPV (<5%), independentemente do acometimento neurológico (Figura 22), demonstrando que o grau de comprometimento com a infecção influencia a frequência de células T CD4⁺FoxP3⁺.

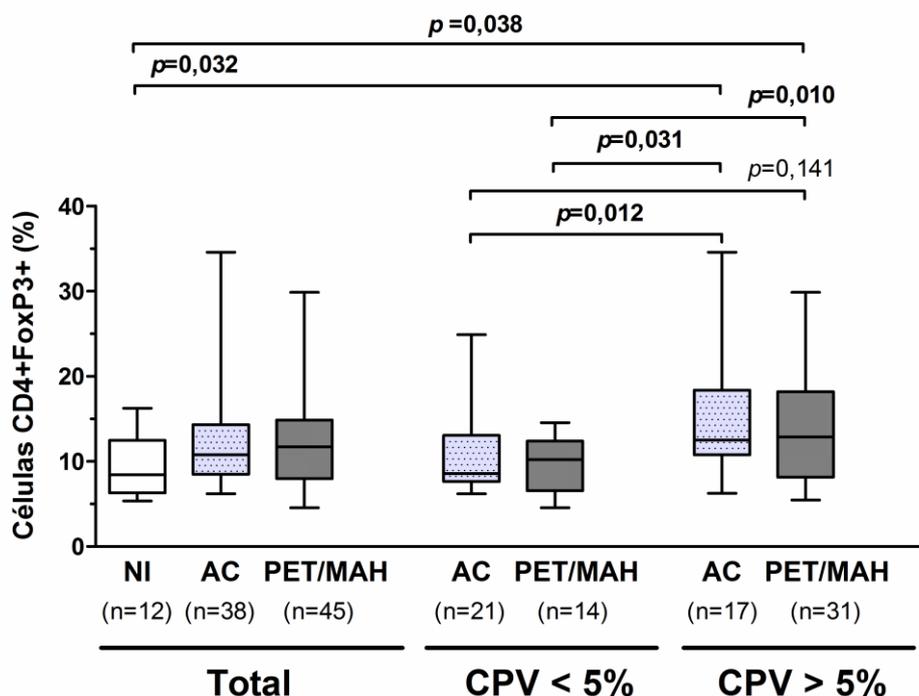


Figura 22. Frequência de células T CD4⁺FoxP3⁺ em indivíduos não infectados, portadores assintomáticos de HTLV-1 e em pacientes com PET/MAH. A frequência de células FoxP3⁺ na população de células T CD4⁺ foi avaliada em indivíduos não infectados (NI), portadores assintomáticos de HTLV-1 (AC) e pacientes com PET/MAH. Os dados obtidos em ACs e em pacientes com PET/MAH também foram estratificados de acordo com a carga proviral (CPV<5% e CPV>5%) para avaliar a influência da infecção na frequência destas células. A significância estatística foi calculada utilizando o teste de Mann-Whitney.

4.8.1. Papel da expressão de CD25 na caracterização de Tregs em indivíduos infectados pelo HTLV-1.

Resultados contraditórios foram obtidos durante a análise da expressão de FoxP3 em subpopulações de células T CD4⁺CD25⁺. Em indivíduos não infectados, a expressão de FoxP3 foi altamente concentrada na subpopulação de células T CD4⁺CD25^{high} ($93,87 \pm 3,99\%$) (Figura 23), embora estas células tenham representado, em média, somente $1,5 \pm 0,8\%$ dos linfócitos T CD4⁺ de sangue periférico (Tabela 7). Apesar de ACs e pacientes com PET/MAH terem apresentado frequências elevadas de células T CD4⁺CD25^{high} ($4,5 \pm 3,1\%$ e $4,6 \pm 2,9\%$, respectivamente) em comparação com indivíduos não infectados (Tabela 7), este aumento não foi acompanhado por um incremento da expressão de FoxP3. ACs e

pacientes com PET/MAH apresentaram frequências reduzidas de células FoxP3⁺ na população de células T CD4⁺CD25^{high} (67,66 ± 15,86% e 58,46 ± 15,17%, respectivamente), quando comparados com indivíduos não infectados (Figura 23). Além disso, a análise da expressão de FoxP3 em subpopulações de células T CD4⁺, considerando os níveis de expressão de CD25, permitiu definir que as diferenças nas frequências de células FoxP3⁺ entre indivíduos infectados e não infectados se restringiram às populações com alto teor de expressão de CD25, sendo significativas até o conjunto de células que representavam 5% com maior intensidade de expressão de CD25 (CD25 top 5%) (Figura 23).

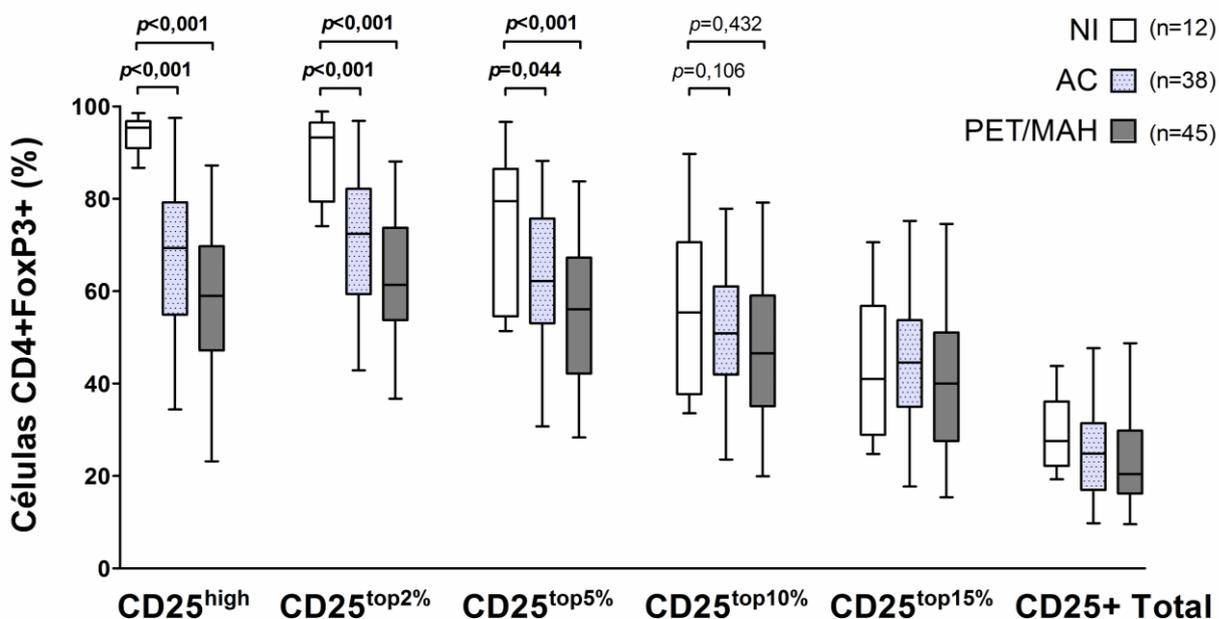


Figura 23. Frequência de células T CD4⁺FoxP3⁺ de acordo com a intensidade de expressão de CD25. A expressão de FoxP3 foi avaliada em diferentes subpopulações de células T CD4⁺CD25⁺ nos indivíduos não infectados (NI), portadores assintomáticos de HTLV-1 (AC) e pacientes com PET/MAH, que foram definidas de acordo com a intensidade de expressão de CD25: CD25⁺ total, células CD4⁺CD25^{high}, células CD4⁺CD25⁺ top 2%, 5%, 10% e 15% mais brilhantes de acordo com a intensidade de fluorescência, como exemplificado na figura 14. Diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste *t* de Student, e foram considerados significativos resultados com $p < 0,05$.

Dessa forma, a expressão de CD25 parece interferir com a definição fenotípica clássica de Tregs (Células T CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺) em indivíduos infectados pelo HTLV-1. Provavelmente, esta redução na frequência de células FoxP3⁺ na população de células T CD4⁺CD25^{high} parece decorrer de dois

fenômenos observados em células T CD4⁺ destes indivíduos: (i) a elevação da expressão global de CD25 (Tabela 7) e, conseqüentemente, o aumento da frequência de células T CD4⁺CD25⁺FoxP3⁽⁻⁾ (Tabela 8); e (ii) a expressão de CD25 em maior intensidade a nível celular na população de células T CD4⁺FoxP3⁽⁻⁾, avaliada por comparação dos valores médios de mediana de intensidade de fluorescência (MFI), que corrobora o aumento da frequência de células T CD4⁺CD25^{high} (Tabela 8). Conforme esperado, os níveis de MFI da expressão de CD25 em células T CD4⁺FoxP3⁺ foram superiores aos de células T CD4⁺FoxP3⁽⁻⁾ (Tabela 8), confirmando que Tregs expressam níveis elevados de CD25 em comparação com células T convencionais. Além disso, foi observado que o aumento da expressão de CD25 por células T CD4⁺ sofre influencia do grau de comprometimento com a infecção, pois correlacionou positivamente com a CPV tanto em ACs quanto em pacientes com PET/MAH (Figura 24).

Tabela 8. Expressão de CD25 em células T CD4⁺FoxP3⁺ e CD4⁺FoxP3⁽⁻⁾.

Grupos	Células T CD4 ⁺ FoxP3 ⁺		Células T CD4 ⁺ FoxP3 ⁽⁻⁾	
	CD25 ⁺ (%)	CD25 ⁺ (MFI)	CD25 ⁺ (%)	CD25 ⁺ (MFI)
NI	77,73 ± 4,57	36,46 ± 9,75	20,51 ± 7,25	13,36 ± 0,47
AC	85,01 ± 6,71	51,26 ± 13,10	40,14 ± 11,81 *	20,82 ± 6,48 *
PET/MAH	85,90 ± 6,69	45,65 ± 9,52	43,77 ± 17,29 *	22,79 ± 6,82 *

NOTA. NI, indivíduos saudáveis não infectados; AC, portadores assintomáticos; PET/MAH, paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1; MFI, mediana de intensidade de fluorescência. Valores em média ± desvio-padrão. Foram realizadas as comparações entre: NI × AC, NI × PET/MAH, e AC × PET/MAH, e a significância estatística foi avaliada pelo teste *t* de Student. Foram considerados significativos $p < 0,05$ (*).

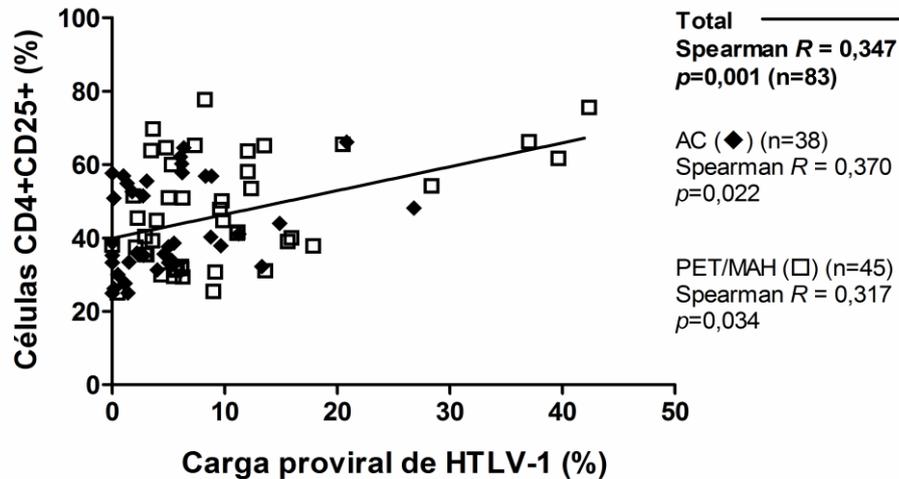
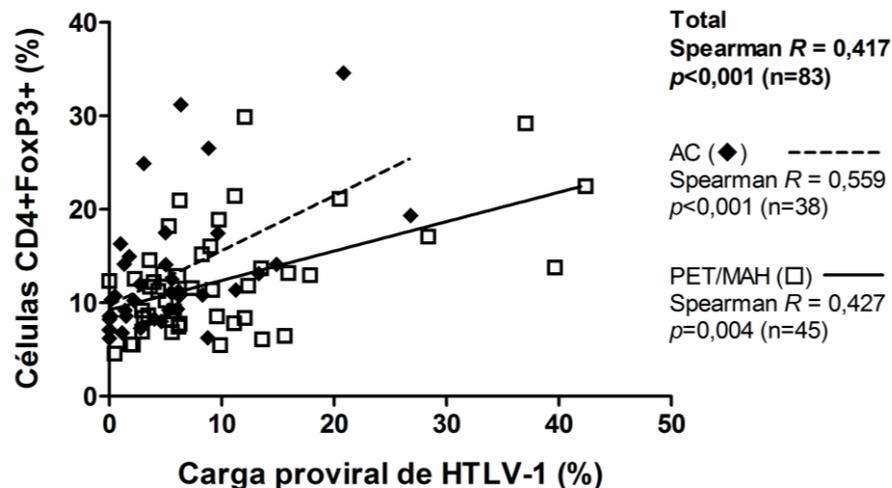


Figura 24. Correlação entre a expressão de CD25 em células T CD4⁺ e a carga proviral de HTLV-1. Foram avaliados os resultados de 38 portadores assintomáticos (AC) e 45 pacientes com PET/MAH. Foram considerados significativos $p < 0,05$ calculados pelo teste de Spearman.

As frequências de células T CD4⁺FoxP3⁺ e de células T CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ também correlacionaram com a CPV nos indivíduos infectados (Figura 25). Enquanto a frequência de células T CD4⁺FoxP3⁺ correlacionou positivamente com a CPV de HTLV-1 em ACs e em pacientes com PET/MAH (Figura 25A) ($p < 0,001$ e $p = 0,004$, respectivamente), a frequência de células T CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ correlacionou negativamente com a CPV, sendo significativa apenas no grupo de ACs ($p = 0,001$) (Figura 25B).

(A)



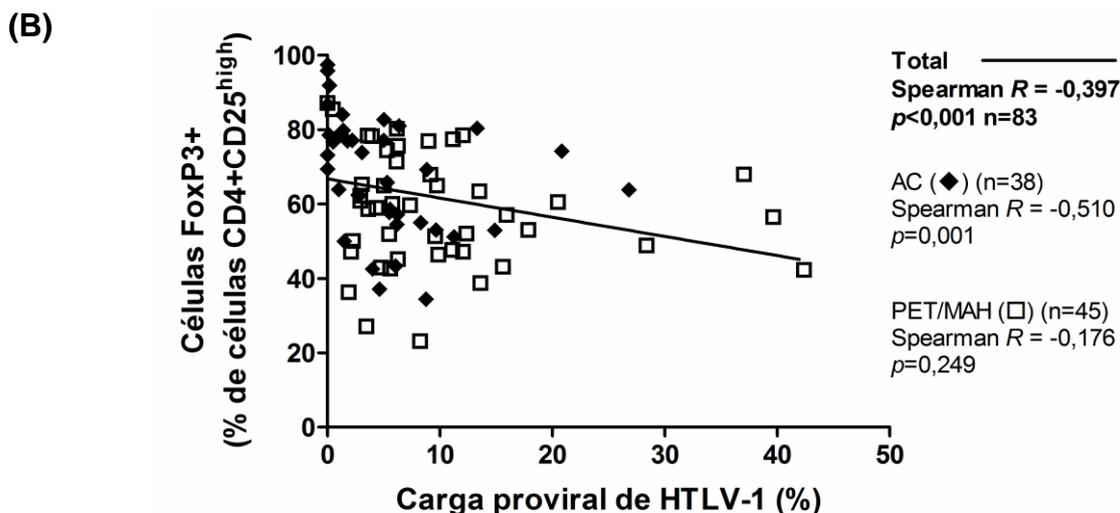
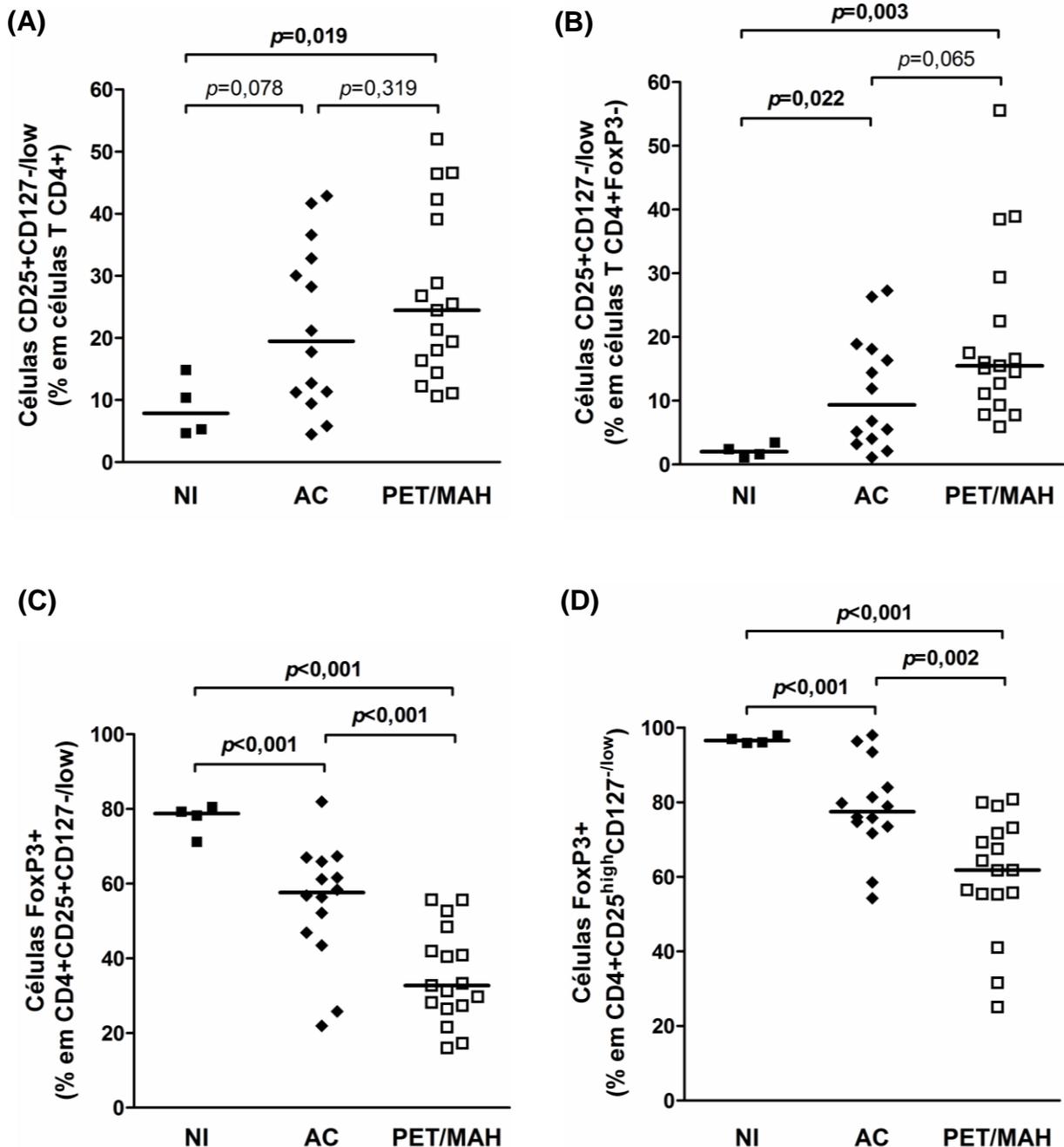


Figura 25. Correlação entre as frequências de células T $CD4^+FoxP3^+$ (A) e de células T $CD4^+CD25^{high}FoxP3^+$ (B) e a carga proviral de HTLV-1. Foram avaliados os resultados de 38 portadores assintomáticos (AC) e 45 pacientes com PET/MAH. Foram considerados significativos $p < 0,05$ calculados pelo teste de Spearman.

4.8.2. Papel da expressão de CD127 na identificação de Tregs em indivíduos infectados pelo HTLV-1.

Por fim, para avaliar que parâmetros são mais adequados à caracterização das nTregs em indivíduos infectados pelo HTLV-1, foi realizada a análise da expressão de CD127, pois tem sido demonstrado que as nTregs podem ser caracterizadas como células T $CD4^+CD25^+CD127^{-/low}$ (Hartigan-O'Connor *et al.*, 2007). Em comparação com indivíduos saudáveis, indivíduos com PET/MAH apresentaram frequência aumentada de células T $CD4^+CD25^+CD127^{-/low}$ ($p = 0,019$) (Figura 26A). Em seguida, a frequência das células T $CD25^+CD127^{-/low}$ foi avaliada na população de células T $CD4^+FoxP3^{(-)}$, para excluir da análise aquelas que poderiam representar Tregs. Foi possível demonstrar que em indivíduos infectados, independente da condição neurológica, células T $CD25^+CD127^{-/low}$ se encontravam em frequências elevadas na população $CD4^+FoxP3^{(-)}$, em comparação com indivíduos não infectados (Figura 26B). Além disso, nestes indivíduos não infectados foi observado que a maioria das células T $CD4^+CD25^+CD127^{-/low}$ expressavam FoxP3 (Figura 26C). Contudo, como também observado na população de células T

CD4⁺CD25^{high}, a frequência de células FoxP3⁺ nas populações de células T CD4⁺CD25⁺CD127^{-/low} (Figura 26C) ou CD4⁺CD25^{high}CD127^{-/low} (Figura 26D) foi reduzida tanto em ACs quanto em pacientes com PET/MAH. Dessa forma, tornou-se evidente que a redução da frequência de células T FoxP3⁺ nesta população de células T CD4⁺CD25⁺CD127^{-/low} foi decorrente de uma diluição de células FoxP3⁺ nesta população aumentada de células T CD4⁺CD25⁺CD127^{-/low}FoxP3⁽⁻⁾.



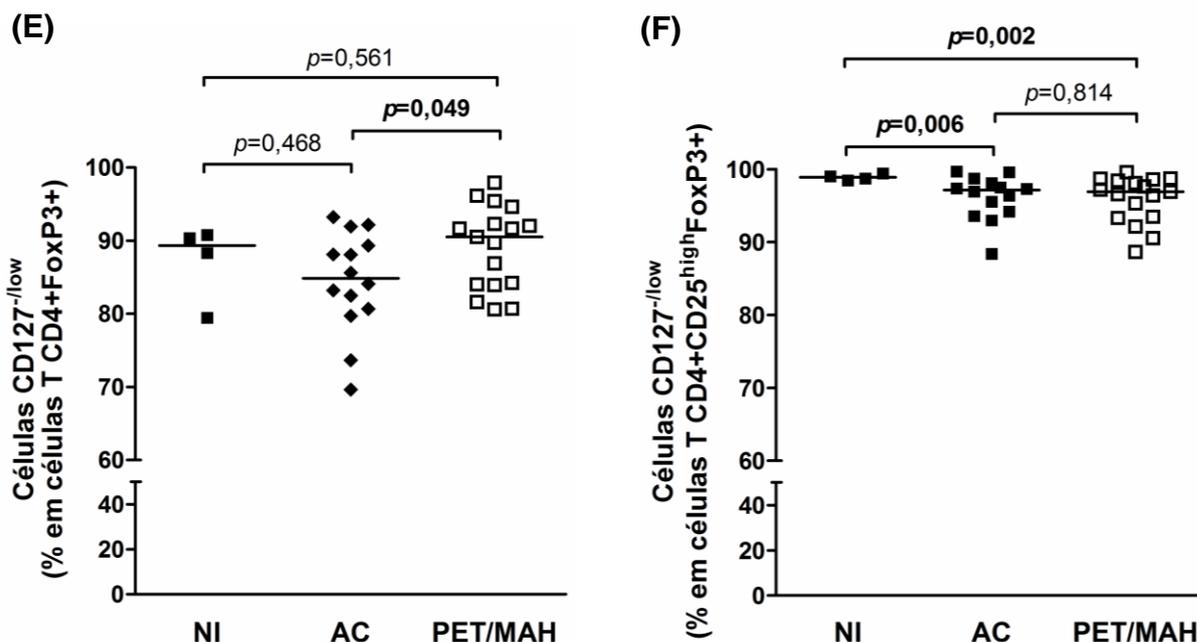


Figura 26. Determinação de subpopulações de células T CD4⁺ pela expressão de CD127. A frequência de células CD25⁺CD127^{-low} foi analisada na população de **(A)** células T CD4⁺ e de **(B)** células T CD4⁺FoxP3⁽⁻⁾ de indivíduos não infectados (NI), ACs e pacientes com PET/MAH. Posteriormente, a expressão de FoxP3 foi avaliada nas populações de **(C)** células T CD4⁺CD25⁺CD127^{-low} e de **(D)** células T CD4⁺CD25^{high}CD127^{-low}. A frequência de células T CD127^{-low} foi avaliada nas populações de **(E)** células T CD4⁺FoxP3⁺ e de **(F)** células T CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺. Diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste *t* de Student, e foram considerados significativos $p < 0,05$.

Por outro lado, células CD127^{-low} foram predominantes na população de células T CD4⁺FoxP3⁺, como esperado, tanto em indivíduos saudáveis quanto em infectados pelo HTLV-1, sendo observadas frequências médias superiores a 84% (Figura 26E). Esta característica se manteve mesmo após a inclusão de CD25 na análise, cujos resultados corroboraram os dados anteriores, confirmando que células T CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ também são caracterizadas como CD127^{-low}, tanto em indivíduos não infectados quanto em portadores da infecção pelo HTLV-1 (Figura 26F). Com isso, foi evidenciado que nem todas as células T CD4⁺CD25^{high}CD127^{-low} nos indivíduos infectados expressam FoxP3. Por outro lado, a maioria das células T CD4⁺FoxP3⁺ se apresentam como CD25⁺ (Tabela 8) e CD127^{-low} (Figura 26E). Dessa forma, a detecção de FoxP3 em células T CD4⁺ parece, isoladamente, ser o melhor marcador de Tregs nos indivíduos infectados pelo HTLV-1.

4.9. Frequência de Tregs em indivíduos infectados pelo HTLV-1.

Após definir a melhor forma de caracterizar e identificar as nTregs, a frequência destas células em indivíduos infectados pelo HTLV-1 foi avaliada em comparação com indivíduos não infectados. Conforme previamente apresentado na figura 22A, não foram observadas diferenças na frequência de células T CD4⁺FoxP3⁺ entre indivíduos não infectados e infectados pelo HTLV-1. Por outro lado, diferenças significativas foram observadas quando avaliados ACs e pacientes com PET/MAH com CPV elevada (>5%) (Figura 22B). Posteriormente, também foram avaliadas as contagens absolutas de Tregs, que foram definidas a partir das contagens de células T CD4⁺. Da mesma forma, somente foram observadas diferenças significativas quando avaliados os resultados de indivíduos infectados com altos níveis de CPV (Figura 27). Alguns indivíduos (3 ACs e 4 pacientes com PET/MAH) apresentaram contagens de Tregs acima de 300 células/mm³ e, por isso, poderiam estar artificialmente propiciando significância estatística à diferença das medianas obtidas. Contudo, a retirada destes dados não alterou a significância dos resultados observados, conforme calculado pelo teste de Mann-Whitney, tanto entre indivíduos não infectados e ACs ($p=0,025$) quanto entre indivíduos não infectados e pacientes com PET/MAH ($p=0,036$). Dessa forma, estes resultados confirmam que indivíduos infectados pelo HTLV-1 com CPV alta (>5%), independentemente do estado neurológico, apresentam número elevado de Tregs, definidas como células T CD4⁺FoxP3⁺, no sangue periférico em comparação com indivíduos não infectados.

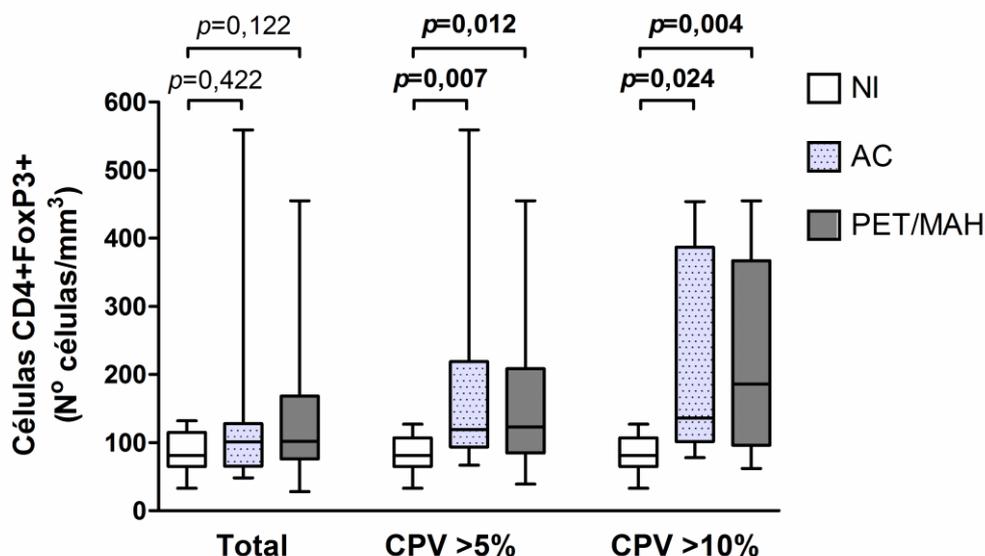


Figura 27. Contagens de Tregs em indivíduos infectados pelo HTLV-1. O número de células FoxP3+ por mm^3 de sangue periférico foi determinada na população de células T CD4^+ de indivíduos não infectados (NI), ACs, e pacientes com PET/MAH. Os dados obtidos em ACs e pacientes com PET/MAH foram estratificados de acordo com a carga proviral de HTLV-1 (CPV>5% e CPV>10%) para avaliar a influência da infecção em relação ao número de Tregs. *P* valores foram determinados pelo teste de Mann-Whitney.

5. DISCUSSÃO:

Desde a identificação do HTLV-1 em 1980, pelo grupo de pesquisa de Robert Gallo, até a sua associação com o desenvolvimento da PET/MAH em 1985, que foi demonstrada por Gessain *et al.* (1985) no Caribe, e por Osame e colaboradores no Japão (Izumo, 2010), eventos de interação vírus-célula e da dinâmica desta infecção vêm sendo elucidados.

A PET/MAH se apresenta como uma paraparesia espástica, com dor lombar, hiperreflexia e alterações urinárias. De modo geral, estes sintomas apresentam início insidioso, e evoluem de forma progressiva e lenta, podendo causar perda total dos movimentos nos membros inferiores, ou diferentes níveis de incapacidade motora (Araújo & Silva, 2006; Izumo, 2010). Contudo, a maioria dos indivíduos infectados por HTLV-1 permanece assintomática ao longo da vida, e a evolução para a PET/MAH é observada em somente 0,5 a 5% dos casos (Gessain *et al.*, 1985; Osame *et al.*, 1986; Nagai & Osame, 2003; Araújo & Silva, 2006). Portanto,

tem sido de grande importância a descrição de marcadores que auxiliem na identificação de indivíduos infectados que apresentem maior chance de desenvolver acometimento neurológico. Dessa forma, a detecção precoce destes indivíduos possibilitaria um melhor acompanhamento clínico, assim como a tomada de decisão para o início de medidas terapêuticas, visando retardar a evolução da doença. Com isso, neste estudo foram avaliados alguns parâmetros da resposta imune e da dinâmica da infecção por HTLV-1, tais como a CPV, o padrão de integração do DNA proviral e a frequência de clones infectados persistentes, os níveis de expressão dos genes virais *tax* e *HBZ* e dos genes das citocinas IFN- γ e IL-10, além da frequência de Tregs, como possíveis marcadores biológicos de doença neurológica.

O desenvolvimento da PET/MAH pode ser dividido em duas etapas, sendo inicialmente observada inflamação, acompanhada de perda da integridade da barreira hematoencefálica, com conseqüente aumento da migração de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ para o SNC, que é seguida de um estágio de desmielinização, que atinge principalmente o segmento torácico da medula espinhal (Araújo & Silva, 2006; Lepoutre *et al.*, 2009). Contudo, o evento ou mecanismo que promove o desequilíbrio do estado assintomático e inicia o desenvolvimento da PET/MAH ainda é desconhecido. Diferentes hipóteses têm sido propostas para explicar esta desmielinização e morte de células na medula espinhal de indivíduos infectados pelo HTLV-1. A teoria melhor aceita atualmente propõe que a reação inflamatória desencadeada pelo reconhecimento de células T infectadas por CTLs, no SNC, promove a liberação de citocinas proinflamatórias, tais como o TNF- α , induzindo a morte celular por apoptose, provocando indiretamente a lesão medular (Hollsberg & Hafler, 1992; Araújo & Silva, 2006; Ollière *et al.*, 2011). Contudo, existe um grande intervalo de tempo entre o momento da infecção e o desenvolvimento de doenças, que varia de 20 a 30 anos (Araújo & Silva, 2006). Por isso, o tempo de seguimento clínico dos indivíduos da pesquisa representou uma importante variável, principalmente entre os ACs, que estavam sendo acompanhados há $12,3 \pm 3,5$ anos, em média, permitindo assim uma maior segurança na afirmação de ausência de alterações neuro-hematológicas nestes indivíduos.

Com relação à distribuição dos gêneros dos indivíduos incluídos no estudo, foi verificado que, diferentemente dos grupos de ACs e de indivíduos não infectados,

que apresentaram proporções semelhantes entre homens e mulheres (1:0,7 e 1:1,4, respectivamente), no grupo de pacientes com PET/MAH foi observada uma frequência aproximadamente três vezes maior de mulheres. Uchiyama (1997) descreveram que a PET/MAH é 2,9 vezes mais frequente nas mulheres em comparação aos homens, e que a manifestação desta doença ocorre, em média, aos 43 anos de idade. Nossos dados também foram corroborados pela descrição de Uchiyama (1997), pois pacientes com PET/MAH apresentaram uma média de idade de $56,6 \pm 12,6$ anos, com média de $14,0 \pm 8,1$ anos de duração da doença, resultando em uma idade média de início de sintomas de 42,6 anos. Por isso, neste estudo, deve-se considerar que a interpretação dos resultados de pacientes com PET/MAH está relacionada a estágios crônicos da doença.

Tem sido demonstrado que indivíduos com PET/MAH apresentam CPV de HTLV-1 mais elevada que ACs (Silva *et al.*, 2007). Assim, a CPV em altos níveis tem sido proposta como um fator de risco para o desenvolvimento da PET/MAH (Bangham *et al.*, 2009), e como um importante marcador para o acompanhamento da evolução nos indivíduos infectados. Em um estudo realizado por nosso grupo de pesquisa, avaliando a CPV como método preditivo da PET/MAH pela elaboração de uma curva ROC, verificou-se que a CPV de 4,5% representou o melhor ponto de corte para discriminar ACs e pacientes com PET/MAH (Greffin, 2010). Corroborando estes dados, observamos que pacientes com CPV superior a 5% tiveram 2,74 vezes mais chance de apresentar PET/MAH, e esta probabilidade se elevou proporcionalmente aos níveis de CPV.

A CPV em um dado indivíduo infectado pelo HTLV-1 tende a permanecer estável ao longo do tempo, sendo mantida principalmente pela proliferação de células T CD4⁺ infectadas (Bangham & Osame, 2005). Contudo, os níveis de CPV entre indivíduos podem variar consideravelmente, sendo observadas variações superiores a 1000 vezes. Além disso, níveis elevados de CPV têm sido associados à proliferação oligoclonal de células T infectadas, sendo possível a identificação de grandes populações clonais no sangue periférico (Bangham *et al.*, 2009; Cook *et al.*, 2012), como confirmado por nossos resultados com a IL-PCR. Contudo, tem sido descrito que a maioria dos clones infectados por HTLV-1 apresenta um único provírus (Cook *et al.*, 2012) e que, de acordo com o sítio de integração, podem ser

identificadas mais de 10.000 diferentes populações clonais infectadas (Gillet *et al.*, 2011). Tanto em ACs quanto em pacientes com PET/MAH observamos predominantemente padrões estocásticos de integração proviral, em que o rastro de amplificação gerado pela IL-PCR se refere à detecção de clones minoritários, corroborando os resultados descritos por Gillet *et al.* (2011). Também observamos clones infectados predominantes tanto em ACs quanto em pacientes com PET/MAH, que foram capazes de persistir ao longo do tempo (média de 36,4 meses), conforme descrito por Cavrois *et al.*, (1998). Contudo, em nosso estudo, observamos que estas populações clonais predominantes se apresentaram em maior frequência nos pacientes com PET/MAH.

Na infecção pelo HTLV-1, tem sido demonstrado que a abundância de clones infectados e o nível de expressão viral podem ser influenciados por características do genoma celular adjacente ao sítio de integração do provírus (Zoubak *et al.*, 1994; Gillet *et al.*, 2011). Gillet *et al.* (2011) demonstraram que células expressando genes virais sofrem uma forte seleção imunológica negativa durante a fase crônica da infecção. Este processo influenciaria a frequência de clones infectados, sendo significativamente mais intenso em ACs do que em pacientes com PET/MAH, sugerindo que ACs apresentariam mecanismos de imunidade anti-HTLV-1 mais efetivos. Dessa forma, a expressão de produtos virais como proteínas Tax e HBZ influenciaria tanto a proliferação e manutenção de células infectadas quanto a sua exposição à eliminação por CTLs. Por isso, Gillet *et al.* (2011) têm sugerido que a integração do HTLV-1 em regiões genômicas silenciadas poderia favorecer a persistência de células infectadas, devido a baixa expressão do provírus, permitindo o escape da resposta imune.

Com isso, nossos resultados sugerem que a frequência elevada de clones predominantes deve contribuir para níveis mais elevados de CPV comumente observados em pacientes com PET/MAH. Além disso, a persistência destas populações celulares infectadas poderia atuar como um estímulo constante para intensa e crônica resposta de CTLs específicos para HTLV-1 presente em indivíduos infectados (Kannagi *et al.*, 1991; Daenke *et al.*, 1996; Kattan *et al.*, 2009), em função da expressão persistente de antígenos virais, mesmo que em pequenas concentrações.

De fato, observamos que a expressão gênica viral *in vivo* ocorre em baixos níveis. Células mononucleares de pacientes com PET/MAH apresentaram maior expressão de *tax* em comparação com ACs. Contudo, os níveis de mRNAs de *tax* foram cerca de 10.000 a 100.000 vezes menor que os níveis basais de transcrição celular, conforme definido pela expressão de *GAPDH*. Por outro lado, a incubação destas células por 20h, na ausência de estímulos mitogênicos, foi capaz de estimular a expressão proviral, conforme descrito por Hanon *et al.* (2000a). Apesar da expressão de *tax* por PBMCs *in vitro* ter apresentado um aumento de 10.000 a 100.000 vezes em comparação com os níveis observados *ex vivo*, a diferença de expressão entre ACs e pacientes com PET/MAH desapareceu. Dessa forma, enquanto a expressão de mRNAs de *tax* por PBMCs *ex vivo* correlacionou positivamente com a CPV, independentemente do estado clínico dos indivíduos infectados, *in vitro* a correlação somente foi observada em pacientes com PET/MAH. Por isso, abstrações quanto aos níveis de expressão proviral de HTLV-1 *in vitro* para possíveis cenários *in vivo* devem ser realizadas com cautela.

Também observamos que a expressão de *HBZ* correlacionou positivamente com a CPV. Contudo, foram avaliadas somente as isoformas de mRNAs de *HBZ* resultantes de *splicing* que, de acordo com Usui *et al.* (2008), são mais abundantes e se apresentam numa proporção quatro vezes maior do que a forma sem *splicing*. Além disso, estes mRNAs são traduzidos em proteínas com maior tempo de meia-vida (Yoshida *et al.*, 2008). Observamos que pacientes com PET/MAH expressaram níveis de Tax e HBZ ligeiramente mais elevados que ACs (4,5 e 3,0 vezes, respectivamente). Porém, diferenças significativas não foram obtidas devido a grande variação observada na expressão destes genes entre os indivíduos, provavelmente, em função da extensa variação de CPV. Também, não foram observadas diferenças nas taxas de expressão de *tax* e de *HBZ* entre ACs e indivíduos com PET/MAH.

Tem sido descrito que HBZ compete com Tax pela ligação aos fatores de transcrição CREB (Lemasson *et al.*, 2007), CREB-2 (Gaudray *et al.*, 2002), e as subunidades c-Jun e JunB do fator de transcrição AP-1 (Basbou *et al.*, 2003; Matsumoto *et al.*, 2005) através do seu domínio bZIP, diminuindo o efeito de Tax sobre os promotores da 5'-LTR de HTLV-1, e conseqüentemente reduzindo os níveis

de expressão viral (Gaudray *et al.*, 2002; Arnold *et al.*, 2006). Esta dualidade entre as atividades de Tax e HBZ é corroborada pela cinética de expressão destes genes. Conforme demonstrado por Barbeau & Mesnard (2011) pela análise *in vitro* de células T CD4⁺ de pacientes com PET/MAH, foi observado que mRNAs de *tax* são espontaneamente expressos, sendo detectados em seu nível máximo após 24h. Por outro lado, a expressão de transcritos de *HBZ* se elevou somente após 24h de cultivo das células infectadas, atingindo o platô com 48h de incubação. Dessa forma, é provável que a transcrição da fita senso, especialmente estimulada pela proteína Tax, contribua para manter a expressão da fita anti-senso em baixos níveis (Barbeau & Mesnard, 2011). Por outro lado, quando a expressão de Tax é reduzida por diferentes mecanismos, a transcrição anti-senso é favorecida (Usui *et al.*, 2008). Assim sendo, é provável que a grande diferença que encontramos entre os níveis de expressão de *tax* e *HBZ*, tanto em ACs quanto em pacientes com PET/MAH, provavelmente, se deu em função do curto período de incubação (20h) das culturas de PBMCs.

A infecção por HTLV-1 é capaz de induzir a ativação constitutiva de NF- κ B e de outras vias de sinalização celular. Este fato tem sido diretamente demonstrado e corroborado pela expressão aumentada de diversas citocinas e seus respectivos receptores nas células infectadas, como por exemplo, da IL-2 e de CD25 (Ballard *et al.*, 1988; Boxus *et al.*, 2008). Embora tenha sido descrito que HTLV-1 seja capaz de infectar diferentes tipos celulares *in vivo* e *in vitro*, tem sido demonstrado que a infecção produtiva é observada com maior eficiência nos linfócitos T CD4⁺ (Koyanagi *et al.* 1993; Ghez *et al.*, 2010), principalmente em células de memória, que proliferam em taxas mais elevadas (Asquith *et al.*, 2007).

Apesar dos indivíduos infectados avaliados neste estudo terem apresentado contagens de leucócitos e de linfócitos no sangue periférico inferiores às observadas em indivíduos não infectados, a proporção média de células T CD4⁺ na população de linfócitos foi significativamente maior nos indivíduos infectados, independentemente da condição neurológica. Dessa forma, estes dados confirmam que a população de células T CD4⁺ nos indivíduos infectados prolifera em taxas mais elevadas do que em indivíduos não infectados. Provavelmente, este processo está relacionado à infecção, como pode ser observado pelas frequências elevadas

de células T CD4⁺CD25⁺ que se correlacionam com a CPV, tanto em ACs como em pacientes com PET/MAH.

Enquanto a expressão de *tax* e *HBZ* parece influenciar a proliferação e sobrevivência das células infectadas, além da sua susceptibilidade às respostas do sistema imune, a expressão de citocinas exerce papel central na regulação dos mecanismos de imunidade nos processos infecciosos. Tem sido descrito que a infecção por HTLV-1 é caracterizada por uma forte resposta do tipo Th1, capaz de reprimir o estabelecimento de perfis inflamatórios do tipo Th2, como demonstrado nas coinfeções com *Strongyloides stercoralis*, em que se observa a redução nos níveis de IL-5 e IgE (Porto *et al.*, 2001). Este fato também é corroborado pela elevada secreção *in vitro* de IL-2 e IFN- γ por PBMCs de pacientes com PET/MAH em comparação com ACs (Carvalho *et al.*, 2001). O IFN- γ representa uma citocina de caráter pró-inflamatório, sendo secretado principalmente por células T CD4⁺ do tipo Th1 e células T CD8⁺ efectoras (Janeway *et al.*, 2001). Na infecção por HTLV-1, foi demonstrado que esta produção de IFN- γ deriva principalmente de células T CD4⁺, uma vez que a depleção de células T CD8⁺ e de células *natural killer* (NK) da população de células mononucleares não afeta a detecção *in vitro* desta citocina (Carvalho *et al.*, 2001). De fato, Mitre *et al.* (2003) demonstraram que a frequência de células T CD4⁺IFN- γ ⁺ é maior em pacientes com PET/MAH e correlaciona com a CPV, apesar de não ter sido observada ligação direta com a expressão de Tax. Por outro lado, não têm sido evidenciadas diferenças nos níveis de expressão de mRNAs de IL-4, IL-10, TNF- α e IL-12 por PBMCs de indivíduos infectados pelo HTLV-1 de acordo com o estado clínico, e em comparação com indivíduos saudáveis (Montanheiro *et al.*, 2009). Corroborando em parte os resultados de expressão gênica, níveis elevados de IFN- γ e de TNF- α estão presentes tanto no soro (Starling *et al.*, 2013) quanto no líquido cefalorraquiano de pacientes com PET/MAH em comparação com ACs (Gonçalves *et al.*, 2008), enquanto diferenças nas concentrações de IL-2 e IL-10 não são observadas, mesmo em comparação com indivíduos não infectados (Starling *et al.*, 2013).

Dessa forma, conforme esperado em nosso estudo, PBMCs de indivíduos com PET/MAH apresentaram níveis elevados de mRNAs de IFN- γ em comparação tanto com ACs quanto com indivíduos não infectados. Além disso, a expressão de

IFN- γ também pareceu estar diretamente relacionada à infecção em pacientes com PET/MAH, pois correlacionou positivamente com a CPV. Por outro lado, com relação à expressão de IL-10, que apresenta atividade anti-inflamatória e é produzida principalmente por células T CD4⁺ do tipo Th2 (Janeway *et al.*, 2001), não foram observadas diferenças significativas entre ACs e pacientes com PET/MAH. Entretanto, estes indivíduos apresentaram níveis de IL-10 significativamente inferiores aos observados em indivíduos não infectados. Na expressão desta citocina em ACs foi observada uma tendência inversamente proporcional à CPV, que corrobora os resultados de Schor (2013), que demonstrou que o estado assintomático da infecção pelo HTLV-1 está associado, em parte, ao polimorfismo no gene da IL-10 na posição -1082G/A, que confere um perfil de baixo produtor desta citocina.

Como abordado anteriormente, a evolução para a PET/MAH nos indivíduos infectados tem sido associada ao desenvolvimento de processos inflamatórios (Araújo & Silva., 2006). Por isso, o caráter da imunidade observada nestes indivíduos foi avaliado pela comparação entre os níveis de expressão de IFN- γ e de IL-10. Foram observados três perfis distintos entre os grupos estudados: (i) indivíduos não infectados expressaram consideravelmente mais IL-10 do que IFN- γ , (ii) ACs apresentaram, em média, níveis equivalentes de mRNAs destas citocinas, e (iii) pacientes com PET/MAH expressaram significativamente mais IFN- γ do que IL-10 em comparação com ACs e indivíduos não infectados. Dessa forma, uma vez que altos níveis CPV têm sido associados ao maior risco para o desenvolvimento de PET/MAH, e que a expressão de IFN- γ correlaciona com a CPV, a associação entre o estado inflamatório, definido pela diferença de expressão entre IFN- γ e IL-10, e a condição neurológica dos indivíduos infectados também foi avaliada em função da CPV. Com isso, identificamos padrões distintos de expressão de citocinas de acordo com o estado clínico e a CPV em indivíduos infectados. Pacientes com PET/MAH e CPV inferior a 5% e ACs com CPV superior a 5% apresentaram perfis semelhantes, sendo observados, em média, níveis equivalentes de expressão de IFN- γ e IL-10. Entretanto, indivíduos com PET/MAH e CPV maior que 5% e ACs com CPV menor que 5% apresentaram perfis significativamente distintos. Enquanto pacientes com PET/MAH e CPV elevada expressaram intensamente IFN- γ , ACs com baixa CPV

expressaram mais IL-10, de modo semelhante ao observado em indivíduos não infectados. Dessa forma, foi possível associar a diferença de expressão entre IFN- γ e IL-10 ao acometimento neurológico na infecção por HTLV-1. Indivíduos expressando mais IFN- γ do que IL-10 apresentaram uma probabilidade oito vezes maior de serem portadores da PET/MAH, demonstrando que a condição pró-inflamatória é um fator característico do perfil imunológico destes pacientes.

Dessa forma, é provável que mecanismos de regulação do sistema imune que inibam o desenvolvimento de processos inflamatórios exacerbados contribuam para a manutenção do estado assintomático na infecção pelo HTLV-1. Tem sido demonstrado que a frequência de Tregs se mostra alterada nesta infecção (Oh *et al.*, 2006; Michaëlsson *et al.*; 2008; Toulza *et al.*, 2008; Best *et al.*, 2009; Toulza *et al.*, 2010; Satou *et al.*, 2012). Recentemente, a utilização de camundongos transgênicos tem indicado a associação deste fenômeno à expressão de HBZ na população de células T CD4⁺. Estes animais apresentaram aumento da frequência de Tregs FoxP3⁺ e de células T CD4⁺ efetoras e de memória, e desenvolveram linfomas de células T, dermatites e alveolites com exuberante infiltrado de células T CD4⁺, reproduzindo observações descritas em indivíduos infectados pelo HTLV-1, principalmente naqueles com CPV elevada (Asquith *et al.*, 2007; Toulza *et al.*, 2008; Toulza *et al.*, 2010; Bittencourt & Oliveira, 2010; Satou *et al.*, 2011).

As Tregs constituem uma subpopulação de células T CD4⁺ responsável por efetuar mecanismos de supressão de respostas mediadas por células dendríticas e por células T CD4⁺ e CD8⁺ efetoras (Cools *et al.*, 2007; Workman *et al.*, 2009). A classificação destas células têm sido realizada de acordo com a sua origem, sendo denominadas naturais (nTregs), quando geradas no timo, ou induzidas (iTregs), quando se diferenciam a partir de células T precursoras CD4⁺FoxP3⁽⁻⁾ nos tecidos periféricos (Workman *et al.*, 2009). Em humanos, as nTregs constituem cerca de 10% das células T CD4⁺ do sangue periférico (Sakaguchi, 2005; Cools *et al.*, 2007), e seu número e função se mantém mesmo após os 70 anos de idade (Vukmanovic-Stejic *et al.*, 2006). Contudo, disfunções nas populações de Tregs geralmente são acompanhadas da manifestação de doenças autoimunes, tais como esclerose múltipla, diabetes do tipo 1, psoríase, artrite reumatoide e miastenia gravis (Baecher-Allan *et al.*, 2011).

Na infecção pelo HTLV-1, relatos sobre a dinâmica da população de Tregs tem se mostrado contraditórios. Alguns grupos de pesquisa têm descrito que pacientes com PET/MAH apresentam frequências reduzidas de Tregs, em comparação com ACs e indivíduos saudáveis, através da análise tanto de células FoxP3⁺ na população de células T CD4⁺CD25⁺ (Oh *et al.*, 2006) quanto de células CD127^{-/low} em células T CD4⁺CD25^{high} (Michaëlsson *et al.*, 2008) do sangue periférico. Além disso, foi descrito que a proteína Tax de HTLV-1 induz uma redução na expressão de FoxP3, conforme observado em ensaios de transfecção de células T CD4⁺CD25⁺ primárias (Yamano *et al.*, 2005). Esta frequência diminuída de células FoxP3⁺ na população de células T CD4⁺CD25⁺ correlacionou negativamente com a CPV de HTLV-1, sugerindo que a interferência com Tregs contribuiria para o desenvolvimento de distúrbios inflamatórios (Oh *et al.*, 2006). Por outro lado, outros grupos de pesquisa têm indicado que indivíduos infectados pelo HTLV-1 apresentam frequências elevadas de Tregs, determinadas como células T CD4⁺FoxP3⁺, em comparação com indivíduos saudáveis (Toulza *et al.*, 2008; Best *et al.*, 2009). Além disso, foi demonstrado que estas células são capazes de inibir *in vitro* a lise de células infectadas por CTLs (Toulza *et al.*, 2008). Satou *et al.* (2012) também demonstraram que pacientes com PET/MAH apresentam níveis elevados de Tregs ativas, definidas como células T CD4⁺CD45RA⁽⁻⁾FoxP3^{high}, que são caracterizadas pela intensa expressão de CTLA-4 e pela presença de função imunossupressora. Enquanto que os ACs apresentaram frequências aumentadas de células não-Tregs secretoras de citocinas, identificadas como células T CD4⁺CD45RA⁽⁻⁾FoxP3^{low}, que não apresentam expressão estável de FoxP3, não exibem função supressora *in vitro*, promovem a secreção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-2 e IFN- γ , e apresentam potencial de diferenciação em células Th17 (Miyara *et al.*, 2009).

Dessa forma, as hipóteses formuladas por diferentes grupos de pesquisa quanto ao papel das Tregs na modulação da resposta imune na infecção pelo HTLV-1, e na manutenção de um estado assintomático, têm se mostrado contraditórias. Tem sido proposto que a frequência elevada de Tregs limitaria a ação de CTLs específicas para HTLV-1, permitindo a fuga de células infectadas da eliminação pelo sistema imune. Assim, a função imunossupressora das Tregs poderia induzir a falha no controle da infecção, o que resultaria em níveis elevados de CPV, que é considerado fator de risco para o desenvolvimento da PET/MAH (Toulza *et al.*, 2008;

Best *et al.*, 2009; Toulza *et al.*, 2010). Por outro lado, outros grupos têm sugerido que frequências reduzidas de Tregs permitiriam o estabelecimento de uma intensa resposta de CTLs contra células infectadas, que representa um dos determinantes da lesão neurológica na PET/MAH (Yamano *et al.*, 2005; Oh *et al.*, 2006; Michaëlsson *et al.*, 2008), pois a ação das Tregs é capaz de limitar o dano colateral provocado por respostas imunes exacerbadas no sítio de inflamação (Belkaid, 2006; Workman *et al.*, 2009). Contudo, parte desta discrepância de informações é reflexo das dificuldades encontradas na correta identificação e avaliação destas células. De modo geral, a pesquisa acerca das Tregs tem sofrido limitações desde a sua descrição nos anos de 1970 (Cools *et al.*, 2007). A caracterização molecular destas células ainda permanece ambígua, pois a maioria dos marcadores propostos também é expressa em diferentes níveis de intensidade por células T CD4⁺ ativadas, como por exemplo: CD25, CTLA-4, GITR, OX-40, CD28, CD80/86, CD62L (Aerts *et al.*, 2008; Toulza *et al.*, 2008; Workman *et al.*, 2009; Baecher-Allan *et al.*, 2011).

Em humanos, a expressão de CD25 (Cadeia α do receptor de IL-2) em altos níveis (CD25^{high}) tem sido considerada uma característica comum às nTregs (Sakaguchi *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2006), assim como a expressão do fator de transcrição FoxP3 (Cools *et al.*, 2007; Workman *et al.*, 2009; Baecher-Allan *et al.*, 2011; DiCaro *et al.*, 2011). Recentemente foi demonstrado que a ausência ou baixa expressão da cadeia α do receptor de IL-7 (CD127) também pode ser utilizada como marcador de Tregs (Liu *et al.*, 2006; Seddiki *et al.*, 2006; Hartigan-O'Connor *et al.*, 2007). A sinalização por IL-7, assim como observado com a IL-2, exerce um importante papel na sobrevivência, proliferação e diferenciação das Tregs nos tecidos periféricos (Fry & Mackall, 2005; Palmer *et al.*, 2008), induzindo o aumento de expressão de FoxP3 e de CD25 (Liu *et al.*, 2006; Di Caro *et al.*, 2011). Conforme revisado por Fry & Mackall (2005), a sinalização por citocinas é essencialmente modulada no nível da expressão de receptores, e IL-7 não é exceção a esta regra. Contudo, o que tem se mostrado excepcional quanto à expressão de CD127 em relação aos outros receptores de citocinas, é a sua alta expressão por células T CD4⁺ e CD8⁺ em repouso. Enquanto outros receptores de citocinas que compartilham a cadeia comum γ_c , tais como os receptores para IL-2, IL-4, IL-9 e IL-15, são regulados positivamente após ativação celular, a expressão de CD127 é reprimida em células T efetoras, sendo novamente expressa durante a diferenciação

em células T de memória (Fry & Mackall, 2005), que apresentam o fenótipo $CD25^{low}CD127^{high}$ (Liu *et al.*, 2006). A análise da expressão de mRNAs mostrou que CD127 é expresso em níveis significativamente menores em células T $CD4^{+}CD25^{high}$ do que em células T $CD4^{+}CD25^{(-)}$. De fato, assim como Liu *et al.* (2006) descreveram, observamos que a maioria das células $FoxP3^{+}$ no sangue periférico expressam baixos níveis de CD127 ($-/low$). Contudo, Liu *et al.* (2006) demonstraram que um percentual significativo de células T $CD4^{+}CD25^{(-)}CD127^{-/low}$ e algumas células T $CD4^{+}CD127^{+}$ também são capazes de expressar FoxP3, sugerindo que estes fenótipos representem estados de transição destas células.

Apesar de ter sido sugerido que a combinação de CD4, CD25 e CD127 é capaz de identificar as Tregs, esta abordagem tem se mostrado válida apenas para células em repouso, em indivíduos que não estejam apresentando processos inflamatórios. Em pacientes com artrite reumatoide apresentando inflamação ativa (Aerts *et al.*, 2008) ou com esclerose sistêmica (Klein *et al.*, 2010), foi observado que nem todas as células T $CD25^{+}CD127^{-/low}$ expressam FoxP3. Além disso, Aerts *et al.* (2008) demonstraram que células T $CD127^{-/low}FoxP3^{(-)}$ parecem representar células T ativadas não-supressoras, o que dificultou a utilização isolada de CD127 para a identificação das Tregs. Na descrição inicial de $CD127^{-/low}$ como marcador de Tregs esta alteração não foi observada por Liu *et al.* (2006) em indivíduos com diabetes do tipo 1 com longa duração, provavelmente, pela ausência de inflamação sistêmica nestes pacientes, conforme concluído por Aerts *et al.* (2008). Da mesma forma, na infecção pelo HTLV-1 observamos uma redução da frequência de células $FoxP3^{+}$ na população de células T $CD4^{+}CD25^{+}CD127^{-/low}$, que ocorreu em função do aumento da frequência de células T $CD4^{+}CD25^{+}CD127^{-/low}FoxP3^{(-)}$ em comparação com indivíduos não infectados.

Conforme descrito na literatura e demonstrado nesse estudo, células T $CD4^{+}$ de indivíduos infectados pelo HTLV-1 expressaram mais CD25, e foi observado que este aumento estava presente tanto em níveis totais, quanto nos compartimentos de maior intensidade de expressão ($CD25^{high}$), independentemente do estado clínico. Apesar dos níveis de MFI da expressão de CD25 que observamos em células T $CD4^{+}FoxP3^{+}$ tenham sido superiores aos de células T $CD4^{+}FoxP3^{(-)}$, confirmando que Tregs expressam níveis mais elevados de CD25 em comparação com as

demais subpopulações de células T CD4⁺, a utilização do fenótipo CD25^{high} poderia subestimar o número de Tregs nestes indivíduos dependendo do modo de delimitação da região de análise para a alta expressão de CD25 (Hartigan-O'Connor *et al.*, 2007). Este fato pode ser ilustrado pela influência da região selecionada para análise quanto à intensidade de expressão de CD25 sobre a frequência de células T CD4⁺FoxP3⁺. Além disso, observamos que o aumento da expressão de CD25 por células T CD4⁺ foi influenciado pelo grau de comprometimento com a infecção, pois correlaciona positivamente com a CPV em ACs e em pacientes com PET/MAH.

Resultados contraditórios similares aos descritos na literatura, conforme abordado anteriormente, foram obtidos durante a análise da expressão de FoxP3 em subpopulações de células T CD4⁺ e T CD4⁺CD25⁺. Em indivíduos não infectados, a expressão de FoxP3 foi altamente concentrada na subpopulação de células T CD4⁺CD25^{high}. Por outro lado, em ACs e em pacientes com PET/MAH foram observadas frequências significativamente reduzidas de células FoxP3⁺, restritas às populações de células com maior intensidade de expressão de CD25 (top 5%). Quando a frequência de células FoxP3⁺ foi avaliada exclusivamente na população de células T CD4⁺, não foram observadas diferenças entre indivíduos infectados e não infectados, ao contrário de outros estudos que observaram frequências aumentadas de células T CD4⁺FoxP3⁺ em pacientes com PET/MAH em comparação com ACs e indivíduos não infectados (Toulza *et al.*, 2008; Best *et al.*, 2009). Provavelmente, essa discrepância com resultados da literatura está associada a variações de CPV, tendo em vista que este parâmetro correlacionou positivamente com a frequência de células T CD4⁺FoxP3⁺. Avaliando nossos resultados em função da CPV, foi possível demonstrar que ACs e pacientes com PET/MAH com CPV elevada (>5%) apresentaram frequências similares de Tregs, que foram superiores aos valores observados em indivíduos infectados com CPV baixa que, por sua vez, apresentaram frequências de Tregs semelhantes a de indivíduos saudáveis.

As frequências de células FoxP3⁺ nas populações de células T CD4⁺ e de células T CD4⁺CD25^{high} correlacionaram positiva e negativamente com a CPV de HTLV-1, respectivamente, corroborando resultados previamente descritos por diferentes grupos de pesquisa, demonstrando que estas discrepâncias são fruto

apenas de abordagens distintas de análise. Dessa forma, tornou-se evidente que a expressão de CD25 interfere com a definição fenotípica clássica de Tregs (Células T CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺) em indivíduos infectados pelo HTLV-1. Provavelmente, a redução na frequência de células FoxP3⁺ na população de células T CD4⁺CD25^{high} decorre de dois fenômenos observados em células T CD4⁺ destes indivíduos: (i) a elevação da frequência de células T CD4⁺CD25⁺FoxP3⁽⁻⁾, e (ii) a expressão de CD25 em maior intensidade a nível celular nesta população, como demonstrado pelo aumento da média de MFI, e corroborado pelo aumento da frequência de células T CD4⁺CD25^{high}. Por isso, a obtenção destes dados conflitantes acerca das Tregs na infecção por HTLV-1 torna óbvia a necessidade de determinação de marcadores que não sejam influenciados pela infecção das células T, tal como CD25, conforme também observado por Toulza *et al.* (2008).

Com relação à análise da expressão de CD127, em comparação com indivíduos saudáveis, indivíduos com PET/MAH apresentaram frequências aumentadas de células T CD4⁺CD25⁺CD127^{-low}. Além disso, a avaliação da frequência destas células na população de células T CD4⁺FoxP3⁽⁻⁾, visando excluir da análise possíveis Tregs, permitiu demonstrar que indivíduos infectados pelo HTLV-1, independentemente da condição neurológica, apresentam frequências elevadas de células T CD4⁺CD25⁺CD127^{-low}FoxP3⁽⁻⁾ em comparação com indivíduos não infectados, da mesma forma como observado na análise apenas com CD25. Com isso, evidências de que nem todas as células T CD4⁺CD25⁺CD127^{-low} expressam FoxP3, conforme demonstrado em outras doenças inflamatórias (Aerts *et al.*, 2008), também estão presentes nos indivíduos infectados pelo HTLV-1.

Por outro lado, considerando a análise dos perfis de expressão de CD25 e de CD127 pelas células T CD4⁺FoxP3⁺, conforme esperado, a maioria foi caracterizada como CD25⁺ e CD127^{-low}, tanto em indivíduos saudáveis quanto em portadores da infecção pelo HTLV-1. Uma vez que os níveis de expressão de CD25 e de CD127 parecem seguir dinâmicas interligadas, a utilização conjunta destes dois marcadores não melhorou a identificação de Tregs nos indivíduos infectados pelo HTLV-1. Além disso, demonstramos que parte das células T CD4⁺FoxP3⁺ nos indivíduos infectados pelo HTLV-1 se localiza fora da região de seleção típica da análise de Tregs em humanos. Com isso, a utilização isolada dos marcadores de superfície CD25 e

CD127, com a omissão de FoxP3, também poderia dar margem à exclusão de uma parcela de prováveis Tregs com perfis transitórios de diferenciação. Por isso, a detecção de FoxP3 em células T CD4⁺ parece, isoladamente, ser o melhor marcador de Tregs nesta infecção.

Após definir a melhor forma de caracterizar e identificar as nTregs, avaliamos a frequência destas células nos indivíduos infectados pelo HTLV-1 em comparação com indivíduos saudáveis. Da mesma forma, como observado com a análise da frequência de células FoxP3⁺ na população de células T CD4⁺, também não foram observadas diferenças nas contagens absolutas destas células entre indivíduos saudáveis e infectados pelo HTLV-1. Contudo, diferenças significativas foram observadas em indivíduos com CPV alta (maior que 5%). Possíveis explicações para este aumento do número de Tregs são: (i) a maturação parcial de células dendríticas, descrita por nosso grupo nos indivíduos infectados, cuja função ineficiente tem sido associada à indução de tolerância pela conversão de células T imaturas em Tregs (Nascimento *et al.*, 2011); e (ii) os altos níveis da quimiocina CCL22 no plasma destes indivíduos, conforme demonstrado por Toulza *et al.* (2010). A quimiocina CCL22 está envolvida na migração e sobrevivência de Tregs, cuja produção está associada principalmente às células infectadas expressando Tax. Dessa forma, é possível que a função destas Tregs influencie a definição dos altos níveis de CPV observados no sangue periférico dos indivíduos infectados pelo HTLV-1.

Uma vez que a frequência de Tregs parece não ser o único fator determinante na evolução para a PET/MAH, é provável que ACs também apresentem mecanismos de imunidade mais efetivos, como pode ser sugerido pela menor frequência de populações clonais infectadas predominantes presentes nestes pacientes. Tem sido descrito que ACs, em relação à pacientes com PET/MAH, apresentam alelos de HLA classe I capazes de ligar peptídeos de HBZ com maior afinidade, e que este processo está associado a uma resposta efetiva de CTLs, resultando em menores níveis de CPV (Macnamara *et al.*, 2010). Contudo, observamos que o nível de expressão de HBZ foi semelhante entre ACs e pacientes com PET/MAH, parecendo não influenciar a definição do estado clínico. Além disso, Enose-Akahata *et al.* (2013) demonstraram que a resposta humoral anti-HBZ não se

correlaciona com a CPV e nem com a expressão de *HBZ*, e está presente em níveis semelhantes em ACs e em pacientes com PET/MAH, sendo menos imunogênica frente a outras proteínas virais, tais como Gag, Env e Tax. Por outro lado, a expressão elevada de *tax ex vivo* em PBMCs de pacientes com PET/MAH, em comparação com ACs, foi diretamente proporcional aos níveis elevados de CPV, e provavelmente estimula intensamente respostas imunes contra células infectadas, como pode ser confirmado pelos altos níveis de IFN- γ que detectamos. Estes dados são corroborados pelas descrições de Asquith *et al.* (2007), que observaram que células T CD4⁺, quando infectadas e expressando Tax, tem seu tempo médio de vida reduzido de 30 dias para aproximadamente 1 dia. De qualquer modo, demonstramos que ACs apresentam níveis de expressão de IFN- γ mais elevados que indivíduos não infectados, indicando que, apesar da ausência de manifestação de doença, estes indivíduos apresentam sinais de inflamação crônica, embora menos expressivos que em pacientes com PET/MAH.

Tem sido demonstrado que células T CD4⁺ infectadas produzem citocinas envolvidas em respostas imunes do tipo Th1, tal como IFN- γ , TNF- α e IL-2 (Hanon *et al.*, 2001; Yamano *et al.*, 2005), cuja expressão é consistente com a ativação celular (Best *et al.*, 2006). Yamano *et al.* (2009) sugerem que uma população de células T CD4⁺CD25⁺CCR4⁺Foxp3⁽⁻⁾, caracterizada pela alta produção de IFN- γ e baixos níveis de IL-4 e IL-10, está relacionada à PET/MAH, sugerindo que promova consequências na manifestação de doença, pela indução de inflamação no SNC. Enquanto esta população celular foi raramente detectada em indivíduos saudáveis, representou aproximadamente 3% dos PBMCs em pacientes com PET/MAH (Yamano *et al.*, 2009). Contudo, a falta de dados quanto à avaliação destas células em ACs impossibilita a determinação da sua real implicação na patogênese da PET/MAH.

Desta forma, uma vez que a frequência de Tregs correlacionou com a CPV de HTLV-1, mas não foi associada à PET/MAH, é provável que exista interferência da infecção com a função destas células, conforme demonstrado por Toulza *et al.* (2008), principalmente naqueles indivíduos que evoluem para PET/MAH. Apesar de ter sido demonstrado que a população de Tregs não se encontra predominantemente infectada pelo HTLV-1 (Menos que 5% das células T

CD4⁺FoxP3⁺) (Toulza *et al.*, 2008), a conjugação de Tregs defectivas (Toulza *et al.*, 2008) e de frequências aumentadas de células com função pró-inflamatória (Yamano *et al.*, 2009) poderia contar, parcialmente, com a ocorrência de respostas exacerbadas de CTLs contra células infectadas, o que representa um dos determinantes da lesão neurológica. Entretanto, nos ACs estas células, provavelmente, devem ser capazes de suprimir respostas inflamatórias implicadas no desenvolvimento da PET/MAH, mantendo o estado de equilíbrio da infecção com as respostas de CTLs, porém, sem proporcionar falha do controle da infecção, propiciando baixos níveis de CPV. Contudo, a função de células T CD4⁺Foxp3⁺ identificadas em nosso estudo não foi testada no contexto da infecção por HTLV-1 em ACs e pacientes com PET/MAH, e por isso, não é possível afirmar que estas células estejam envolvidas na modulação da atividade de CTLs, ou na falha da supressão de respostas pró-inflamatórias observadas na população de pacientes com PET/MAH.

Dessa forma, a patogênese da PET/MAH parece ser influenciada por diferentes fatores, tais como: (i) a qualidade dos sítios de integração proviral no genoma celular, (ii) o nível de expressão de Tax, que está envolvido na proliferação e sobrevivência das células infectadas, (iii) a efetividade das respostas de CTLs específicas no reconhecimento antigênico, e (iv) a ação supressora de Tregs que atuam positivamente na manutenção da CPV durante a fase crônica da infecção. Contudo, em um estudo com a população peruana, Gotuzzo e colaboradores (Best *et al.*, 2006) observaram que no modelo de regressão logística com diferentes marcadores, tais como a CPV de HTLV-1, a taxa de proliferação *in vitro* de células T, a produção de IFN- γ , da proteína 10 induzida por IFN- γ (IP-10), que é um marcador de respostas do tipo Th1, e da forma solúvel de CD30, que é um marcador de respostas do tipo Th2, somente a CPV permaneceu significativamente associada com a manifestação da PET/MAH. Dessa forma, foi sugerido que, enquanto a PET/MAH parece estar primariamente associada com a CPV, aspectos imunológicos parecem ter uma associação secundária. Esta hipótese é corroborada por resultados de cinco ACs presentes em nosso estudo, que apresentaram níveis indetectáveis de CPV (abaixo do limite de 0,01%). Foi possível verificar que estes indivíduos apresentaram frequências de células T CD4⁺CD25^{high} ($p=0,973$ – Teste *t* de Student) e de células T CD4⁺FoxP3⁺ ($p=0,673$ – Mann-Whitney), e níveis de expressão de

IFN- γ ($p=0,383$ – Mann-Whitney) e de IL-10 ($p=0,335$ – Test t de Student com correção de Welch) semelhantes aos de indivíduos não infectados, sugerindo que o perfil inflamatório e outras alterações imunológicas avaliadas em nosso estudo também parecem estar diretamente associadas aos níveis de CPV. A partir destes dados, a determinação da CPV parece ser o parâmetro de mais fácil execução e que demonstra melhor o risco de desenvolvimento da PET/MAH, apesar dos níveis de CPV serem consequência da resposta imunológica do indivíduo à infecção.

Contudo, suposições realizadas neste estudo e em outros apresentam limitações devido à avaliação de pacientes em estágios crônicos da infecção, seja pela baixa frequência (0,5 a 5%) da doença e pelo longo intervalo de tempo para desenvolvimento de manifestações clínicas, ou ainda pela dificuldade diagnóstica, o que retarda o acesso dos indivíduos acometidos, durante a fase aguda da doença, aos centros especializados de pesquisa. Diferente de outros grupos de pesquisa que descreveram perfis inflamatórios semelhantes entre ACs com alta CPV e pacientes com PET/MAH (Best *et al.*, 2009; Andrade *et al.*, 2013), em nosso estudo, somente observamos semelhanças entre ACs com CPV alta (maior que 5%) e portadores de PET/MAH com baixa CPV (inferior a 5%) no caso da análise da expressão de IFN- γ e de IL-10. No entanto, os níveis de Tregs foram semelhantes entre aqueles indivíduos que apresentaram CPV baixa ou alta, independente da presença de doença. Dessa forma, observamos que ACs com CPV alta apresentam parâmetros imunológicos, tanto de supressão da resposta imune (frequência de Tregs) quanto de fatores pró-inflamatórios (diferença dos níveis de expressão entre IFN- γ e IL-10), semelhantes aos indivíduos com PET/MAH. Assim sendo, ACs com CPV alta devem ser acompanhados de forma mais frequente, tendo em vista o risco de desenvolver manifestações clínicas associadas à infecção pelo HTLV-1. Desta forma, concluímos que a determinação da CPV do HTLV-1 em conjunto com a avaliação do perfil inflamatório poderá melhor definir os ACs com maior risco de desenvolvimento da PET/MAH.

6. CONCLUSÕES:

A partir dos dados obtidos em nosso estudo, podemos concluir que:

- Populações clonais predominantes carreando o provírus estão presentes nos portadores da infecção pelo HTLV-1, porém, em maior número em pacientes com PET/MAH. Além disso, estas células foram capazes de persistir ao longo do tempo, sugerindo que contribuam para níveis mais elevados de CPV comumente observados nestes pacientes.
- Os genes *tax* e *HBZ* de HTLV-1 são pouco expressos *in vivo* por PBMCs dos indivíduos infectados, indicando que pequenas concentrações de antígenos parecem estimular de forma crônica e persistente as respostas de CTLs específicos para HTLV-1, como pode ser confirmado pelos altos níveis de IFN- γ que observamos em pacientes com PET/MAH, e pelos relatos da literatura que demonstraram a drástica redução do tempo médio de vida de células T CD4⁺ quando expressam Tax.
- A expressão de *tax ex vivo* foi maior nos pacientes com PET/MAH e se correlacionou com a CPV, sugerindo que também poderia ser utilizada como um marcador de risco para o desenvolvimento de doença.
- Indivíduos com PET/MAH apresentam perfil inflamatório mais acentuado que ACs, conforme a observação de níveis mais elevados de IFN- γ em relação à IL-10, confirmando a intensa resposta do tipo Th1 descrita por outros autores.
- Nos indivíduos infectados pelo HTLV-1, os níveis de expressão de IL-10 são inferiores aos observados em indivíduos saudáveis. Nos ACs, esta expressão foi inversamente proporcional à CPV, sendo corroborada pela descrição de que o estado assintomático da infecção está associado ao polimorfismo do gene da IL-10 na posição -1082G/A, que confere um perfil de baixo produtor desta citocina.
- A expressão de IFN- γ se correlaciona com a CPV, e foi maior nos indivíduos com PET/MAH em comparação com ACs. Por sua vez, os ACs apresentam níveis de expressão de IFN- γ mais elevados que indivíduos não infectados, indicando que, apesar da ausência de manifestação de doença, estes indivíduos apresentam

sinais de inflamação crônica, embora menos expressivos que em pacientes com PET/MAH.

- A expressão das citocinas IFN- γ e IL-10 está associada ao estado clínico e aos níveis de CPV dos indivíduos infectados pelo HTLV-1, sendo observado que ACs com CPV alta e pacientes com PET/MAH e CPV baixa apresentam perfis inflamatórios semelhantes, com níveis de expressão de IFN- γ ligeiramente superiores aos de IL-10, enquanto que indivíduos com PET/MAH e CPV elevada e ACs com CPV reduzida expressaram intensamente IFN- γ ou IL-10, respectivamente, indicando que a avaliação conjunta destes parâmetros poderá melhor definir os ACs com maior risco de desenvolver a PET/MAH.
- Na infecção pelo HTLV-1, a utilização da molécula CD25 como marcador de Tregs interfere com a análise da frequência destas células, pois a sua expressão se encontra aumentada proporcionalmente à CPV, indicando que dados discrepantes quanto ao aumento ou redução da frequência de Tregs resultam de abordagens distintas de análise.
- A falsa redução da frequência de Tregs na infecção pelo HTLV-1, como relatado por alguns autores através da análise de células FoxP3⁺ na população de células T CD4⁺CD25^{high}, está relacionada a dois fenômenos observados na população de células T CD4⁺ dos indivíduos infectados: (i) o aumento da frequência de células T CD4⁺CD25⁺FoxP3⁽⁻⁾, e (ii) a expressão de CD25 em maior intensidade nesta população, indicando que CD25 não representa um bom marcador de Tregs na infecção por HTLV-1, por ter sua expressão induzida em células T CD4⁺FoxP3⁽⁻⁾.
- Indivíduos infectados pelo HTLV-1, independentemente da condição neurológica, apresentam frequências elevadas de células T CD4⁺CD25⁺CD127^{-/low}FoxP3⁽⁻⁾ em comparação com indivíduos não infectados. Uma vez que níveis de expressão de CD25 e de CD127 parecem seguir dinâmicas interligadas, a utilização conjunta destes dois marcadores não melhorou a identificação das Tregs nos indivíduos infectados pelo HTLV-1, sugerindo que, na ausência de outros marcadores específicos, a detecção de FoxP3 em células T CD4⁺ parece ser o melhor marcador de Tregs nesta infecção.

- Os ACs e pacientes com PET/MAH com CPV elevada apresentam frequências similares de Tregs, que são superiores àquelas observadas em indivíduos infectados com CPV baixa que, por sua vez, apresentam número de Tregs semelhantes a de indivíduos saudáveis. Estes resultados sugerem que a infecção pelo HTLV-1 induz um aumento da taxa de geração e diferenciação desta população de células T CD4⁺ com função imunossupressora, o que, provavelmente, influencia a definição dos altos níveis de CPV observados no sangue periférico dos pacientes com PET/MAH.
- A análise dos resultados obtidos em ACs com níveis indetectáveis de CPV possibilitou demonstrar que estes são indistinguíveis de indivíduos não infectados, sugerindo que o perfil inflamatório e outras alterações imunológicas avaliadas em nosso estudo estão diretamente associadas aos níveis de CPV.
- Os ACs com CPV alta e pacientes com PET/MAH apresentaram parâmetros imunológicos semelhantes, tanto de supressão da resposta imune (frequência de Tregs) quanto de fatores pró-inflamatórios (variação de expressão entre IFN- γ e IL-10), indicando que estes indivíduos necessitam ser clinicamente acompanhados de forma mais frequente, em razão do risco de manifestar alterações clínicas associadas à infecção pelo HTLV-1.

7. REFERÊNCIAS:

Aerts NE, Dombrecht EJ, Ebo DG, Bridts CH, Stevens WJ, De Clerck LS. Activated T cells complicate the identification of regulatory T cells in rheumatoid arthritis. *Cell Immunol.* 2008 Feb;251(2):109-15.

Alamy AH, Menezes FB, Leite AC, Nascimento OM, Araújo AQ. Dysautonomia in human T-cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Ann Neurol.* 2001;50(5):681-5.

Alefantis T, Jain P, Ahuja J, Mostoller K, Wigdahl B. HTLV-1 Tax nucleocytoplasmic shuttling, interaction with the secretory pathway, extracellular signaling, and implications for neurologic disease. *J Biomed Sci.* 2005;12(6):961-74.

Andrade RG, Gonçalves Pde C, Ribeiro MA, Romanelli LC, Ribas JG, Torres EB, Carneiro-Proietti AB, Barbosa-Stancioli EF, Martins ML. Strong correlation between tax and HBZ mRNA expression in HAM/TSP patients: distinct markers for the neurologic disease. *J Clin Virol.* 2013;56(2):135-40.

Andresen V, Pise-Masison CA, Sinha-Datta U, Bellon M, Valeri V, Washington Parks R, Cecchinato V, Fukumoto R, Nicot C, Franchini G. Suppression of HTLV-1 replication by Tax-mediated rerouting of the p13 viral protein to nuclear speckles. *Blood.* 2011;118(6):1549-59.

Araújo AQ, Silva MT. The HTLV-1 neurological complex. *Lancet Neurol.* 2006;5(12):1068-76.

Arnold J, Yamamoto B, Li M, Phipps AJ, Younis I, Lairmore MD, Green PL. Enhancement of infectivity and persistence *in vivo* by HBZ, a natural antisense coded protein of HTLV-1. *Blood.* 2006;107(10):3976-82.

Asquith B, Bangham CR. How does HTLV-I persist despite a strong cell-mediated immune response? *Trends Immunol.* 2008;29(1):4-11.

Asquith B, Mosley AJ, Heaps A, Tanaka Y, Taylor GP, McLean AR, Bangham CR. Quantification of the virus-host interaction in human T lymphotropic virus I infection. *Retrovirology.* 2005;2:75.

Asquith B, Zhang Y, Mosley AJ, de Lara CM, Wallace DL, Worth A, Kaftantzi L, Meekings K, Griffin GE, Tanaka Y, Tough DF, Beverley PC, Taylor GP, Macallan DC, Bangham CR. *In vivo* T lymphocyte dynamics in humans and the impact of human T-lymphotropic virus 1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(19):8035-40.

Azran I, Schavinsky-Khrapunsky Y, Aboud M. Role of Tax protein in human T-cell leukemia virus type-I leukemogenicity. *Retrovirology.* 2004;1:20.

Baecher-Allan CM, Costantino CM, Cvetanovich GL, Ashley CW, Beriou G, Dominguez-Villar M, Hafler DA. CD2 costimulation reveals defective activity by human CD4+CD25(hi) regulatory cells in patients with multiple sclerosis. *J Immunol*. 2011 186(6):3317-26.

Ballard DW, Böhnlein E, Lowenthal JW, Wano Y, Franza BR, Greene WC. HTLV-I tax induces cellular proteins that activate the kappa B element in the IL-2 receptor alpha gene. *Science*. 1988;241(4873):1652-5.

Bangham CR, Meekings K, Toulza F, Nejmeddine M, Majorovits E, Asquith B, Taylor GP. The immune control of HTLV-1 infection: selection forces and dynamics. *Front Biosci*. 2009 Jan 1;14:2889-903.

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

Barbeau B, Mesnard JM. Making sense out of antisense transcription in human T-cell lymphotropic viruses (HTLVs). *Viruses*. 2011;3(5):456-68.

Barnard AL, Igakura T, Tanaka Y, Taylor GP, Bangham CR. Engagement of specific T-cell surface molecules regulates cytoskeletal polarization in HTLV-1-infected lymphocytes. *Blood*. 2005;106(3):988-95.

Basbous J, Arpin C, Gaudray G, Piechaczyk M, Devaux C, Mesnard JM. The HBZ factor of human T-cell leukemia virus type I dimerizes with transcription factors JunB and c-Jun and modulates their transcriptional activity. *J Biol Chem*. 2003;278(44):43620-7.

Bayer AL, Lee JY, de la Barrera A, Surh CD, Malek TR. A function for IL-7R for CD4+CD25+Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol*. 2008 Jul 1;181(1):225-34.

Beimling P, Moelling K. Direct interaction of CREB protein with 21 bp Tax-response elements of HTLV-ILTR. *Oncogene*. 1992;7(2):257-62.

Belkaid Y, Blank RB, Suffia I. Natural regulatory T cells and parasites: a common quest for host homeostasis. *Immunol Rev*. 2006 Aug;212:287-300.

Belkaid Y. Role of Foxp3-positive regulatory T cells during infection. *Eur J Immunol.* 2008 Apr;38(4):918-21.

Best I, Adai V, Verdonck K, González E, Tipismana M, Clark D, Gotuzzo E, Vanham G. Proviral load and immune markers associated with human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in Peru. *Clin Exp Immunol.* 2006;146(2):226-33.

Best I, López G, Verdonck K, González E, Tipismana M, Gotuzzo E, Vanham G, Clark D. IFN-gamma production in response to Tax 161-233, and frequency of CD4+ Foxp3+ and Lin HLA-DRhigh CD123+ cells, discriminate HAM/TSP patients from asymptomatic HTLV-1-carriers in a Peruvian population. *Immunology.* 2009 Sep;128(1Suppl):e777-86.

Bishop JR, Schuksz M, Esko JD. Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature.* 2007;446(7139):1030-7.

Bittencourt AL, de Oliveira M de F. Cutaneous manifestations associated with HTLV-1 infection. *Int J Dermatol.* 2010;49(10):1099-110.

Booth NJ, McQuaid AJ, Sobande T, Kissane S, Agius E, Jackson SE, Salmon M, Falciani F, Yong K, Rustin MH, Akbar AN, Vukmanovic-Stejic M. Different proliferative potential and migratory characteristics of human CD4+ regulatory T cells that express either CD45RA or CD45RO. *J Immunol.* 2010 Apr 15;184(8):4317-26.

Boxus M, Twizere JC, Legros S, Dewulf JF, Kettmann R, Willems L. The HTLV-1 Tax interactome. *Retrovirology.* 2008;5:76.

Boxus M, Willems L. How the DNA damage response determines the fate of HTLV-1 Tax-expressing cells. *Retrovirology.* 2012;9:2.

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

Carneiro-Proietti ABF, Ribas JGR, Catalan-Soares BC, Martins ML, Brito-Melo GEA, Martins-Filho OA, Pinheiro SR, Araújo AQC, Galvão-Castro B, Oliveira MSP, Guedes AC, Proietti FA. Infecção e doença pelos vírus linfotrópicos humanos de células T (HTLV-I/II) no Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2002;35(5):499-508.

Carvalho EM, Bacellar O, Porto AF, Braga S, Galvão-Castro B, Neva F. Cytokine profile and immunomodulation in asymptomatic human T-lymphotropic virus type 1-infected blood donors. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2001;27(1):1-6.

Catalan-Soares B, Carneiro-Proietti ABF, Proietti FA, Interdisciplinary HTLV Research Group. 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):926-931.

Cavanagh MH, Landry S, Audet B, Arpin-André C, Hivin P, Paré ME, Thête J, Wattel E, Marriott SJ, Mesnard JM, Barbeau B. HTLV-I antisense transcripts initiating in the 3'LTR are alternatively spliced and polyadenylated. *Retrovirology.* 2006;3:15.

Cavrois M, Leclercq I, Gout O, Gessain A, Wain-Hobson S, Wattel E. Persistent oligoclonal expansion of human T-cell leukemia virus type 1-infected circulating cells in patients with Tropical spastic paraparesis/HTLV-1 associated myelopathy. *Oncogene.* 1998;17(1):77-82.

Chaturvedi V, Collison LW, Guy CS, Workman CJ, Vignali DA. Cutting edge: Human regulatory T cells require IL-35 to mediate suppression and infectious tolerance. *J Immunol.* 2011 Jun 15;186(12):6661-6.

Chou KS, Okayama A, Su IJ, Lee TH, Essex M. Preferred nucleotide sequence at the integration target site of human T-cell leukemia virus type I from patients with adult T-cell leukemia. *Int J Cancer.* 1996;65(1):20-4.

Clerc I, Polakowski N, André-Arpin C, Cook P, Barbeau B, Mesnard JM, Lemasson I. An interaction between the human T cell leukemia virus type 1 basic leucine zipper factor (HBZ) and the KIX domain of p300/CBP contributes to the down-regulation of tax-dependent viral transcription by HBZ. *J Biol Chem.* 2008;283(35):23903-13.

Coffin, J. M., S. H. Hughes, and H. E. Vermus. 1997. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Collins ND, Newbound GC, Albrecht B, Beard JL, Ratner L, Lairmore MD. Selective ablation of human T-cell lymphotropic virus type 1 p12I reduces viral infectivity *in vivo*. *Blood*. 1998;91(12):4701-7.

Cook LB, Rowan AG, Melamed A, Taylor GP, Bangham CR. HTLV-1-infected T cells contain a single integrated provirus in natural infection. *Blood*. 2012 Oct 25;120(17):3488-90. doi: 10.1182/blood-2012-07-445593.

Cools N, Ponsaerts P, Van Tendeloo VF, Berneman ZN. Regulatory T cells and human disease. *Clin Dev Immunol*. 2007;2007:89195.

Daenke S, Kermode AG, Hall SE, Taylor G, Weber J, Nightingale S, Bangham CR. High activated and memory cytotoxic T-cell responses to HTLV-1 in healthy carriers and patients with tropical spastic paraparesis. *Virology*. 1996;217(1):139-46.

de la Fuente C, Wang L, Wang D, Deng L, Wu K, Li H, Stein LD, Denny T, Coffman F, Kehn K, Baylor S, Maddukuri A, Pumfery A, Kashanchi F. Paradoxical effects of a stress signal on pro- and anti-apoptotic machinery in HTLV-1 Tax expressing cells. *Mol Cell Biochem*. 2003;245(1-2):99-113.

Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen JF, Enjoji K, Linden J, Oukka M, Kuchroo VK, Strom TB, Robson SC. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med*. 2007 Jun 11;204(6):1257-65.

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

Derse D, Crise B, Li Y, Princler G, Lum N, Stewart C, McGrath CF, Hughes SH, Munroe DJ, Wu X. Human T-cell leukemia virus type 1 integration target sites in the human genome: comparison with those of other retroviruses. *J Virol*. 2007;81(12):6731-41.

Derse D, Heidecker G, Mitchell M, Hill S, Lloyd P, Princler G. Infectious transmission and replication of human T-cell leukemia virus type 1. *Front Biosci.* 2004;9:2495-9.

Di Caro V, D'Anneo A, Phillips B, Engman C, Harnaha J, Lakomy R, Styche A, Trucco M, Giannoukakis N. Interleukin-7 matures suppressive CD127(+) forkhead box P3 (FoxP3)(+) T cells into CD127(-) CD25(high) FoxP3(+) regulatory T cells. *Clin Exp Immunol.* 2011 Jul;165(1):60-76.

Dooneief G, Marlink R, Bell K, Marder K, Renjifo B, Stern Y, Mayeux R. Neurologic consequences of HTLV-II infection in injection-drug users. *Neurology.* 1996;46(6):1556-60.

Douen AG, Pringle CE, Guberman A. Human T-cell lymphotropic virus type 1 myositis, peripheral neuropathy, and cerebral white matter lesions in the absence of spastic paraparesis. *Arch Neurol.* 1997;54(7):896-900.

Dourado I, Alcantara LC, Barreto ML, da Gloria Teixeira M, Galvão-Castro B. HTLV-I in the general population of Salvador, Brazil: a city with African ethnic and sociodemographic characteristics. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2003;34(5):527-31.

Edwards D, Fenizia C, Gold H, de Castro-Amarante MF, Buchmann C, Pise-Masison CA, Franchini G. Orf-I and orf-II-encoded proteins in HTLV-1 infection and persistence. *Viruses.* 2011;3(6):861-85.

Engelman A. The roles of cellular factors in retroviral integration. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2003;281:209-38.

Enk AH. Dendritic cells in tolerance induction. *Immunol Lett.* 2005;99(1):8-11.

Enose-Akahata Y, Abrams A, Massoud R, Bialuk I, Johnson KR, Green PL, Maloney EM, Jacobson S. Humoral immune response to HTLV-1 basic leucine zipper factor (HBZ) in HTLV-1-infected individuals. *Retrovirology.* 2013;10:19.

Etoh K, Tamiya S, Yamaguchi K, Okayama A, Tsubouchi H, Ideta T, Mueller N, Takatsuki K, Matsuoka M. Persistent clonal proliferation of human T-lymphotropic virus type I-infected cells *in vivo*. *Cancer Res.* 1997;57(21):4862-7.

Fan N, Gavalchin J, Paul B, Wells KH, Lane MJ, Poiesz BJ. Infection of peripheral blood mononuclear cells and cell lines by cell-free human T-cell lymphoma/leukemia virus type I. *J Clin Microbiol.* 1992;30(4):905-10.

Fantini MC, Becker C, Monteleone G, Pallone F, Galle PR, Neurath MF. Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol.* 2004 May 1;172(9):5149-53.

Faria AM, Weiner HL. Oral tolerance and TGF-beta-producing cells. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2006 Sep;5(3):179-90.

Felber BK, Paskalis H, Kleinman-Ewing C, Wong-Staal F, Pavlakis GN. The pX protein of HTLV-I is a transcriptional activator of its long terminal repeats. *Science.* 1985;229(4714):675-9.

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

Flint SJ, Enquist LW, Krug RM, Racaniello VR, Skalka AM. In: *Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis and Control.* 2000. Ed. ASM Press.

Fogarty KH, Zhang W, Grigsby IF, Johnson JL, Chen Y, Mueller JD, Mansky LM. New insights into HTLV-1 particle structure, assembly, and Gag-Gag interactions in living cells. *Viruses.* 2011;3(6):770-93.

Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003;4(4):330-6.

Fry TJ, Mackall CL. The many faces of IL-7: from lymphopoiesis to peripheral T cell maintenance. *J Immunol.* 2005 Jun 1;174(11):6571-6.

Furtado Mdos S, Andrade RG, Romanelli LC, Ribeiro MA, Ribas JG, Torres EB, Barbosa-Stancioli EF, Proietti AB, Martins ML. Monitoring the HTLV-1 proviral load in the peripheral blood of asymptomatic carriers and patients with HTLV-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis from a Brazilian cohort: ROC curve analysis to establish the threshold for risk disease. *J Med Virol.* 2012;84(4):664-71.

Gallo RC. History of the discoveries of the first human retroviruses: HTLV-1 and HTLV-2. *Oncogene.* 2005;24(39):5926-30.

Gaudray G, Gachon F, Basbous J, Biard-Piechaczyk M, Devaux C, Mesnard JM. The complementary strand of HTLV-1 RNA genome encodes a bZIP transcription factor that down-regulates the viral transcription. *J Virol.* 2002;76:12813–12822.

Gershon RK, Cohen P, Hencin R, Liebhaver SA. Suppressor T cells. *J Immunol.* 1972 108(3):586-90.

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

Ghez D, Lepelletier Y, Jones KS, Pique C, Hermine O. Current concepts regarding the HTLV-1 receptor complex. *Retrovirology.* 2010;7:99.

Ghez D, Lepelletier Y, Lambert S, Fourneau JM, Blot V, Janvier S, Arnulf B, van Endert PM, Heveker N, Pique C, Hermine O. Neuropilin-1 is involved in human T-cell lymphotropic virus type 1 entry. *J Virol.* 2006;80(14):6844-54.

Giam CZ, Xu YL. HTLV-I tax gene product activates transcription via pre-existing cellular factors and cAMP responsive element. *J Biol Chem.* 1989;264(26):15236-41.

Giebler HA, Loring JE, van Orden K, Colgin MA, Garrus JE, Escudero KW, Brauweiler A, Nyborg JK. Anchoring of CREB binding protein to the human T-cell leukemia virus type 1 promoter: a molecular mechanism of Tax transactivation. *Mol Cell Biol.* 1997;17(9):5156-64.

Gillet NA, Malani N, Melamed A, Gormley N, Carter R, Bentley D, Berry C, Bushman FD, Taylor GP, Bangham CR. The host genomic environment of the provirus determines the abundance of HTLV-1-infected T-cell clones. *Blood*. 2011;117(11):3113-22.

Gonçalves DU, Proietti FA, Barbosa-Stancioli EF, Martins ML, Ribas JG, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Peruhype-Magalhães V, Carneiro-Proietti AB. HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) inflammatory network. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2008;7(2):98-107.

Goon PK, Hanon E, Igakura T, Tanaka Y, Weber JN, Taylor GP, Bangham CR. High frequencies of Th1-type CD4(+) T cells specific to HTLV-1 Env and Tax proteins in patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Blood*. 2002;99(9):3335-41.

Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM, Dustin ML. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science*. 1999;285(5425):221-7.

Grassmann R, Aboud M, Jeang KT. Molecular mechanisms of cellular transformation by HTLV-1 Tax. *Oncogene*. 2005;24(39):5976-85.

Greffin S, Oliveira RVC, Longo CL, Martins IH, Silva MTT, Andrada-Serpa MJ. Determinação da sensibilidade e especificidade da carga proviral para a discriminação entre portadores assintomáticos do HTLV-1 e pacientes com doenças neurológicas associadas ao HTLV-1. In: *Anais do XXIV Congresso Brasileiro de Neurologia*, Rio de Janeiro, Brasil. 2010.

Grigsby IF, Zhang W, Johnson JL, Fogarty KH, Chen Y, Rawson JM, Crosby AJ, Mueller JD, Mansky LM. Biophysical analysis of HTLV-1 particles reveals novel insights into particle morphology and Gag stoichiometry. *Retrovirology*. 2010;7:75.

Grossman WJ, Verbsky JW, Barchet W, Colonna M, Atkinson JP, Ley TJ. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity*. 2004 Oct;21(4):589-601.

Hanon E, Goon P, Taylor GP, Hasegawa H, Tanaka Y, Weber JN, Bangham CR. High production of interferon gamma but not interleukin-2 by human T-lymphotropic virus type I-infected peripheral blood mononuclear cells. *Blood*. 2001;98(3):721-6.

Hanon E, Hall S, Taylor GP, Saito M, Davis R, Tanaka Y, Usuku K, Osame M, Weber JN, Bangham CR. Abundant tax protein expression in CD4+ T cells infected with human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) is prevented by cytotoxic T lymphocytes. *Blood*. 2000a;95(4):1386-92.

Hanon E, Stinchcombe JC, Saito M, Asquith BE, Taylor GP, Tanaka Y, Weber JN, Griffiths GM, Bangham CR. Fratricide among CD8(+) T lymphocytes naturally infected with human T cell lymphotropic virus type I. *Immunity*. 2000b;13(5):657-64.

Hartigan-O'Connor DJ, Poon C, Sinclair E, McCune JM. Human CD4+ regulatory T cells express lower levels of the IL-7 receptor alpha chain (CD127), allowing consistent identification and sorting of live cells. *J Immunol Methods*. 2007 319(1-2):41-52.

He Z, Tessier-Lavigne M. Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III. *Cell*. 1997;90(4):739-51.

Higuchi I, Hashimoto K, Kashio N, Izumo S, Inose M, Izumi K, Ohkubo R, Nakagawa M, Arimura K, Osame M. Detection of HTLV-I provirus by in situ polymerase chain reaction in mononuclear inflammatory cells in skeletal muscle of viral carriers with polymyositis. *Muscle Nerve*. 1995;18(8):854-8.

Higuchi M, Fujii M. Distinct functions of HTLV-1 Tax1 from HTLV-2 Tax2 contribute key roles to viral pathogenesis. *Retrovirology*. 2009;6:117.

Hinuma Y, Nagata K, Hanaoka M, Nakai M, Matsumoto T, Kinoshita KI, Shirakawa S, Miyoshi I. Adult T-cell leukemia: antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981;78(10):6476-80.

Hiraragi H, Kim SJ, Phipps AJ, Silic-Benussi M, Ciminale V, Ratner L, Green PL, Lairmore MD. Human T-lymphotropic virus type 1 mitochondrion-localizing protein p13(II) is required for viral infectivity *in vivo*. *J Virol*. 2006;80(7):3469-76.

Hirokawa K, Utsuyama M, Kasai M, Kurashima C, Ishijima S, Zeng YX. Understanding the mechanism of the age-change of thymic function to promote T cell differentiation. *Immunol Lett*. 1994 Jun;40(3):269-77.

Hiscott J, Nguyen TL, Arguello M, Nakhaei P, Paz S. Manipulation of the nuclear factor-kappaB pathway and the innate immune response by viruses. *Oncogene*. 2006 Oct 30;25(51):6844-67.

Hivin P, Arpin-André C, Clerc I, Barbeau B, Mesnard JM. A modified version of a Fos-associated cluster in HBZ affects Jun transcriptional potency. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(9):2761-72.

Hivin P, Frédéric M, Arpin-André C, Basbous J, Gay B, Thébault S, Mesnard JM. Nuclear localization of HTLV-I bZIP factor (HBZ) is mediated by three distinct motifs. *J Cell Sci*. 2005;118(Pt 7):1355-62.

Hjelle B, Appenzeller O, Mills R, Alexander S, Torrez-Martinez N, Jahnke R, Ross G. Chronic neurodegenerative disease associated with HTLV-II infection. *Lancet*. 1992;339(8794):645-6.

Hlela C, Shepperd S, Khumalo NP, Taylor GP. The prevalence of human T-cell lymphotropic virus type 1 in the general population is unknown. *AIDS Rev*. 2009 11(4):205-14.

Hollsberg P, Hafler DA. Pathogenesis of diseases induced by HTLV-1 infection. *N. Engl. J. Med*. 1992;328(16):1173-1181.

Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003;299(5609):1057-61.

http://viralzone.expasy.org/all_by_species/60.html

Igakura T, Stinchcombe JC, Goon PK, Taylor GP, Weber JN, Griffiths GM, Tanaka Y, Osame M, Bangham CR. Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. *Science*. 2003;299(5613):1713-6.

Iwanaga R, Ozono E, Fujisawa J, Ikeda MA, Okamura N, Huang Y, Ohtani K. Activation of the cyclin D2 and cdk6 genes through NF-kappaB is critical for cell-cycle progression induced by HTLV-I Tax. *Oncogene*. 2008;27(42):5635-42.

Izumo S, Umehara F, Osame M. HTLV-I-associated myelopathy. *Neuropathology*. 2000;20 Suppl:S65-8.

Izumo S. Neuropathology of HTLV-1-associated myelopathy (HAM/TSP). *Neuropathology*. 2010;30(5):480-5.

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. *Immunobiology: the immune system in health and disease*. 5^a edição, 2001. Publicado por Garland Publishing, New York, Estados Unidos.

Jenkins MR, Tsun A, Stinchcombe JC, Griffiths GM. The strength of T cell receptor signal controls the polarization of cytotoxic machinery to the immunological synapse. *Immunity*. 2009;31(4):621-31.

Jin Q, Alkhatib B, Cornetta K, Alkhatib G. Alternate receptor usage of neuropilin-1 and glucose transporter protein 1 by the human T cell leukemia virus type 1. *Virology*. 2010;396(2):203-12.

Johnson CN, Levy LS. Matrix attachment regions as targets for retroviral integration. *Virology*. 2005;2:68.

Jones KS, Akel S, Petrow-Sadowski C, Huang Y, Bertolette DC, Ruscetti FW. Induction of human T cell leukemia virus type I receptors on quiescent naive T lymphocytes by TGF-beta. *J Immunol*. 2005b;174(7):4262-70.

Jones KS, Lambert S, Bouttier M, Bénit L, Ruscetti FW, Hermine O, Pique C. Molecular aspects of HTLV-1 entry: functional domains of the HTLV-1 surface subunit (SU) and their relationships to the entry receptors. *Viruses*. 2011 Jun;3(6):794-810.

Jones KS, Petrow-Sadowski C, Bertolette DC, Huang Y, Ruscetti FW. Heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of human T-cell leukemia virus type 1 virions into CD4+ T cells. *J Virol*. 2005a;79(20):12692-702.

Jones KS, Petrow-Sadowski C, Huang YK, Bertolette DC, Ruscetti FW. Cell-free HTLV-1 infects dendritic cells leading to transmission and transformation of CD4(+) T cells. *Nat Med*. 2008;14(4):429-36.

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

Kamoi K, Mochizuki M. HTLV-1 uveitis. *Front Microbiol*. 2012;3:270.

Kannagi M, Harada S, Maruyama I, Inoko H, Igarashi H, Kuwashima G, Sato S, Morita M, Kidokoro M, Sugimoto M, *et al*. Predominant recognition of human T cell leukemia virus type I (HTLV-I) pX gene products by human CD8+ cytotoxic T cells directed against HTLV-I-infected cells. *Int Immunol*. 1991;3(8):761-7.

Kannian P, Green PL. Human T Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1): Molecular Biology and Oncogenesis. *Viruses*. 2010;2(9):2037-77.

Kattan T, MacNamara A, Rowan AG, Nose H, Mosley AJ, Tanaka Y, Taylor GP, Asquith B, Bangham CR. The avidity and lytic efficiency of the CTL response to HTLV-1. *J Immunol*. 2009;182(9):5723-9.

Kfoury Y, Nasr R, Hermine O, de Thé H, Bazarbachi A. Proapoptotic regimes for HTLV-I-transformed cells: targeting Tax and the NF-kappaB pathway. *Cell Death Differ*. 2005 Aug;12 Suppl 1:871-7.

Kinjo T, Ham-Terhune J, Peloponese JM Jr, Jeang KT. Induction of reactive oxygen species by human T-cell leukemia virus type 1 tax correlates with DNA damage and expression of cellular senescence marker. *J Virol*. 2010;84(10):5431-7.

Klein S, Kretz CC, Krammer PH, Kuhn A. CD127(low/-) and FoxP3(+) expression levels characterize different regulatory T-cell populations in human peripheral blood. *J Invest Dermatol*. 2010 Feb;130(2):492-9.

Koyanagi Y, Itoyama Y, Nakamura N, Takamatsu K, Kira J, Iwamasa T, Goto I, Yamamoto N. *In vivo* infection of human T-cell leukemia virus type I in non-T cells. *Virology*. 1993;196(1):25-33.

Krawczenko A, Kieda C, Duś D. The biological role and potential therapeutic application of interleukin 7. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2005 Nov-Dec;53(6):518-25.

Landry S, Halin M, Vargas A, Lemasson I, Mesnard JM, Barbeau B. Upregulation of human T-cell leukemia virus type 1 antisense transcription by the viral tax protein. *J Virol*. 2009;83(4):2048-54.

Larocca D, Chao LA, Seto MH, Brunck TK. Human T-cell leukemia virus minus strand transcription in infected T-cells. *Bioch Biophys Res Comm*. 1989;163:1006-1013.

Le Blanc I, Blot V, Bouchaert I, Salamero J, Goud B, Rosenberg AR, Dokh lar MC. Intracellular distribution of human T-cell leukemia virus type 1 Gag proteins is independent of interaction with intracellular membranes. *J Virol*. 2002;76(2):905-11.

Le Blanc I, Rosenberg AR, Dokh lar MC. Multiple functions for the basic amino acids of the human T-cell leukemia virus type 1 matrix protein in viral transmission. *J Virol*. 1999;73(3):1860-7.

Leclercq I, Mortreux F, Cavrois M, Leroy A, Gessain A, Wain-Hobson S, Wattel E. Host sequences flanking the human T-cell leukemia virus type 1 provirus *in vivo*. *J Virol*. 2000;74(5):2305-12.

Leite AC, Silva MT, Alamy AH, Afonso CR, Lima MA, Andrada-Serpa MJ, Nascimento OJ, Araújo AQ. Peripheral neuropathy in HTLV-I infected individuals without tropical spastic paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy. *J Neurol*. 2004;251(7):877-81.

Lemasson I, Lewis MR, Polakowski N, Hivin P, Cavanagh MH, Thébault S, Barbeau B, Nyborg JK, Mesnard JM. Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) bZIP protein interacts with the cellular transcription factor CREB to inhibit HTLV-1 transcription. *J Virol*. 2007 Feb;81(4):1543-53.

Lemasson I, Polakowski NJ, Laybourn PJ, Nyborg JK. Transcription regulatory complexes bind the human T-cell leukemia virus 5' and 3' long terminal repeats to control gene expression. *Mol Cell Biol*. 2004;24(14):6117-26.

Lenzi ME, Cuzzi-Maya T, Oliveira AL, Andrada-Serpa MJ, Araújo AQ. Dermatological findings of human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-I)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Clin Infect Dis*. 2003;36(4):507-13.

Lepoutre V, Jain P, Quann K, Wigdahl B, Khan ZK. Role of resident CNS cell populations in HTLV-1-associated neuroinflammatory disease. *Front Biosci*. 2009 Jan 1;14:1152-68.

Li HC, Biggar RJ, Miley WJ, Maloney EM, Cranston B, Hanchard B, Hisada M. Provirus load in breast milk and risk of mother-to-child transmission of human T lymphotropic virus type I. *J Infect Dis*. 2004;190(7):1275-8.

Li M, Kannian P, Yin H, Kesic M, Green PL. Human T lymphotropic virus type 1 regulatory and accessory gene transcript expression and export are not rex dependent. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2012;28(4):405-10.

Li M, Kesic M, Yin H, Yu L, Green PL. Kinetic analysis of human T-cell leukemia virus type 1 gene expression in cell culture and infected animals. *J Virol*. 2009;83(8):3788-97.

Li Q, Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2002, 2(10):725-34. Erratum in: *Nat Rev Immunol* 2002;2(12):975.

Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, Fazekas de St Groth B, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF, Bluestone JA. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med*. 2006 Jul 10;203(7):1701-11.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8.

Lundblad JR, Kwok RP, Laurance ME, Huang MS, Richards JP, Brennan RG, Goodman RH. The human T-cell leukemia virus-1 transcriptional activator Tax enhances cAMP-responsive element-binding protein (CREB) binding activity through interactions with the DNA minor groove. *J Biol Chem*. 1998 Jul 24;273(30):19251-9.

Mackay CR. Dual personality of memory T cells. *Nature*. 1999;401(6754):659-60.

Macnamara A, Rowan A, Hilburn S, Kadolsky U, Fujiwara H, Suemori K, Yasukawa M, Taylor G, Bangham CR, Asquith B. HLA class I binding of HBZ determines outcome in HTLV-1 infection. *PLoS Pathog*. 2010;6(9):e1001117.

Mahieux R, Gessain A. HTLV-1 and associated adult T-cell leukemia/lymphoma. *Rev Clin Exp Hematol*. 2003;7(4):336-61.

Mahieux R, Gessain A. HTLV-3/STLV-3 and HTLV-4 viruses: discovery, epidemiology, serology and molecular aspects. *Viruses*. 2011;3(7):1074-90.

Majorovits E, Nejmeddine M, Tanaka Y, Taylor GP, Fuller SD, Bangham CR. Human T-lymphotropic virus-1 visualized at the virological synapse by electron tomography. *PLoS One*. 2008;3(5):e2251.

Manel N, Battini JL, Taylor N, Sitbon M. HTLV-1 tropism and envelope receptor. *Oncogene*. 2005;24(39):6016-25.

Manel N, Kim FJ, Kinet S, Taylor N, Sitbon M, Battini JL. The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV. *Cell*. 2003;115(4):449-59.

Mann DL, Martin P, Hamlin-Green G, Nalewaik R, Blattner W. Virus production and spontaneous cell proliferation in HTLV-I-infected lymphocytes. *Clin Immunol Immunopathol.* 1994;72(3):312-20.

Matsumoto J, Ohshima T, Isono O, Shimotohno K. HTLV-1 HBZ suppresses AP-1 activity by impairing both the DNA-binding ability and the stability of c-Jun protein. *Oncogene.* 2005;24(6):1001-10.

Matsuoka M, Jeang KT. Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. *Nat Rev Cancer.* 2007 Apr;7(4):270-80.

Matsuzaki T, Nakagawa M, Nagai M, Usuku K, Higuchi I, Arimura K, Kubota H, Izumo S, Akiba S, Osame M. HTLV-I proviral load correlates with progression of motor disability in HAM/TSP: analysis of 239 HAM/TSP patients including 64 patients followed up for 10 years. *J Neurovirol.* 2001;7(3):228-34.

Mazurov D, Ilinskaya A, Heidecker G, Lloyd P, Derse D. Quantitative comparison of HTLV-1 and HIV-1 cell-to-cell infection with new replication dependent vectors. *PLoS Pathog.* 2010;6(2):e1000788.

Meekings KN, Leipzig J, Bushman FD, Taylor GP, Bangham CR. HTLV-1 integration into transcriptionally active genomic regions is associated with proviral expression and with HAM/TSP. *PLoS Pathog.* 2008;4(3):e1000027.

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). *Am J Ophthalmol.* 2002 Aug;134(2):190-5.

Michaëlsson J, Barbosa HM, Jordan KA, Chapman JM, Brunialti MK, Neto WK, Nukui Y, Sabino EC, Chieia MA, Oliveira AS, Nixon DF, Kallas EG. The frequency of CD127^{low} expressing CD4⁺CD25^{high} T regulatory cells is inversely correlated with human T lymphotropic virus type-1 (HTLV-1) proviral load in HTLV-1-infection and HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *BMC Immunol.* 2008 9:41.

Mitre E, Thompson RW, Carvalho EM, Nutman TB, Neva FA. Majority of interferon-gamma-producing CD4+ cells in patients infected with human T cell lymphotropic virus do not express tax protein. *J Infect Dis.* 2003;188(3):428-32.

Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A, Parizot C, Taflin C, Heike T, Valeyre D, Mathian A, Nakahata T, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M, Amoura Z, Gorochov G, Sakaguchi S. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity.* 2009 Jun 19;30(6):899-911.

Montanheiro PA, Penalva de Oliveira AC, Smid J, Fukumori LM, Olah I, da S Duarte AJ, Casseb J. The elevated interferon gamma production is an important immunological marker in HAM/TSP pathogenesis. *Scand J Immunol.* 2009;70(4):403-7.

Moriuchi M, Moriuchi H. Seminal fluid enhances replication of human T-cell leukemia virus type 1: implications for sexual transmission. *J Virol.* 2004;78(22):12709-11.

Murata K, Hayashibara T, Sugahara K, Uemura A, Yamaguchi T, Harasawa H, Hasegawa H, Tsuruda K, Okazaki T, Koji T, Miyanishi T, Yamada Y, Kamihira S. A novel alternative splicing isoform of human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor (HBZ-SI) targets distinct subnuclear localization. *J Virol.* 2006;80(5):2495-505.

Murphy EL, Friley J, Smith JW, Engstrom J, Sacher RA, Miller K, Gible J, Stevens J, Thomson R, Hansma D, Kaplan J, Khabbaz R, Nemo G. HTLV-associated myelopathy in a cohort of HTLV-I and HTLV-II-infected blood donors. The REDS investigators. *Neurology.* 1997;48(2):315-20.

Nagai M, Osame M. Human T-cell lymphotropic virus type I and neurological diseases. *J Neurovirol.* 2003;9(2):228-35.

Nagai M, Usuku K, Matsumoto W, Kodama D, Takenouchi N, Moritoyo T, Hashiguchi S, Ichinose M, Bangham CR, Izumo S, Osame M. 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 Dec;4(6):586-93.

Nascimento CR, Lima MA, de Andrada Serpa MJ, Espindola O, Leite AC, Echevarria-Lima J. Monocytes from HTLV-1-infected patients are unable to fully mature into dendritic cells. *Blood*. 2011 Jan 13;117(2):489-99. doi: 10.1182/blood-2010-03-272690.

Nejmeddine M, Bangham CR. The HTLV-1 Virological Synapse. *Viruses*. 2010;2(7):1427-47.

Nejmeddine M, Barnard AL, Tanaka Y, Taylor GP, Bangham CR. Human T-lymphotropic virus, type 1, tax protein triggers microtubule reorientation in the virological synapse. *J Biol Chem*. 2005;280(33):29653-60.

Neuveut C, Jeang KT. HTLV-I Tax and cell cycle progression. *Prog Cell Cycle Res*. 2000;4:157-62.

Nicot C, Dunder M, Johnson JM, Fullen JR, Alonzo N, Fukumoto R, Princler GL, Derse D, Misteli T, Franchini G. HTLV-1-encoded p30II is a post-transcriptional negative regulator of viral replication. *Nat Med*. 2004;10(2):197-201.

Nicot C, Harrod RL, Ciminale V, Franchini G. Human T-cell leukemia/lymphoma virus type 1 nonstructural genes and their functions. *Oncogene*. 2005;24(39):6026-34.

Oh U, Grant C, Griffith C, Fugo K, Takenouchi N, Jacobson S. Reduced Foxp3 protein expression is associated with inflammatory disease during human T-lymphotropic virus type 1 Infection. *J Infect Dis*. 2006 Jun 1;193(11):1557-66.

Olière S, Douville R, Sze A, Belgnaoui SM, Hiscott J. Modulation of innate immune responses during human T-cell leukemia virus (HTLV-1) pathogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2011;22(4):197-210.

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

Pais-Correia AM, Sachse M, Guadagnini S, Robbiati V, Lasserre R, Gessain A, Gout O, Alcover A, Thoulouze MI. Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses. *Nat Med*. 2010;16(1):83-9.

Palmer MJ, Mahajan VS, Trajman LC, Irvine DJ, Lauffenburger DA, Chen J. Interleukin-7 receptor signaling network: an integrated systems perspective. *Cell Mol Immunol*. 2008 Apr;5(2):79-89.

Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4+CD25+Foxp3+regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol*. 2007 Dec;8(12):1353-62.

Peloponese JM Jr, Kinjo T, Jeang KT. Human T-cell leukemia virus type 1 Tax and cellular transformation. *Int J Hematol*. 2007;86(2):101-6.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001 May 1;29(9):e45

Piñon JD, Klasse PJ, Jassal SR, Welson S, Weber J, Brighty DW, Sattentau QJ. Human T-cell leukemia virus type 1 envelope glycoprotein gp46 interacts with cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Virol*. 2003;77(18):9922-30.

Pise-Masison CA, Brady JN. Setting the stage for transformation: HTLV-1 Tax inhibition of p53 function. *Front Biosci*. 2005;10:919-30.

Porto AF, Neva FA, Bittencourt H, Lisboa W, Thompson R, Alcântara L, Carvalho EM. HTLV-1 decreases Th2 type of immune response in patients with strongyloidiasis. *Parasite Immunol*. 2001;23(9):503-7.

Rayne F, Kajava AV, Lalanne J, Mamoun RZ. *In vivo* homodimerisation of HTLV-1 Gag and MA gives clues to the retroviral capsid and TM envelope protein arrangement. *J Mol Biol*. 2004;343(4):903-16.

Rende F, Cavallari I, Corradin A, Silic-Benussi M, Toulza F, Toffolo GM, Tanaka Y, Jacobson S, Taylor GP, D'Agostino DM, Bangham CR, Ciminale V. Kinetics and intracellular compartmentalization of HTLV-1 gene expression: nuclear retention of HBZ mRNAs. *Blood*. 2011;117(18):4855-9.

Roncarolo MG, Bacchetta R, Bordignon C, Narula S, Levings MK. Type 1 T regulatory cells. *Immunol Rev*. 2001 Aug;182:68-79.

Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, Levings MK. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev.* 2006 Aug;212:28-50. Erratum in: *Immunol Rev.* 2006 Oct;213:257.

Roth MD. Interleukin 2 induces the expression of CD45RO and the memory phenotype by CD45RA+ peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med.* 1994 Mar 1;179(3):857-64.

Saggiaro D. Anti-apoptotic effect of Tax: an NF- κ B path or a CREB way? *Viruses.* 2011;3(7):1001-14.

Saito M, Kondo A, Kato K, Gotoh M. Bladder dysfunction due to human T-lymphotrophic virus type I associated myelopathy. *Br J Urol.* 1991;68(4):365-8.

Saito M, Matsuzaki T, Satou Y, Yasunaga J, Saito K, Arimura K, Matsuoka M, Ohara Y. *In vivo* expression of the HBZ gene of HTLV-1 correlates with proviral load, inflammatory markers and disease severity in HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *Retrovirology.* 2009;6:19.

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 1995 Aug 1;155(3):1151-64.

Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell.* 2008;133(5):775-87.

Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol.* 2005 Apr;6(4):345-52.

Satou Y, Utsunomiya A, Tanabe J, Nakagawa M, Nosaka K, Matsuoka M. HTLV-1 modulates the frequency and phenotype of FoxP3+CD4+ T cells in virus-infected individuals. *Retrovirology.* 2012 May 30;9:46.

Satou Y, Yasunaga J, Yoshida M, Matsuoka M. HTLV-I basic leucine zipper factor gene mRNA supports proliferation of adult T cell leukemia cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(3):720-5.

Satou Y, Yasunaga J, Zhao T, Yoshida M, Miyazato P, Takai K, Shimizu K, Ohshima K, Green PL, Ohkura N, Yamaguchi T, Ono M, Sakaguchi S, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor induces T-cell lymphoma and systemic inflammation *in vivo*. *PLoS Pathog*. 2011;7(2):e1001274.

Schavinsky-Khrapunsky Y, Priel E, Aboud M. Dose-dependent dual effect of HTLV-1 tax oncoprotein on p53-dependent nucleotide excision repair in human T-cells. *Int J Cancer*. 2008;122(2):305-16.

Schor D. Determinação da frequência dos alelos de HLA-I e HLA-II e do polimorfismo dos genes para as citocinas IL-6, IL-10, IFN- γ , TGF- β e TNF- α em indivíduos infectados por HTLV-1. Tese apresentada ao Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas da Fundação Oswaldo Cruz para obtenção do grau de Doutor em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, 2013.

Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, Landay A, Solomon M, Selby W, Alexander SI, Nanan R, Kelleher A, Fazekas de St Groth B. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med*. 2006 Jul 10;203(7):1693-700

Semmes OJ, Jeang KT. Localization of human T-cell leukemia virus type 1 tax to subnuclear compartments that overlap with interchromatin speckles. *J Virol*. 1996;70(9):6347-57.

Shevach EM. From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity*. 2006 25(2):195-201.

Silva MT, Harab RC, Leite AC, Schor D, Araújo A, Andrada-Serpa MJ. Human Tlymphotropic 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(5):689-92.

Silva MT, Mattos P, Alfano A, Araújo AQ. Neuropsychological assessment in HTLV-1 infection: a comparative study among TSP/HAM, asymptomatic carriers, and healthy controls. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2003;74(8):1085-9.

Smith MR, Greene WC. Characterization of a novel nuclear localization signal in the HTLV-I tax transactivator protein. *Virology*. 1992;187(1):316-20.

Sojka DK, Huang YH, Fowell DJ. Mechanisms of regulatory T-cell suppression – a diverse arsenal for a moving target. *Immunology*. 2008 May;124(1):13-22.

Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell*. 1998;92(6):735-45.

Starling AL, Martins-Filho OA, Lambertucci JR, Labanca L, de Souza Pereira SR, Teixeira-Carvalho A, Martins ML, Ribas JG, Carneiro-Proietti AB, Gonçalves DU. Proviral load and the balance of serum cytokines in HTLV-1-asymptomatic infection and in HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *Acta Trop*. 2013;125(1):75-81.

Stoppa G, Rumiato E, Saggiaro D. Ras signaling contributes to survival of human T-cell leukemia/lymphoma virus type 1 (HTLV-1) Tax-positive T-cells. *Apoptosis*. 2012;17(3):219-28.

Sun SC, Yamaoka S. Activation of NF-kappaB by HTLV-I and implications for cell transformation. *Oncogene*. 2005;24(39):5952-64.

Takenouchi N, Jones KS, Lisinski I, Fugo K, Yao K, Cushman SW, Ruscetti FW, Jacobson S. GLUT1 is not the primary binding receptor but is associated with cell-to-cell transmission of human T-cell leukemia virus type 1. *J Virol*. 2007;81(3):1506-10.

Tang Q, Bluestone JA. The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat Immunol*. 2008 Mar;9(3):239-44.

Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(3):231-41.

Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation *in vitro* by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med*. 1998 Jul 20;188(2):287-96.

Tosi P, Kraft R, Luzi P, Cintonino M, Fankhauser G, Hess MW, Cottier H. Involution patterns of the human thymus. I Size of the cortical area as a function of age. *Clin Exp Immunol*. 1982 Feb;47(2):497-504.

Toulza F, Heaps A, Tanaka Y, Taylor GP, Bangham CR. High frequency of CD4+FoxP3+ cells in HTLV-1 infection: inverse correlation with HTLV-1-specific CTL response. *Blood*. 2008;111(10):5047-53.

Toulza F, Nosaka K, Tanaka Y, Schioppa T, Balkwill F, Taylor GP, Bangham CR. Human T-lymphotropic virus type 1-induced CC chemokine ligand 22 maintains a high frequency of functional FoxP3+ regulatory T cells. *J Immunol*. 2010;185(1):183-9.

Uchiyama T, Yodoi J, Sagawa K, Takatsuki K, Uchino H. Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood*. 1977;50(3):481-92.

Uchiyama T. Human T cell leukemia virus type I (HTLV-I) and human diseases. *Annu Rev Immunol*. 1997;15:15-37.

Ureta-Vidal A, Angelin-Duclos C, Tortevoeye P, Murphy E, Lepère JF, Buigues RP, Jolly N, Joubert M, Carles G, Pouliquen JF, de Thé G, Moreau JP, Gessain A. Mother-to-child transmission of human T-cell-leukemia/lymphoma virus type I: implication of high antiviral antibody titer and high proviral load in carrier mothers. *Int J Cancer*. 1999;82(6):832-6.

Usui T, Yanagihara K, Tsukasaki K, Murata K, Hasegawa H, Yamada Y, Kamihira S. Characteristic expression of HTLV-1 basic zipper factor (HBZ) transcripts in HTLV-1 provirus-positive cells. *Retrovirology*. 2008;5:34.

Vajente N, Trevisan R, Saggiaro D. HTLV-1 Tax protein cooperates with Ras in protecting cells from apoptosis. *Apoptosis*. 2009;14(2):153-63.

Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:693-733.

Van Dooren S, Pybus OG, Salemi M, Liu HF, Goubau P, Remondegui C, Talarmin A, Gotuzzo E, Alcantara LC, Galvão-Castro B, Vandamme AM. The low evolutionary rate of human T-cell lymphotropic virus type-1 confirmed by analysis of vertical transmission chains. *Mol Biol Evol.* 2004;21(3):603-11.

Vieira PL, Christensen JR, Minaee S, O'Neill EJ, Barrat FJ, Boonstra A, Barthlott T, Stockinger B, Wraith DC, O'Garra A. IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol.* 2004 May 15;172(10):5986-93.

Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(7):523-32.

Vukmanovic-Stejić M, Zhang Y, Cook JE, Fletcher JM, McQuaid A, Masters JE, Rustin MH, Taams LS, Beverley PC, Macallan DC, Akbar AN. Human CD4+ CD25hi Foxp3+ regulatory T cells are derived by rapid turnover of memory populations *in vivo*. *J Clin Invest.* 2006 Sep;116(9):2423-33. Erratum in: *J Clin Invest.* 2006 Oct;116(10):2829-30.

Wattel E, Cavrois M, Gessain A, Wain-Hobson S. Clonal expansion of infected cells: a way of life for HTLV-I. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1996;13 Suppl 1:S92-9.

Wolfe ND, Heneine W, Carr JK, Garcia AD, Shanmugam V, Tamoufe U, Torimiro JN, Prosser AT, Lebreton M, Mpoudi-Ngole E, McCutchan FE, Birx DL, Folks TM, Burke DS, Switzer WM. Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(22):7994-9.

Workman CJ, Szymczak-Workman AL, Collison LW, Pillai MR, Vignali DA. The development and function of regulatory T cells. *Cell Mol Life Sci.* 2009 66(16):2603-22.

Wu K, Bottazzi ME, de la Fuente C, Deng L, Gitlin SD, Maddukuri A, Dadgar S, Li H, Vertes A, Pumfery A, Kashanchi F. Protein profile of tax-associated complexes. *J Biol Chem.* 2004;279(1):495-508.

Yamagiwa S, Gray JD, Hashimoto S, Horwitz DA. A role for TGF-beta in the generation and expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells from human peripheral blood. *J Immunol.* 2001 Jun 15;166(12):7282-9.

Yamamoto N, Okada M, Koyanagi Y, Kannagi M, Hinuma Y. Transformation of human leukocytes by cocultivation with an adult T cell leukemia virus producer cell line. *Science.* 1982;217(4561):737-9.

Yamano Y, Araya N, Sato T, Utsunomiya A, Azakami K, Hasegawa D, Izumi T, Fujita H, Aratani S, Yagishita N, Fujii R, Nishioka K, Jacobson S, Nakajima T. Abnormally high levels of virus-infected IFN-gamma+ CCR4+ CD4+ CD25+ T cells in a retrovirus-associated neuroinflammatory disorder. *PLoS One.* 2009 Aug 5;4(8):e6517.

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

Ye J, Silverman L, Lairmore MD, Green PL. HTLV-1 Rex is required for viral spread and persistence *in vivo* but is dispensable for cellular immortalization *in vitro*. *Blood.* 2003;102(12):3963-9.

Yoshida M, Satou Y, Yasunaga J, Fujisawa J, Matsuoka M. Transcriptional control of spliced and unspliced human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor (HBZ) gene. *J Virol.* 2008;82(19):9359-68.

Yoshida M. Discovery of HTLV-1, the first human retrovirus, its unique regulatory mechanisms, and insights into pathogenesis. *Oncogene.* 2005;24(39):5931-7.

Younis I, Green PL. The human T-cell leukemia virus Rex protein. *Front Biosci.* 2005;10:431-45.

Zhao T, Matsuoka M. HBZ and its roles in HTLV-1 oncogenesis. *Front Microbiol.* 2012;3:247.

Zhao T, Satou Y, Sugata K, Miyazato P, Green PL, Imamura T, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor enhances TGF- β signaling through p300 coactivator. *Blood.* 2011;118(7):1865-76.

Zhao T, Yasunaga J, Satou Y, Nakao M, Takahashi M, Fujii M, Matsuoka M. Human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor selectively suppresses the classical pathway of NF-kappaB. *Blood.* 2009;113(12):2755-64.

Zoubak S, Richardson JH, Rynditch A, Höllsberg P, Hafler DA, Boeri E, Lever AM, Bernardi G. Regional specificity of HTLV-I proviral integration in the human genome. *Gene* 1994;143(2):155-63.

ANEXO I: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

INSTITUIÇÃO: Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC)
Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) – RJ

TÍTULO DO PROJETO: Estudo de marcadores biológicos de desenvolvimento de doenças em indivíduos infectados pelo vírus linfotrópico para células T humanas do tipo I (HTLV-1).

COORDENADOR DO PROJETO: Maria José de Andrada-Serpa, MD, PhD

Eu, _____, declaro que sou voluntário no estudo sobre a determinação de marcadores biológicos para o desenvolvimento de doença em indivíduos infectados pelo vírus linfotrópico para células T humanas do tipo I (HTLV-1). Fui informado que este estudo visa obter conhecimentos sobre a evolução da infecção pelo HTLV e tentar determinar possíveis marcadores biológicos, isto é, exames laboratoriais que possam avaliar o desenvolvimento de doenças associadas ao HTLV-1. A identificação desses marcadores poderá auxiliar no acompanhamento dos pacientes com esta infecção.

A minha participação é inteiramente voluntária e caso não queira participar, isto de forma alguma afetará meu atendimento no IPEC.

Os resultados são confidenciais e serão fornecidos somente ao interessado, sendo arquivados no Laboratório de Virologia, sob responsabilidade da Dra. Maria José de Andrada-Serpa. Os resultados deste estudo poderão não me beneficiar diretamente, mas poderão fornecer subsídios para um maior conhecimento sobre a infecção pelo HTLV e serão divulgados na forma de comunicação científica, não sendo permitido divulgar a minha identidade.

Declaro que fui informado de que:

1. Poderei recusar-me a participar da pesquisa, sem que este fato me venha a causar qualquer constrangimento e que o meu atendimento clínico em nada será modificado pela minha recusa;
2. Os exames aplicados serão gratuitos;
3. Antes de assinar este Termo, devo ser informado plenamente sobre a pesquisa, não hesitando em fazer perguntas de qualquer natureza que julgar conveniente esclarecer;
4. Este projeto visa tentar identificar marcadores biológicos que possam estar relacionados com a presença de doenças associadas ao HTLV-1;
5. Nesta investigação serão coletados de 20 a 30mL de sangue. O sangue será colhido assepticamente por punção de uma veia do braço. Este procedimento será realizado junto com a coleta dos exames de rotina, não implicando em uma punção venosa separada. A coleta de sangue é um exame seguro, podendo causar pequeno desconforto, como um pequeno hematoma, ou seja, extravasamento de sangue da veia para o tecido, no local da punção;
6. Esta pesquisa poderá não trazer benefícios imediatos para o meu acompanhamento clínico, mas trará um maior conhecimento a respeito da infecção por HTLV-1;
7. O material biológico coletado, após exames, será estocado, podendo ser usado posteriormente, em outras pesquisas com fins semelhantes, mas somente após a avaliação, pelo Comitê de Ética em Pesquisa, mantendo sempre a identidade do doador em sigilo. O material biológico estocado ficará sob a responsabilidade do coordenador do projeto.

Declaro estar ciente do inteiro teor deste Termo de Consentimento, decidindo-me participar da investigação proposta, depois de ter formulado perguntas e de ter recebido respostas satisfatórias a todas elas, e ciente de que poderei voltar a fazê-las a qualquer momento.

Declaro dar meu consentimento para participar deste estudo recebendo uma cópia do Termo de Consentimento, e estando ciente, de que a outra cópia será arquivada sob a responsabilidade do Serviço de Virologia do IPEC.

Local: _____ Data: _____

Nome completo do voluntário: _____

Endereço: _____

Assinatura do participante

Nome do médico responsável: _____

Assinatura do médico

Médicos Responsáveis pelo Atendimento: Maria José de Andrada-Serpa, IPEC
Ana Cláudia Leite, IPEC
Abelardo Araújo, IPEC
Marcus Tullius Teixeira da Silva, IPEC
Marco Antonio Lima, IPEC

Coordenador do Projeto: Maria José de Andrada-Serpa, IPEC

Assinatura do coordenador

Telefone para contato: 3865 9595 ramal:9543 e 9608