

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
DOUTORADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE**

HEYTOR VICTOR PEREIRA DA COSTA NECO

**ANÁLISE DA PARTICIPAÇÃO DE CÉLULAS T CD4⁺ (Th1, Th17 e Th22) e T CD8⁺ NA
INFECÇÃO PELO VÍRUS LINFOTRÓPICO DA CÉLULA T HUMANA TIPO 1 (HTLV-1)**

RECIFE

2019

HEYTOR VICTOR PEREIRA DA COSTA NECO

**ANÁLISE DA PARTICIPAÇÃO DE CÉLULAS T CD4⁺ (Th1, Th17 e Th22) e T CD8⁺ NA
INFECÇÃO PELO VÍRUS LINFOTRÓPICO DA CÉLULA T HUMANA TIPO 1 (HTLV-1)**

Tese apresentada ao curso de doutorado em
Biociências e Biotecnologia em Saúde, do
Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo
Cruz, como requisito para a obtenção do título
de Doutor em Ciências.

Orientadora: Dr^a. Clarice Neuenschwander Lins de Morais

Coorientadoras: Dr^a. Patrícia Muniz Mendes Freire de
Moura

Dr^a. Virgínia Maria Barros de Lorena

Recife

2019

HEYTOR VICTOR PEREIRA DA COSTA NECO

ANÁLISE DA PARTICIPAÇÃO DE CÉLULAS T CD4⁺ (Th1, Th17 e Th22) e T CD8⁺ NA INFECÇÃO PELO VÍRUS LINFOTRÓPICO DA CÉLULA T HUMANA TIPO 1 (HTLV-1)

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde, do Instituto Aggeu Magalhães, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências, para avaliação pela seguinte banca examinadora:

Data de aprovação: 19/03/2019

BANCA EXAMINADORA

Dr^a Clarice Neuenschwander Lins de Moraes

Instituto Aggeu Magalhães, Departamento de Virologia e Terapia Experimental

Dr^a Sheilla Andrade de Oliveira

Instituto Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz

Dr^a Milena de Paiva Cavalcanti

Instituto Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz

Dr^a Joelma Rodrigues de Souza

Departamento de Fisiologia e Patologia / Universidade Federal da Paraíba,

Dr^a Isabelle Freire Tabosa Viana

Instituto Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz

Catálogo na fonte: Biblioteca do Instituto Aggeu Magalhães

- N368a Neco, Heytor Victor Pereira da Costa.
Análise da Participação de Células T CD4+ (Th1, Th17 e Th22) e T CD8+ na Infecção Pelo Vírus Linfotrópico da Célula T Humana Tipo 1 (HTLV-1) / Heytor Victor Pereira da Costa Neco. - Recife: [s.n.], 2019.
104 p. : il., graf., tab. ; 30 cm
- Tese (doutorado em biociências e biotecnologia em saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2019.
Orientadora: Clarice Neuenschwander Lins de Moraes; coorientadoras: Patrícia Muniz Mendes Freire de Moura, Virgínia Maria Barros de Lorena.
1. Vírus Linfotrópico de Células T Humanas Tipo 1 – imunologia. 2. Infecções por HTLV-I – imunologia. 3. Interleucina-17 – imunologia. 4. Paraparesia Espástica Tropical – imunologia. I. Moraes, Clarice Neuenschwander Lins de. II. Moura, Patrícia Muniz Mendes Freire de. III. Lorena, Virgínia Maria Barros de. IV. Título.

Ao meu avô, Heleno Neco (*in memoriam*).

Aos meus pais, Bernadete e Severino.

Aos meus amores, Elisângela, Malu, Hugo e Helloysa.

Aos portadores do vírus HTLV.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela vida, pelas pessoas que ele colocou em meu caminho e por me mostrar o quanto sou forte quando me senti tão fraco. Essa tese me comprova mais do que nunca o quanto fé e ciência andam misteriosamente juntas.

Agradeço à Clarice Morais, minha orientadora, por todo o esforço durante a realização de nossos projetos, por apoiar minhas ideias e me ajudar a não desistir cada vez que eu lia um “Não!” de uma revista, recusando algum artigo nosso. Obrigado por acreditar e apostar em mim! Sua capacidade de lidar com diferentes pessoas é incrível e poder crescer sem me sentir “enjaulado” cientificamente ou na vida permitiram que o doutorado passasse, de certa forma, mais leve.

À Virgínia Lorena, minha coorientadora, agradeço pela disponibilidade, por me ensinar grande parte do que sei de citometria e pelo carinho ao me ouvir e aconselhar. Só sabe a energia que a sala dela tem quem já a procurou para conversar. O sorriso de Vi sempre é aquele que traz esperança e, mesmo tudo parecendo errado, você fica com a sensação de que vai dar certo.

À Patrícia Moura, também minha coorientadora e criadora desse grupo de pesquisa incrível, agradeço pelas oportunidades de conversar com alguém tão inteligente e por pensar “fora da caixa” tantas vezes. O bom pesquisador e o bom cientista é aquele que não se satisfaz puramente com a pesquisa científica, mas se preocupa em como passa-la e esse lado de extensão de Paty é inspirador!

À Ana Carolina Lemos da Trindade, vulgo Annie, tenho que agradecer por todo o esforço conjunto no desenvolvimento de nossos projetos. Enquanto tudo dava errado para mim que estava prestes a qualificar, tudo dava errado para ela, prestes a defender, mas como bons amigos, a persistência dos dois não permitiu que nenhum de nós desistisse. Muito obrigado por todos os momentos desesperadores na bancada, por coletar sangue dos seus avós para nossas padronizações e por todos os congressos divertidos que já fomos.

À Vanessa Teixeira, Vannie, agradeço pela parceria que montamos desde que entrei no grupo. É muito bom poder contar com uma pessoa globalizada, esforçada e dedicada. A grande responsável por ensinar estatística à metade das pessoas do grupo é você e teu esforço e vai te levar cada vez mais longe.

À Maria Eduarda (PM Duda) e Lara Michelle (Mitchell), nossas ex-estudantes de iniciação científica que tanto se dedicaram no andamento dos projetos. Sem vocês, jamais seria possível concluir essa tese. Foi fundamental tê-las ao meu lado rindo, me “*trollando*”, mas sempre sem perder o compromisso com nossa ciência. Jamais vou esquecer da etapa 14 do protocolo, o tão esperado *coffee break*. O sucesso de vocês já está mais do que garantido, seja como policial militar ou como sanitarista.

Agradeço também à Mycaella Pontes, atual estudante de iniciação científica e a primeira que realmente tive o prazer de orientar diretamente. Chegou o tempo em que você é imprescindível na realização do nosso projeto. Ver seu crescimento ao longo desses quase dois anos é incrível, já trazendo prêmios para o nosso grupo e buscando o amadurecimento profissional. Agradeço também à Juliana Magalhães e Rafael Péricles pelo apoio nas coletas e na realização de outros projetos do nosso grupo.

Mais ainda, tenho que agradecer àqueles que não estavam comigo nos momentos de experimento, diretamente, mas que estavam me sustentando nos momentos de tensão. Raul Emídio, Ana Virgínia (Aninha) e Lígia Figueiredo, sem vocês o doutorado seria muito pesado! É bom ter com quem contar a qualquer momento, seja nas frustrações ou comemorações dos nossos sucessos.

Agradeço à Elisângela Silva, minha Lis, minha namorada (agora noiva, após esse pedido de casamento ao fim da defesa), que abraçou minha pesquisa comigo e entendeu cada momento em que não pudemos nos divertir ou viajar por conta de um experimento ou dia de aula. Sem você, essa tese jamais seria possível e te agradeço por cada “Amor, vai precisar de ajuda?” quando me via sem tempo, fosse pra organizar algo ou imprimir essas cópias da tese. Obrigado por me fazer sentir o “Eureka!” científico cada vez que eu desacreditei dos meus dados. Te amo muito!

Agradeço aos meus pais por confiarem em mim. A confiança de vocês foi o que me permitiu andar um pouco mais longe com meus próprios pés. Sentir na pele que vocês têm orgulho de mim me motiva a não os decepcionar e a criar propósitos para a melhoria do mundo. Amo vocês e obrigado por me permitir viver e dar a chance de conhecer as melhores pessoas do mundo, meus irmãos e minha sobrinha, a quem agradeço por todo encorajamento.

O Instituto Aggeu Magalhães me permitiu conhecer pessoas incríveis. Agradeço a essa instituição pela estrutura, pelo compromisso com a sociedade e por me dar a oportunidade de

realizar sonhos e conquistar amigos que levarei sempre comigo: Elisa, Renan GG, Veruska, Savio, João, Leo e Gabriel. Obrigado por todos os momentos de descontração!

Agradeço aos indivíduos portadores do HTLV-1 e à médica do nosso grupo, Paula Magalhães, por acreditarem em nossa pesquisa e propósito em querer trazer respostas para essa parte da população.

Agradeço também a todos os membros da banca, pela disposição em aceitar avaliar nossa pesquisa. Seu compromisso me motiva a deixar a tese escrita de maneira mais clara possível e, com suas considerações, a ciência será divulgada da maneira mais correta, eficaz e impactante.

*“A ciência se compõe de erros
que, por sua vez, são os passos
até a verdade”*

(Júlio Verne)

NECO, Heytor Victor Pereira da Costa. **Análise da Participação de Células T CD4⁺ (Th1, Th17 e Th22) e T CD8⁺ na Infecção Pelo Vírus Linfotrópico da Célula T Humana Tipo 1 (HTLV-1)**. 2019. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2019.

RESUMO

O HTLV-1 é um retrovírus presente em aproximadamente 10 a 20 milhões de pessoas mundialmente, causando uma doença neurodegenerativa em 5% dos infectados. A resposta imunológica do hospedeiro pode ser o fator desencadeante das doenças relacionadas ao vírus. Assim, novas subpopulações de células T CD4⁺ (Th17 e Th22), que já foram associadas a doenças inflamatórias, podem ter papel na patogenia de doenças relacionadas ao vírus, como a paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1 (HAM/TSP), assim como subpopulações de células T CD8⁺ (Tc1 e IFN- γ ⁺ PD-1⁺). Este estudo teve o objetivo de analisar a participação das células T CD4⁺ (Th1, Th17 e Th22) e T CD8⁺ na sintomatologia de indivíduos infectados pelo HTLV-1. Células mononucleares de 18 indivíduos HAM/TSP e 30 portadores assintomáticos não-HAM (ANH) foram isoladas e estimuladas com phytohemaglutinina (PHA) por 24h. As frequências celulares foram determinadas por citometria de fluxo e níveis plasmáticos de citocinas e quimiocinas foram dosados por *Cytometric Bead Array* (CBA). As frequências das subpopulações T CD4⁺ e T CD8⁺ foram similares entre os grupos. Porém, com a estratificação dos ANH, baseada em outras manifestações clínicas, se observou que o grupo lombalgia apresentou frequências elevadas de Th17 IL-22⁺ em relação à HAM/TSP e assintomáticos (PA) (p=0,004). Homens infectados apresentaram maiores frequências das subpopulações Th17 em relação a mulheres infectadas (p=0,04). Altos níveis de CXCL9 (p=0,02) e CXCL10 (p=0,0004) foram encontrados no grupo HAM/TSP. Os resultados sugerem envolvimento de IL-17 e IL-22, além de haver modulação nas subpopulações de acordo com o gênero. Assim, as células estudadas podem desempenhar funções na imunopatogênese da HAM/TSP. Entretanto, mais estudos são necessários para entender como essas populações celulares e níveis de citocinas produzidos por elas influenciam na HAM/TSP, ou na instalação de outras manifestações inflamatórias associadas ao HTLV-1.

Palavras-chave: Vírus Linfotrópico de Células T Humanas Tipo 1 – imunologia. Infecções por HTLV-I – imunologia. Interleucina-17 – imunologia. Paraparesia Espástica Tropical – imunologia.

NECO, Heytor Victor Pereira da Costa. **Analysis of CD4⁺ (Th1, Th17 and Th22) and CD8⁺ T-cells Involvement in Infection by Human T-Cell Leukemia Virus-1 (HTLV-1)**. 2019. Thesis (PhD in Bioscience and Biotechnology on Health) – Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, 2019.

ABSTRACT

HTLV-1 is a retrovirus present in approximately 10 to 20 million people worldwide, causing a neurodegenerative disease in 5% of carriers. The host immune response may be the triggering factor for virus-related diseases. Thus, new subpopulations of CD4⁺ T cells (Th17 and Th22), which have already been associated with inflammatory diseases, may play a role in pathogenesis of virus-related diseases, such as tropical spastic paraparesis/HTLV-1 associated myelopathy (HAM/TSP), as well as subpopulations of CD8⁺ T cells (Tc1 and IFN- γ ⁺ PD-1⁺). This study aimed to analyze the participation of CD4⁺(Th1, Th17 and Th22) and CD8⁺ T cells in the symptomology of HTLV-1 infected individuals. Mononuclear cells from 18 HAM/TSP individuals and 30 non-HAM asymptomatic carriers (NHA) were isolated and stimulated with phytohemagglutinin (PHA) for 24h. Cellular frequencies were determined by flow cytometry and plasma levels of cytokines and chemokines were measured by Cytometric Bead Array (CBA). The frequencies of CD4⁺ and CD8⁺T cell subpopulations were similar among groups. However, with NHA stratification based on other clinical manifestations, it was observed that the low back pain group presented higher frequencies of Th17 IL-22⁺ when compared with HAM/TSP and asymptomatic (PA) groups ($p = 0.004$) patients compared to HAM/TSP and AC ($p=0.004$). HTLV-1-infected men had higher frequencies of Th17 subpopulations compared to infected women ($p=0.04$). Higher levels of CXCL9 ($p=0.02$) and CXCL10 ($p=0.0004$) were found in HAM/TSP group. The results suggest a IL-17 and IL-22 participation, in addition to modulation in subpopulations according to gender. Thus, the cells studied may play a role in HAM/TSP immunopathogenesis. However, more studies are needed to understand how these subpopulations and levels of cytokines produced by them influence HAM/TSP, or the establishment of other inflammatory manifestations associated with HTLV-1.

Keywords: Human T-lymphotropic virus 1 – immunology. HTLV-I Infections – immunology. Interleukin-17 – immunology. Paraparesis, Tropical Spastic – immunology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Estrutura e genoma do HTLV-1	23
Figura 2	Ciclo de Replicação do HTLV-1	25
Figura 3	Propagação do HTLV-1 através da infecção <i>de novo</i>	27
Figura 4	Prevalência do HTLV-1 no mundo	29
Figura 5	Prevalências do HTLV no Brasil de 1989 a 1996	30
Figura 6	Hipóteses de desenvolvimento da HAM/TSP pelo HTLV-1	35
Figura 7	Citocinas e receptores da Família IL-17	38
Figura 8	Consequências funcionais da via IL-22-IL-22R	41
Figura 9	Número de amostra de acordo com os estudos	46
Quadro 1	Anticorpos utilizados nos experimentos de Citometria de Fluxo	49
Figura 10	Estratégia de análise das subpopulações estudadas	51
Quadro 2	Protocolo de preparação do CBA para citocinas e quimiocinas	52
Quadro 3	Protocolo da PCR em Tempo Real para quantificação da carga proviral	53
Figura 11	Frequência das células Th17 circulantes	55
Figura 12	Frequência das células Th17/Th1 circulantes	56
Figura 13	Frequência das células Th22 circulantes	56
Figura 14	Frequência das células Th1 IL-22 ⁺ e CD4 ⁺ IFN- γ ⁺ circulantes	57
Figura 15	Frequência das células T CD8 ⁺ circulantes	58
Figura 16	Correlações encontradas entre as frequências dos diferentes subtipos celulares	59
Figura 17	Frequência das células Th17 total após estratificação do grupo assintomático não-HAM	60
Figura 18	Frequência das células Th17/22 após estratificação do grupo assintomático não-HAM	60
Figura 19	Frequência das células Th17/Th1 após estratificação do grupo assintomático não-HAM	61
Figura 20	Frequência das células Th22 após estratificação do grupo assintomático não-HAM	61

Figura 21	Frequência das células Th1/22 e CD4 ⁺ IFN- γ ⁺ após estratificação do grupo assintomático não-HAM	62
Figura 22	Frequência das células do painel de T CD8 ⁺ após estratificação dos assintomáticos não-HAM	62
Figura 23	Frequências celulares de Th17 de acordo com o gênero	63
Figura 24	Frequências das células Th22, Th1 produtoras de IL-22 e CD4 ⁺ IFN- γ ⁺ de acordo com o gênero	64
Figura 25	Frequências celulares das células T CD8 ⁺ de acordo com o gênero	65
Figura 26	Níveis plasmáticos das citocinas dos perfis Th1 e Th2 nos indivíduos sintomáticos, assintomáticos e controles	66
Figura 27	Correlações entre as citocinas plasmáticas nos grupos HAM/TSP e assintomáticos	67
Figura 28	Níveis de quimiocinas plasmáticas detectados nos grupos estudados	68
Figura 29	Correlações entre os níveis de quimiocinas no plasma dos grupos HAM/TSP e assintomáticos	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Allo-SCT	Células-tronco Alogênicas
AMPc	Adenosina Monofosfato Cíclico
APC	Allophycocyanin
ATF	<i>Activating transcription fator</i>
ATLL	<i>Adult T-cell leukemia/lymphoma</i>
bZIP	Zíper de Leucina Básico
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CBP	<i>CREB-binding protein</i>
CCL	<i>Chemokine (C-C motif) Ligand</i>
CCR4	<i>C-C Chemokine Receptor type 4</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CMV	Citomegalovirus
CRE	Elemento de Resposta a Adenosina Monofosfato Cíclico
CREB	Proteína de ligação elemento de resposta da Adenosina Monofosfato Cíclico
CSF	Fluido Cérebro-espinhal
CTLA	<i>Cytotoxic T Lymphocyte Antigen</i>
CXCL	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EBV	Vírus Epstein-Barr
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ERKO	<i>Estrogen Receptor Knockout Mice</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
FoxP3	<i>Forkhead Box P3</i>
GLUT1	Transportador de Glicose 1
GVHD	Doença do Enxerto Versus Hospedeiro
HAM/TSP	<i>Tropical Spastic Paraparesis / Myelopathy Associated HTLV-1</i>
HBZ	Fator de Zíper de Leucina Básico do HTLV

HCV	Vírus da Hepatite C
HEMOPE	Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
hnRNP-A1	Ribonucleoproteína nuclear heterogênea
HSPG	Proteoglicanos de Heparan Sulfato
hTERT	Telomerase Transcriptase Reversa Humana
HTLV	Vírus Linfotrópico da Célula T Humana
HUOC	Hospital Universitário Oswaldo Cruz
IAM	Instituto Aggeu Magalhães
ICAM-1	Molécula de Adesão Intercelular 1
IFN- γ	Interferon Gama
IL	Interleucina
IRF3	Fator Regulador de Interferon
Kb	Kilobase
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública de Pernambuco
LBMV	Laboratório de Biologia Molecular de Vírus
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
LFA-1	Antígeno Associado à Função Leucocitária Tipo 1
LIBM	Laboratório de Imunopatologia e Biologia Molecular
LTR	Longas Terminações Repetidas
MIP	Proteínas Induzidas por Macrófagos/Monócitos
NF-kB	Fator Nuclear Kappa B
NPT	Núcleo de Plataformas Tecnológicas
OAS3	<i>2'-5'-Oligoadenylate Synthetase 3</i>
OASL	<i>Oligoadenylate synthetases-like protein</i>
PAF	Fator de Ativação de Plaquetas
PBMC	Células Mononucleares do Sangue Periférico
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PD-1	Proteína de morte nuclear programada 1
PE	<i>Phycoerythrin</i>
PDL-1	<i>Programmed death-ligand 1</i>
PE-Cy7	<i>PE (phycoerythrin)-Cy7</i>

PET/MAH	Paraparesia Espástica Tropical/Mielopatia Associada ao HTLV-1
PROCAPE	Pronto-Socorro Cardiológico Universitário de Pernambuco Prof. Luiz Tavares
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAm	RNA mensageiro
SNP	Polimorfismo de Base Única
STLV	Vírus Linfotrópico da Célula T dos Símios
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF- β	Fator de transformação do crescimento
Th	<i>T helper</i>
Tim-3	<i>T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3</i>
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
UPE	Universidade de Pernambuco
WB	<i>Western Blot</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1 Vírus Linfotrópicos da Célula T Humana (HTLV)	21
2.1.1 Estrutura Viral	22
2.1.2 Infecção e Ciclo de Replicação	24
2.1.3 Transmissão	27
2.2 Epidemiologia do HTLV-1	28
2.2.1 Epidemiologia no Mundo	28
2.2.2 Epidemiologia no Brasil	29
2.3 Doenças Associadas ao HTLV-1	31
2.3.1 Leucemia/Linfoma de Células T do Adulto (ATLL)	32
2.3.2 Paraparesia Espástica Tropical/Mielopatia Associada ao HTLV-1 (HAM/TSP)	33
2.4 Aspectos Imunológicos da Infecção pelo HTLV-1	36
2.4.1 Resposta Th1 na Infecção pelo HTLV-1	36
2.4.2 Resposta Th17 na Infecção pelo HTLV-1	37
2.4.2.1 Interleucina 17-A (IL-17A)	39
2.4.2.2 Interleucinas 17B, 17C e 17D (IL-17B, IL-17C e IL-17D)	39
2.4.2.3 Interleucinas 17E (IL-17E)	39
2.4.2.4 Interleucinas 17F (IL-17F)	40
2.4.3 Células Th22 e doenças inflamatórias	40
2.4.4 Células T CD8 ⁺ na Infecção pelo HTLV-1	41
3 JUSTIFICATIVA	44
4 OBJETIVO GERAL	45
4.1 Objetivos Específicos	45
5 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	46
5.1 População Estudada	46
5.2 Local	47
5.3 Coleta e Processamento das Amostras	47
5.4 Grupos do Estudo	47
5.4.1 Critérios de Inclusão	48

5.4.2 Critérios de Exclusão	48
5.5 Coleta de Sangue e Obtenção das Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMCs)	48
5.6 Citometria de Fluxo	49
5.6.1 Marcação de Superfície	49
5.6.2 Marcação de Citocinas Intracelulares	50
5.6.3 Estratégia de Análise	50
5.7 Quantificação de Mediadores Solúveis – Citocinas e Quimiocinas	51
5.8 Quantificação da Carga Proviral	52
5.9 Análises Estatísticas	53
5.10 Considerações Éticas	53
6 RESULTADOS	54
6.1 HAM/TSP x Assintomáticos	55
6.1.1 As frequências das subpopulações de Células Th17 são similares entre indivíduos HAM/TSP e assintomáticos não-HAM	55
6.1.2 As frequências das Células Th22 não diferem entre indivíduos HAM/TSP e assintomáticos não-HAM	56
6.1.3 As Células Th1 IL-22 ⁺ e Th1 apresentam frequências similares entre indivíduos HAM/TSP e assintomáticos não-HAM	57
6.1.4 As Células Tc1, CD8 ⁺ PD-1 ⁺ e CD8 ⁺ PD-1 ⁺ IFN- γ ⁺ apresentam frequências similares entre indivíduos HAM/TSP e assintomáticos não-HAM	57
6.1.5 Populações produtoras de IL-22 estão correlacionadas com subpopulações de Th17	59
6.2 HAM/TSP x Outras Manifestações Clínicas x Assintomáticos 2	59
6.2.1 Frequências de células Th17 IL-22 ⁺ estão elevadas em indivíduos com lombalgia	59
6.2.2 Frequência de células Th22 não difere entre HAM/TSP, assintomáticos 2 ou outras manifestações clínicas	61
6.2.3 Frequências de células Th1 IL-22 ⁺ e Th1 não diferiram entre os grupos com diferentes manifestações clínicas	62
6.2.4 Indivíduos com lombalgia apresentam alta frequência de células T CD8 ⁺ PD-1 ⁺ IFN- γ ⁺	62

<i>6.3 Frequências Celulares x Gênero</i>	63
<i>6.4 Quantificação de Citocinas e Quimiocinas</i>	65
7 DISCUSSÃO	70
8 CONCLUSÕES	79
REFERÊNCIAS	80
APÊNDICE A – QUESTIONÁRIO CLÍNICO	100
APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	101
ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA HUOC/PROCAPE	102
ANEXO B – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES	104

1 INTRODUÇÃO

Em maio de 2018 foi publicada uma carta aberta à Organização Mundial de Saúde, assinada por 60 pessoas, entre pesquisadores e portadores do vírus, pedindo à instituição o apoio na promoção de estratégias de prevenção de transmissão efetivas contra o primeiro vírus identificado como capaz de causar câncer em humanos, o Vírus Linfotrópico da Célula T Humana Tipo 1 (HTLV-1) (MARTIN; TAGAYA; GALLO, 2018).

O HTLV-1 foi descoberto em 1979 e descrito em 1980 como o primeiro retrovírus humano (GALLO, 2005; POIESZ *et al.*, 1980). Esse vírus pode ser transmitido de três formas: 1) através do aleitamento materno, de mãe para filho; 2) por transmissão sexual; ou ainda 3) por transfusão sanguínea/compartilhamento de seringas (MATSUOKA; JEANG, 2007).

Segundo as poucas estimativas sobre a prevalência global do HTLV-1, 10 a 20 milhões de pessoas estão infectadas pelo vírus. Deste total, 2,5 milhões de casos estão no Brasil, fazendo deste o país com a maior prevalência global (DE THÉ; BOMFORD, 1993; GESSAIN; CASSAR, 2012; ROMANELLI *et al.*, 2010). No entanto, como esses estudos baseiam-se apenas em indivíduos de áreas endêmicas, totalizando uma base populacional de aproximadamente 1,5 bilhão, e dados de regiões altamente populosas como China e Índia não estão disponíveis, a estimativa correta de portadores de HTLV-1 pode ser muito maior (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2015).

Apesar do grande número de portadores, a infecção pelo HTLV-1 por si só não ocasionará o surgimento de quadro clínico. Desta forma, a maior parte dos infectados, cerca de 90%, permanece sem sintomas (COSTA *et al.*, 2002). Quando as manifestações clínicas estão presentes, os portadores podem ser acometidos por duas doenças principais, ambas sem cura: 1) Paraparesia Espástica Tropical/Mielopatia Associada ao HTLV-1 (HAM/TSP), uma doença neurológica; e 2) Leucemia/Linfoma de Células T do Adulto (ATLL), uma doença hematológica (ANDERSON; MARTIN, 2014; COSTA *et al.*, 2002; OSAME *et al.*, 1986).

Pesquisas tem tentado evidenciar o porquê de apenas um percentual relativamente pequeno dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 desenvolver as doenças associadas a este, enquanto a maioria permanece assintomática (BARMAK *et al.*, 2003; COSTA *et al.*, 2002). Estudos sugerem que um dos determinantes no desenvolvimento das doenças associadas ao HTLV-1 seja a resposta imune do hospedeiro, que pode ser influenciada tanto pela via de infecção, que determina a população-alvo na infecção primária, como também por fatores genéticos individuais (BARMAK *et al.*, 2003).

Apesar das doenças associadas ao HTLV-1 serem bem estudadas, o mecanismo exato pelo qual o vírus causa condições inflamatórias ainda não está esclarecido (ARAYA *et al.*, 2011). Sabe-se que o HTLV-1 infecta preferencialmente células linfoides periféricas, em especial linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, mas também foi visto que pode infectar células da imunidade inata, como as células dendríticas. Assim, o surgimento das manifestações clínicas está relacionado ao tipo de resposta imune desencadeada. (JOURNO; MAHIEUX, 2011).

Na infecção pelo HTLV-1 predomina uma resposta imune de perfil Th1, com produção de citocinas como interferon gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), IL-6 e quimiocinas, que favorecem o desenvolvimento da HAM/TSP (BIDDISON *et al.*, 1997). Porém, não existem estudos que abordem as respostas de subpopulações de células T mais recentemente descritas, como é o caso das células Th17 e Th22, que desencadeiam processos inflamatórios em diversas doenças semelhantes à HAM/TSP. Do mesmo modo, o papel das células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ , ou que estejam em exaustão celular (CD8⁺ PD-1⁺), não está completamente esclarecido na infecção pelo HTLV-1.

As células Th17 são caracterizadas principalmente pela produção de IL-17A, citocina responsável por induzir diferentes células a produzir outras citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e metaloproteinases, ocasionando o recrutamento de neutrófilos para o foco inflamatório (IVANOV *et al.*, 2006; MESQUITA Jr. *et al.*, 2009; PETERS *et al.*, 2011; WILSON *et al.*, 2007).

Por sua vez, as células Th22 já foram associadas a doenças inflamatórias e sua principal citocina efetora é a IL-22, classicamente importante em doenças inflamatórias, apesar de estudos recentes mostrarem que sua função pode ser inflamatória e/ou protetora, dependendo do tipo de resposta inflamatória desencadeada e sua fonte celular (BESNARD *et al.*, 2011; CHUNG *et al.*, 2006; DUMONTIER *et al.*, 2000; PLANK *et al.*, 2017; SONNENBERG *et al.*, 2010; TRIFARI *et al.*, 2009).

Enquanto isso, linfócitos T CD8⁺ atuam em mecanismos antivirais. Porém, células T CD8⁺ citotóxicas (CTL) podem possuir papel importante no desenvolvimento/manutenção das doenças associadas ao HTLV-1, por exercerem função citotóxica e secretarem citocinas essenciais para a manutenção da resposta inflamatória (PROIETTI *et al.*, 2002).

Portanto, é possível que frequências elevadas de subpopulações das células Th17, Th22 e T CD8⁺, bem como os mediadores produzidos por elas, levem ao desequilíbrio do sistema imunológico, contribuindo para a patogênese da infecção e/ou desenvolvimento do ambiente inflamatório e danos ao tecido nervoso presentes na HAM/TSP. Desta forma, o estudo dessas

subpopulações de células T e mediadores solúveis por elas produzidos pode revelar o potencial de uso destas vias no tratamento de diversas doenças imunológicas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Em 1908, quando Ellerman e Bang observaram que a leucemia de galinhas poderia ser transmitida entre a espécie através da inoculação de filtrados de células tumorais, começou-se a perceber que alguns tipos de câncer teriam etiologia viral, ou seja, que alguns vírus participavam do processo de transformação celular, sendo então chamados de vírus oncogênicos, entre os quais inclui-se o Vírus Linfotrópico da Célula T Humana (HTLV) (ROMANOS *et al.*, 2008).

2.1 Vírus Linfotrópicos Da Célula T Humana (HTLV)

O HTLV possui quatro tipos distintos já identificados: HTLV-1, HTLV-2, HTLV-3 e HTLV-4. Este oncovírus, pertencente à família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae* e gênero *Deltaretrovirus*, pode ter surgido a partir do contato entre humanos e primatas não-humanos infectados, uma vez que retrovírus relacionados, como o Vírus Linfotrópico da Célula T de Símios (STLV) já foram descritos em primatas do velho mundo. Observa-se, portanto, que a transmissão zoonótica e a natureza transmissível e patogênica de vírus relacionados, como o STLV, evidenciam um problema de saúde pública (KROOM *et al.*, 2010).

No entanto, dos quatro tipos distintos existentes, apenas o HTLV-1 tem sido associado a doenças devido a sua maior patogenicidade, apesar de o HTLV-2 aumentar o risco de neuropatias inflamatórias e doenças infecciosas (BARTMAN *et al.*, 2008; BISWAS *et al.*, 2010; MAHIEUX; GESSAIN, 2003).

O HTLV-1 foi descoberto nos Estados Unidos em 1979 e descrito no ano seguinte como o primeiro retrovírus humano (GALLO, 2005; POIESZ *et al.*, 1980). A transmissão do HTLV-1 ocorre principalmente por via sexual e contato com sangue através de transfusões e compartilhamento de seringas, podendo ser transmitido também de mãe para filho, durante o aleitamento materno (KINOSHITA *et al.*, 1987; MATSUOKA; JEANG, 2007).

Estima-se que existam de 10 a 20 milhões de pessoas infectadas em todo o mundo, encontrando-se as maiores prevalências no Japão, África, ilhas do Caribe e América do Sul, locais onde mais de 1% da população está infectada (DE THÉ; BOMFORD, 1993). No Brasil, estudos de soroprevalência relatam 2,5 milhões de infectados, fazendo deste o país com maior

número de casos no mundo (ROMANELLI *et al.*, 2010). Porém, apesar da maior parte dos infectados permanecer assintomática ao longo da vida, aproximadamente 3% desenvolvem Leucemia/Linfoma de Células T do Adulto (ATLL) e outros 3% desenvolvem uma doença inflamatória no Sistema Nervoso Central conhecida como Mielopatia Associada ao HTLV-1/Paraparesia Espástica Tropical (HAM/TSP) (GESSAIN *et al.*, 1985; TAKATSUKI, 2005; VERDONCK *et al.*, 2007).

Em 1981, dois anos depois da descoberta do HTLV-1, Robert Gallo e seus colaboradores isolaram de um indivíduo com leucemia um vírus muito menos patogênico, porém bastante similar ao HTLV-1, o HTLV-2, que apresenta homologia de 70% de sequências nucleotídicas e similaridade estrutural com o primeiro. No entanto, é endêmico em populações indígenas da África e Américas e já foi encontrado em usuários de drogas na Europa e Estados Unidos (GALLO, 2005; GESSAIN; CASSAR, 2012; MELAMED *et al.*, 2014; ROUCOUX; MURPHY, 2004).

Apesar de não ser o agente etiológico de doenças graves como aquelas causadas pelo HTLV-1, manifestações neurológicas e mielopatia já foram descritas em indivíduos infectados pelo HTLV-2, além deste ter sido associado a inflamações crônicas e ao aumento da mortalidade relacionada ao câncer (BARTMAN *et al.* 2008; BISWAS *et al.*, 2009; BISWAS *et al.*, 2010; MELAMED *et al.*, 2014; ORLAND *et al.*, 2003).

O terceiro tipo de HTLV (HTLV-3) foi descoberto em 2005 em indivíduos assintomáticos que viviam em áreas de floresta tropical de Camarões do Sul, cujos soros apresentavam sorologia indeterminada para HTLV. No mesmo ano, o HTLV-4 foi descoberto em células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) de um caçador que vivia em Camarões. Porém, até hoje não foram encontrados sintomas relacionados à infecção por estes dois tipos virais, apesar da proteína Tax-3 do HTLV-3 ter analogia funcional com a Tax do HTLV-1 em termos de ativação da transcrição, sugerindo possível patogenicidade do terceiro tipo viral (CALATTINI *et al.*, 2005; CHEVALIER *et al.*, 2012; GESSAIN *et al.*, 2013; MAHIEUX; GESSAIN, 2011; WOLFE *et al.*, 2005).

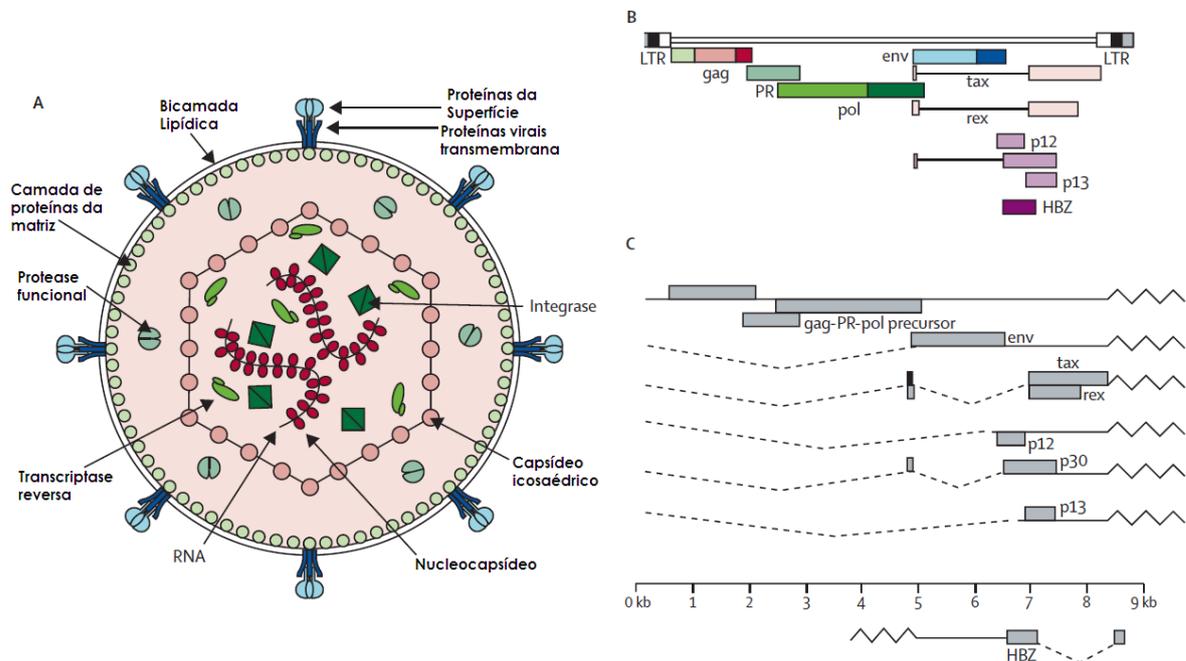
Os aspectos biológicos virais descritos nas próximas sessões consideram apenas o HTLV-1, uma vez que este é o tipo viral melhor compreendido e mais associado a doenças.

2.1.1 Estrutura Viral

A partícula viral do HTLV-1 (Figura 1) é formada por um envelope de 80 a 110 nanômetros de diâmetro (TAYLOR *et al.*, 1999). O genoma é RNA de fita simples diploide,

com cerca de 9Kb, contendo genes estruturais (*gag*, *pol* e *env*), a região pX, que contém genes reguladores (*tax* e *rex*) e genes acessórios (*p12*, *p13*, *p30* e *HBZ*) e duas terminações longas repetidas (LTRs) (GALLO, 2002; KASHANCHI; BRADY, 2005; KAZANJI; GESSAIN, 2003; MATSUOKA; JEANG, 2007; VERONESI, 2002).

Figura 1 - Estrutura e genoma do HTLV-1.



Fonte: Adaptado de Van Doreen (2005, tradução nossa).

Nota: (A) O HTLV-1 possui envelope de 80 a 110 nanômetros de diâmetro e seu genoma é RNA de fita simples diploide. (B) Seu RNA contém genes estruturais (*gag*, *pol* e *env*), genes reguladores (*tax* e *rex*) e genes acessórios (*p12*, *p13*, *p30* e *HBZ*). (C) O único gene codificado na fita negativa é o *HBZ*, que é capaz de reprimir a transcrição do HTLV-1

Cada gene estrutural é responsável pela codificação de diferentes proteínas presentes na estrutura do vírus. Enquanto o gene *gag* codifica proteínas do capsídeo, p52 e suas derivadas p19 e p24, o gene *pol* é responsável pela codificação das enzimas transcriptase reversa e integrase e o gene *env* pela proteína transmembrana gp21 e a gp46 (LE BLANC *et al.*, 2001; OLIVEIRA; AVELINO, 2007).

Os genes reguladores, por sua vez, codificam proteínas muito importantes no ciclo do HTLV-1. O gene *tax* é um gene regulador que codifica uma proteína de mesmo nome, Tax, uma fosfoproteína nuclear transativadora responsável pela regulação da transcrição do genoma do provírus do HTLV através da interação com diversas proteínas reguladoras. Estudos demonstraram que Tax está relacionada a ativação de genes celulares, como genes de citocinas (IL-2, IL-1, IL-3, IL-6, TGF-beta, Fator de Crescimento de Granulócitos entre outros) e

protooncogenes. O outro gene regulador, *rex* codifica a proteína Rex, capaz de realizar regulação pós-transcricional de proteínas estruturais do vírus (GALLO, 2002; OLIVEIRA; AVELINO, 2007; VERONESI, 2002).

O gene HBZ do HTLV-1 codifica uma importante proteína que contém um domínio de zíper de leucina básico (bZIP). Essa proteína, chamada de fator bZIP do HTLV (HBZ), é a única codificada na fita negativa do provírus e possui a capacidade de reprimir a transcrição do HTLV-1 através da dimerização com CREB, um dos fatores essenciais à formação do complexo protéico responsável pela ativação da transcrição viral (CLERC *et al.*, 2008).

Com o passar dos anos, a importância de HBZ vem sendo ainda mais demonstrada em estudos que relatam seu envolvimento em diversas funções, como a inibição da resposta imune inata mediada por IRF3, a conversão de células infectadas em células T regulatórias, a indução da transcrição de Foxp3 e a supressão da apoptose, o que demonstra um papel não apenas acessório na patogenia das doenças causadas pelo vírus (DOUVILLE *et al.*, 2011; MATSUOKA, 2013; TANAKA-NAKANISHI *et al.*, 2014).

2.1.2 Infecção, Ciclo de Replicação e Propagação

O HTLV-1 infecta preferencialmente células linfoides periféricas, em especial os linfócitos T CD4⁺ de memória e os linfócitos T CD8⁺, apesar de ter sido observado que também pode infectar células da imunidade inata, a exemplo dos monócitos e células dendríticas (JONES *et al.*, 2008; YASUNAGA *et al.*, 2001). Já foi observado *in vitro* que o HTLV-1 possui a capacidade de infectar inclusive células mesenquimais estromais humanas (RODRIGUES *et al.*, 2014). Assim, o surgimento das diversas manifestações clínicas está relacionado ao tipo de resposta imune que é desencadeada (JOURNO; MAHIEUX, 2011).

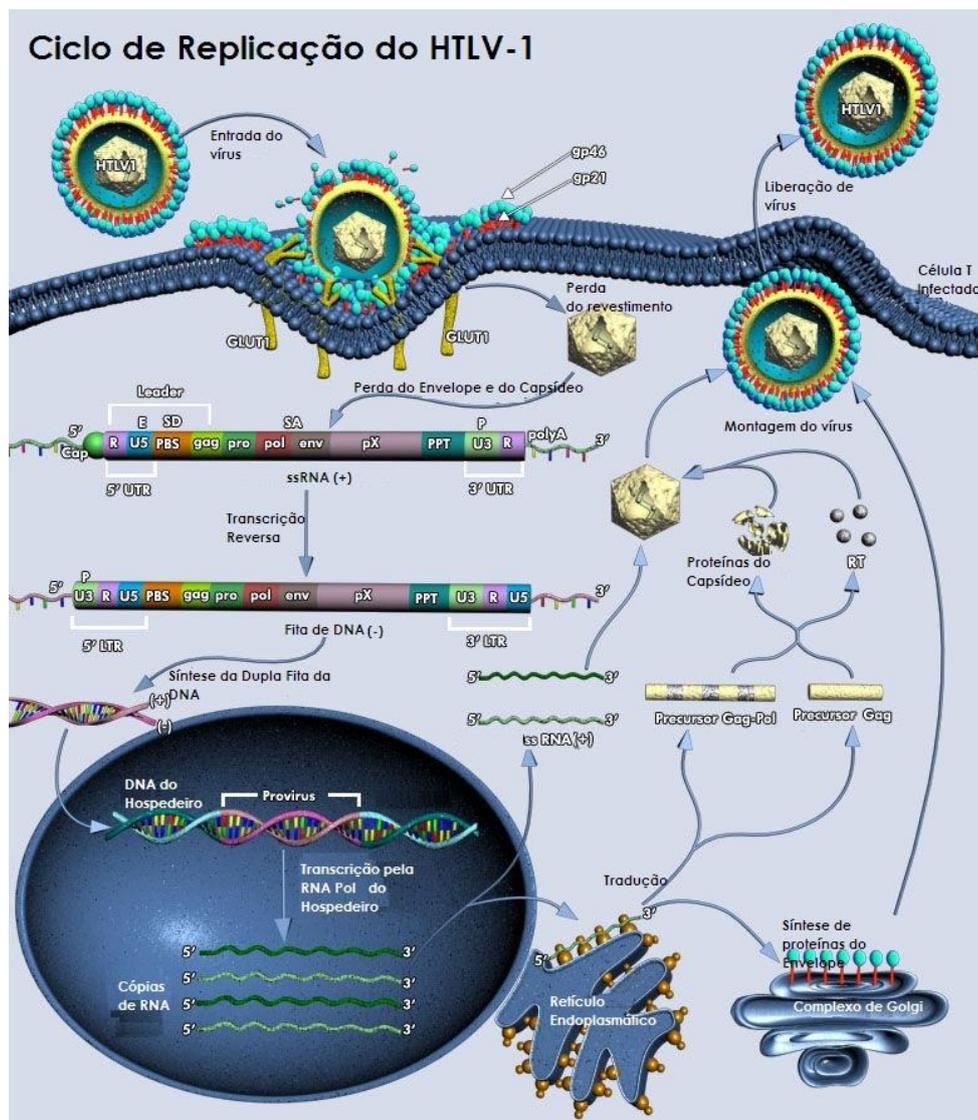
A resposta das células T CD8⁺ é o que determina o rumo da infecção pelo HTLV-1, pois nos indivíduos sintomáticos a carga proviral, principal marcador para HAM/TSP até o momento, encontra-se elevada assim como a resposta imunológica. Além disso, o HTLV-1 é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica junto aos linfócitos infectados, em especial os CD4⁺ (COSTA *et al.*, 2002; MARTINS *et al.*, 2016; SAITO, 2010; YAMANO *et al.*, 2012).

Para infectar todos esses tipos celulares, o receptor do HTLV-1 tem que ser uma molécula normalmente expressa (KOYANAGI *et al.*, 1993). Estudos mostraram que as proteínas do envelope do HTLV-1 interagem com três moléculas de superfície para conseguir entrar nas células: Proteoglicanos de Heparan Sulfato (HSPG), Neuropilina-1 e o Transportador de Glicose 1 (GLUT1) (GHEZ *et al.*, 2006; JONES *et al.*, 2005; MANEL *et al.*, 2003).

Primeiramente, proteínas do envelope do vírion HTLV-1 se unem a moléculas de HSPG, formando complexos. Em seguida, os complexos são estabilizados pela interação com moléculas de Neuropilina-1. Por fim, GLUT-1 associa-se ao complexo permitindo o processo de fusão para a entrada do vírus, como ilustra a Figura 2 (JONES *et al.*, 2011).

Dentro da célula, a transcriptase reversa presente no capsídeo do HTLV-1 utiliza o RNA viral para sintetizar DNA. A partir de então, a dupla fita do DNA proviral segue para o núcleo e é integrado no genoma do hospedeiro pela ação da integrase.

Figura 2 - Ciclo de Replicação do HTLV-1



Fonte: Adaptado de Qiagen (2019, tradução nossa).

Nota: Proteínas do envelope viral interagem com moléculas da superfície das células T, permitindo que o vírus entre na célula.

Segundo Clerc e colaboradores (2008), durante sua integração no genoma do hospedeiro, o provírus do HTLV-1 utiliza a RNA Polimerase II para replicação e expressão dos genes virais. Porém, a ativação da transcrição do HTLV-1 requer proteínas, como Tax, que, no entanto, sozinha não se liga ao DNA. Assim, é necessário seu recrutamento ao promotor viral, onde ajudará a formar um complexo com o fator de transcrição celular CREB ou outros membros da família ATF/CREB, proteínas que possuem domínio de zíper de leucina básico (bZIP) responsável por estimular a dimerização proteica e ligação ao DNA.

Na região 5' LTR do provírus, os complexos Tax-CREB associam-se a três CRE virais (vCREs), elementos que possuem sequência central semelhantes à CRE celular e que são reconhecidas por CREB. A formação deste complexo no promotor, permite que os coativadores p300 e CBP (Proteína de Ligação a CREB) liguem-se ao promotor, através do contato direto com Tax, permitindo a integração do vírus no genoma do hospedeiro (CLERC *et al.*, 2008).

Com o vírus integrado, acontece a replicação e posterior transcrição dos genes do HTLV-1, produzindo o RNA mensageiro (RNAm) de proteínas como Tax e Rex, capazes de regular a replicação viral (GALLO; POIESZ; RUSCETTI, 1981; IGAKURA *et al.*; 2003; VARMUS, 1988).

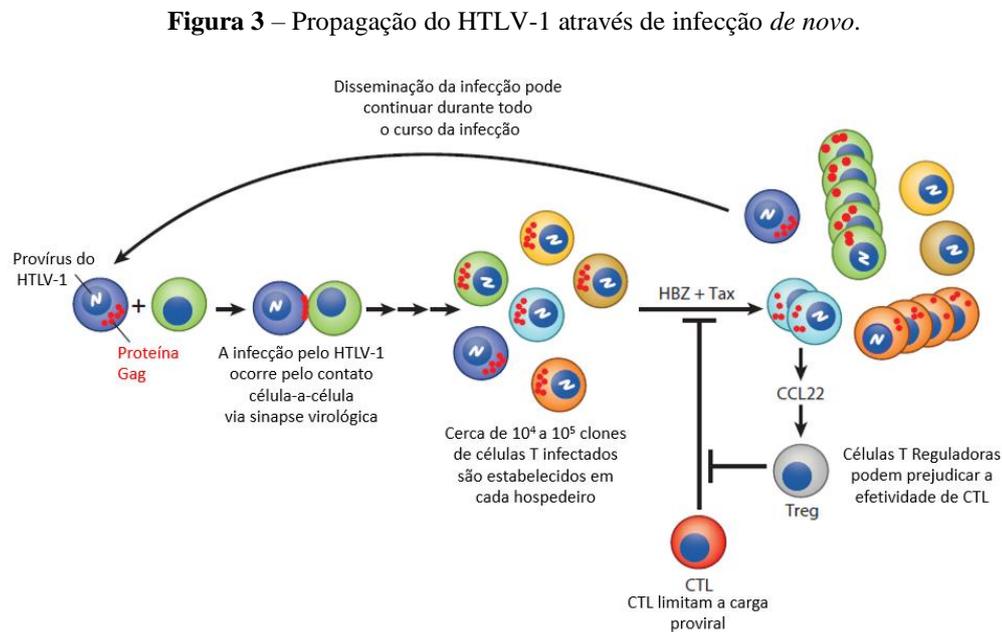
Quando a proteína Rex é produzida em grande quantidade, há formação de um novo RNAm, responsável por codificar proteínas estruturais que formam novas partículas virais e seguem para a membrana celular, levando uma parte desta, emergindo por brotamento na superfície celular (FERREIRA JÚNIOR; PLANELLES; ROSENBLATT, 1997).

Como a maioria dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 são assintomáticos, percebe-se que a infecção por esse vírus é latente na maioria das pessoas. Porém, os mecanismos pelos quais o HTLV-1 entra em latência ou é reativado ainda não estão esclarecidos. Philip e colaboradores (2014) mostraram que a maioria das células HeLa infectadas pelo HTLV-1 em seu estudo tornaram-se senescentes, enquanto quando a atividade de NF- κ B foi bloqueada, a senescência não aconteceu, levando as células infectadas a se dividir continuamente produzindo as proteínas virais.

Os autores mostraram, baseados na expressão relativa das proteínas reguladoras Tax, Rex e HBZ, que a infecção em cultura pode levar a dois resultados: 1) A latência é estabelecida por HBZ; ou 2) A reativação é permitida por Rex, através da regulação de exportação de mRNAs. Quando a expressão de Tax/Rex é dominante sobre HBZ, proteínas estruturais são expressas e ocorre hiperativação de NF- κ B, induzindo a senescência. Porém, quando HBZ é dominante sobre Tax/Rex, proteínas reguladoras (Tax/Rex/HBZ) são expressas, enquanto não há expressão de proteínas estruturais, ocasionando a latência da infecção (PHILIP *et al.*, 2014).

Entretanto, o principal modo de propagação do HTLV-1 é diferente de outros vírus. Enquanto a maioria dos vírus se propagam a partir da liberação das partículas virais no sangue, secreção e fluidos extracelulares, o HTLV-1 necessita da mobilidade das células hospedeiras, em geral, as células T CD4⁺ ou CD8⁺ (BANGHAM, 2018).

Nesse mecanismo de propagação, conhecido como infecção *de novo* (Figura 3), uma célula T infectada interage com uma célula não infectada, que geralmente expressa a molécula de adesão celular LFA-1. Essa interação permite que uma combinação de sinais da superfície celular com a proteína viral Tax levem à polarização do citoesqueleto da célula infectada em direção à outra não infectada, formando uma extensa área de contato, a sinapse virológica, que possui proteínas organizadas em microdomínios. Então, os microtúbulos direcionam os vírions para a sinapse e esses entram na célula não infectada envolvidos por membranas celulares ou pela periferia da sinapse (BARNARD *et al.*, 2005; IGAKURA *et al.*, 2003; MAJOROVITS *et al.*, 2008; PAIS-CORREIA *et al.*, 2010).



Fonte: Adaptado de Bangham (2018).

Nota: A principal maneira de propagação do HTLV-1 é através da infecção *de novo*, na qual uma célula infectada pelo vírus cria um ambiente especializado entre si e uma célula não infectada, a sinapse virológica, permitindo a passagem de provirus de uma célula a outra.

2.1.3 Transmissão

A transmissão do HTLV-1 ocorre através do contato com células infectadas vivas, via transmissão vertical (durante o aleitamento materno ou mais raramente no útero), contato sexual

e transfusão sanguínea/compartilhamento de seringas (BERTOTTO *et al.*, 1990; MANNS; HISADA; LA GRENADE, 1999; MATSUOKA; YASUNAGA, 2013).

Segundo Yasunaga e colaboradores (2001), provírus do HTLV-1 foram encontrados em células T efectoras/de memória no leite materno, expressando LFA1 e ICAM-1, o que pode demonstrar a capacidade do HTLV-1 em alterar o fenótipo das células infectadas para facilitar sua entrada no leite materno e em outros locais, como o sêmen. Inclusive, a eficiência da transmissão da infecção está no contato próximo e prolongado com o vírus, o que explica o fato de o HTLV-1 ser transmitido principalmente por via vertical (ALVAREZ *et al.*, 2016).

A rápida transmissão celular pode ocorrer devido a diversas características do vírus. Por exemplo, o HTLV-1 possui a capacidade de atravessar barreiras epiteliais, como o trato digestório, por mecanismos de transcitose (MARTIN-LATIL *et al.*, 2012). Além disso, os víriões podem infectar células dendríticas que existem nessas barreiras, migrando então para os linfonodos, onde realizam sinapse virológica com as células T (JONES *et al.*, 2008).

2.2 Epidemiologia do HTLV-1

O HTLV-1 é amplamente distribuído nos trópicos e subtropicais, especialmente na África subsaariana, América do Sul, bacia do Caribe, norte do Irã, sul do Japão, Austrália central e Melanésia (BANGHAM, 2018). As prevalências mundiais e a nível de Brasil serão discutidas nos próximos tópicos.

2.2.1 Epidemiologia no Mundo

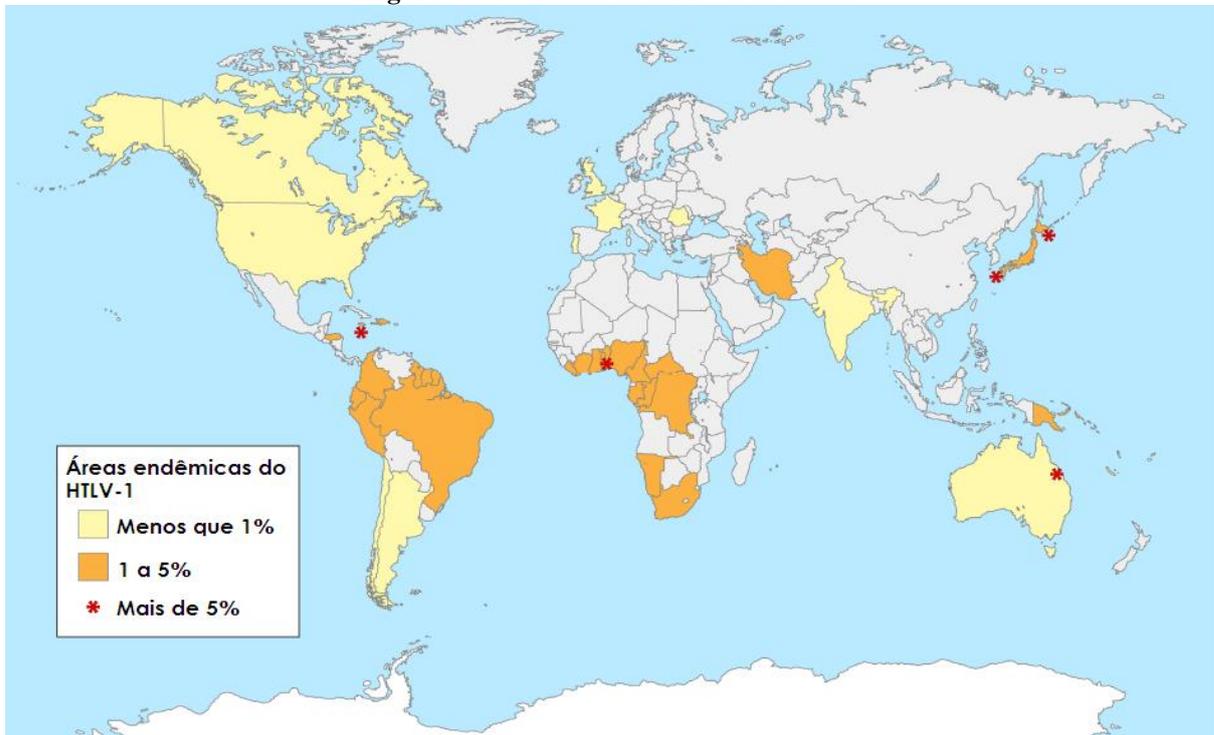
As áreas consideradas de maior prevalência no mundo (Figura 4) são Japão, África, Ilhas do Caribe, América Central e América do Sul, cada uma apresentando mais de 1% da população infectada pelo vírus (PROIETTI *et al.*, 2005).

Segundo Murphy e colaboradores (1991), a Europa e a América do Norte, apesar de possuírem baixas prevalências, apresentam casos de infecção restritos, em geral, a grupos imigrantes, que emigraram de áreas endêmicas. Na França e nos Estados Unidos, por exemplo, baixas taxas foram relatadas em doadores de sangue, com prevalência de 0,0039% e 0,025%, respectivamente (MURPHY *et al.*, 1991; COUROUCÉ *et al.*, 1998).

Na Austrália, embora a prevalência seja baixa em doadores de sangue, foi descrita uma prevalência de 14% em aborígenes do Território do Norte (BASTIAN; HINUMA; DOHERTY, 1993).

Na América do Sul, o HTLV-1 está presente em todos os países, com prevalência média de 0,73% em doadores de sangue no Chile e 0,07% na Argentina (GONÇALVES *et al.*, 2010; VASQUEZ *et al.*, 1991).

Figura 4 - Prevalência do HTLV-1 no mundo



Fonte: Adaptado de Proietti (2005)

As prevalências no Brasil, Colômbia e Peru parecem estar de alguma forma relacionadas com a latitude e a altitude das regiões. Na Colômbia, áreas de baixa altitude registram prevalências de 4,3%, enquanto áreas de alta altitude relatam prevalência de 0,73% (MALONEY *et al.*, 1989).

2.2.2 Epidemiologia no Brasil

O HTLV-1 foi descrito no Brasil pela primeira vez em Campo Grande, no Mato Grosso do Sul, em uma comunidade de imigrantes japoneses, cuja maioria da população era oriunda de Okinawa (KITAGAWA *et al.*, 1986).

Com a Portaria nº 1.376 de 1993 do Ministério da Saúde, todo o sangue doado no Brasil passou a ser submetido a triagem sorológica (BRASIL, 1993). Essa portaria permitiu o estudo das prevalências do HTLV-1 em doadores de diversas regiões do país.

A frequência de infecção pelo HTLV-1 no Brasil (Figura 5) varia de 0,08% em Florianópolis, no sul do país, a 1,35% em Salvador, sendo a região Nordeste a que apresenta maior prevalência para a infecção (CARNEIRO-PROIETTI; CATALAN-SOARES; PROIETTI, 2002; GALVÃO-CASTRO *et al.*, 1997).

Figura 5 - Prevalências do HTLV no Brasil de 1989 a 1996



Fonte: Adaptado de Carneiro-Proietti *et al.* (2002)

Em estudos posteriores, demonstrou-se que as maiores taxas de soroprevalência para HTLV-1/2 no Brasil estão no Maranhão, na Bahia, no Pará e em Pernambuco (CATALAN-SOARES; CARNEIRO-PROIETTI; PROIETTI, 2005).

Devido ao tráfico de escravos vindos da África, há maior probabilidade de pessoas infectadas pelo HTLV-1 serem encontradas em estados como Pernambuco, Salvador e Rio de Janeiro. Em Pernambuco, o retrovírus foi identificado pela primeira vez em 1990 em uma paciente de Goiana, a 60 Km do Recife, acometida por Leucemia/Linfoma de Células T do Adulto. Posteriormente, o estudo da etiologia confirmou que a via de infecção da paciente foi através do aleitamento materno, uma vez que esta foi amamentada por três anos pela mãe, portadora de HTLV-1 e com marido negativo para a infecção (FLORÊNCIO *et al.*, 1990 apud LOUREIRO, 2011).

Estudos de soroprevalência revelaram que entre doadores de sangue de Pernambuco houve 0,8% de presença de anticorpos para HTLV-1/2, enquanto para os que utilizavam o sangue houve soroprevalência de 16,6% em hemofílicos, 11,2% em portadores de anemias hereditárias e 7,4% em portadores de leucemia mielóide aguda, o que sugere a alta prevalência entre doadores e pacientes que passaram por transfusão (LOUREIRO *et al.*, 1994 apud LOUREIRO, 2008).

2.3 Doenças associadas ao HTLV-1

Os fatores genéticos e imunológicos do hospedeiro são relatados como os principais responsáveis pelo desenvolvimento de manifestações clínicas relacionadas ao HTLV-1, sejam elas neoplásicas, inflamatórias ou infecciosas (ROMANELLI; CARAMELLI; PROIETTI, 2010).

Nos últimos anos, diversas doenças foram associadas à infecção pelo HTLV-1. São elas: uveíte, dermatite infecciosa, síndrome de Sjögren (síndrome de sicca) e polimiosite. Tireoidite, polineuropatias, linfoma cutâneo de células T, artropatias e alveolite linfocitária também parecem estar associadas ao vírus, mas não se está completamente esclarecido que o HTLV possa causar essas condições. Em acréscimo, a presença do HTLV-1 em co-infecção com outros parasitas, a exemplo da estrombiloidíase, escabiose, tuberculose e hanseníase aparece em vários estudos como agravante dos quadros clínicos observados nessas doenças (COOPER; VAN DER LOEFF; TAYLOR, 2009; MORI *et al.*, 2005; SEGUCHI *et al.*, 2006; VERDONCK *et al.*, 2007).

Mais recentemente, foi visto que células infectadas pelo vírus conseguem chegar aos pulmões e causar bronquiectasia, bronquite ou bronquiolite (BANGHAM, 2018; HONARBAKHSI *et al.*, 2015; YAMASHIRO *et al.*, 2012;).

Porém, o HTLV-1 está relacionado a doenças proliferativas graves e aparece como agente etiológico de duas doenças principais: Leucemia/Linfoma de Células T do Adulto (ATLL), uma doença neoplásica, e Paraparesia Espástica Tropical/Mielopatia Associada ao HTLV-1 (HAM/TSP), uma enfermidade caracterizada por intensa inflamação no Sistema Nervoso Central (MAHIEUX; GESSAIN, 2003).

2.3.1 Leucemia/Linfoma de Células T do Adulto (ATLL)

Nos anos 1970, uma doença de células T que ainda não havia sido descrita acometia adultos da ilha de Kyushu, no sudoeste do Japão, onde pacientes apresentavam lesões cutâneas, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia e hipercalcemia. Esta doença foi então chamada de Linfoma (ou Leucemia) de células T do Adulto (ATLL), associada posteriormente ao HTLV-1, o tipo viral mais relacionado a doenças, uma vez que todos os pacientes apresentavam anticorpos para este vírus (TAKATSUKI, 2005). Porém, embora exista entre 10 e 20 milhões de infectados pelo vírus, apenas de 1 a 4% desenvolvem ATLL durante a sétima década de vida (KOKORIS *et al.*, 2004).

A leucemia de células T do adulto é classificada em quatro subtipos (latente, crônica, aguda ou linfomatosa) de acordo com a contagem de linfócitos, envolvimento com órgãos sólidos, critérios bioquímicos e gravidade dos sintomas (SHIMOYAMA, 1991). A ATLL é caracterizada por ser uma proliferação maciça de células T infectadas pelo HTLV-1. A ATLL tem um período de latência de mais de 30 anos e pode apresentar os sintomas de organomegalia, lesões cutâneas, hipercalcemia e presença de linfócitos atípicos, de fenótipo CD2⁺ CD3⁺ CD4⁺ CD8⁻ CD7⁻ (AKBARIN *et al.*, 2013; CABRERA *et al.*, 1994; KOKORIS *et al.*, 2004). Segundo Cessay e colaboradores (2012), as células T na ATLL também expressam CD25, molécula normalmente não expressa nas células T.

Bazarbachi e colaboradores (2013) afirmam que o pior prognóstico da ATLL se dá devido a quimioresistência intrínseca e imunossupressão grave, com os pacientes apresentando uma sobrevida média de menos de 12 meses.

Apesar de ainda não apresentar cura, tratamentos para verificar o potencial terapêutico de células-tronco alogênicas (allo-SCT) na ATLL tem aumentado a sobrevida de um grupo de pacientes. Estudos experimentais utilizaram como alvo a telomerase transcriptase reversa humana (hTERT), abundantemente produzida em células ATLL, com sucesso (BAZARBACHI *et al.*, 2013; MIYAZAKI *et al.*, 2013).

Na Leucemia/Linfoma de Células T do Adulto, o gene *tax* tem um papel fundamental na transformação e proliferação das células infectadas pelo HTLV-1, codificando uma proteína reguladora de mesmo nome que é responsável por induzir a proliferação das células T infectadas pelo vírus (GONÇALVES *et al.*, 2010; MARRIOTT; SEMMES, 2005; YOSHIDA, 2001).

Na patogênese da ATLL, a proteína Tax pode se ligar a fatores de transcrição e cofatores transcripcionais promovendo a transcrição tanto do genoma proviral, como de genes celulares, a exemplo de citocinas (IL-2), receptores de citocinas (IL-2R α) e genes antiapoptóticos. Porém, através da ligação a complexos proteicos, Tax também é capaz de reprimir a transcrição de genes envolvidos no controle do ciclo celular, na ativação da apoptose e no reparo do DNA, além de se ligar diretamente a proteínas envolvidas na supressão do tumor, inibindo-as (VERDONCK *et al.*, 2007; YOSHIDA, 2001).

No entanto, um novo gene chamado fator bZIP do HTLV-1 (HBZ), cujo RNAm foi detectado em 100% de células ATLL, foi descrito como mais importante que *tax* na leucemogênese e na transformação celular (FAN *et al.*, 2010; MATSUOKA; GREEN, 2009).

Estudos suprimindo a transcrição de HBZ por RNA de interferência mostraram uma pequena diminuição na proliferação das células ATLL, demonstrando a função deste gene na proliferação celular (FAN *et al.*, 2010; SATOU *et al.*, 2006).

Com a importância clara desses dois componentes, aceita-se atualmente que Tax é importante na instalação da ATLL, enquanto o fator de zíper de leucina básico do HTLV-1, proteína codificada pelo HBZ, é fundamental para manter o fenótipo transformado das células neoplásicas (COOK *et al.*; 2013).

2.3.2 Paraparesia Espástica Tropical/Mielopatia Associada ao HTLV-1 (HAM/TSP)

A HAM/TSP é uma síndrome desmielinizante crônica e incapacitante causada pelo HTLV-1 caracterizada pela presença de sintomas como fraqueza progressiva dos membros inferiores, disfunção erétil, incontinências urinária e/ou intestinal, além de dores nas partes inferiores das pernas e costas (ANDERSON; MARTIN, 2014).

A mielopatia apresenta-se como a manifestação neurológica mais frequente do HTLV-1 e sua neuropatologia é caracterizada pelo infiltrado de células mononucleares no sistema nervoso central, que acarreta na desmielinização e perda de neurônios (BANGHAM, 2018).

Em 1969, antes de o HTLV-1 ter sido isolado, alguns casos de paraparesia espástica idiopática foram descritos, sendo chamados depois de Paraparesia Espástica Tropical (TSP ou PET) (CHAMPS *et al.*, 2010; VERDONCK; GOTUZZO, 2010). Posteriormente, Gessain e

colaboradores (1985) demonstraram que 68% dos casos de Paraparesia Espástica Tropical (PET) apresentavam sorologia positiva para HTLV-1.

No Japão, Osame (1986) encontrou uma manifestação neurológica semelhante à descrita por Gessain, no entanto chamou de Mielopatia Associada ao HTLV-1 (HAM ou MAH), uma vez que o termo *tropical* parecia inadequado para uma doença endêmica do Japão, uma região temperada. Percebendo que se tratava da mesma enfermidade, o autor acabou por usar o termo Mielopatia Associada ao HTLV-1/Paraparesia Espástica Tropical (HAM/TSP, de *HTLV-1 Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis* ou PET/MAH) (CHAMPS *et al.*, 2010; ROMÁN; OSAME, 1988; VERDONCK; GOTUZZO, 2010).

A HAM/TSP é caracterizada principalmente pela paraparesia espástica lenta e progressiva, bem como pela presença de anticorpos anti-HTLV-1 no soro e no fluido cérebro-espinhal (CSF) dos pacientes (NAKAGAWA *et al.*, 1996; NAKAMURA, 2009). Gessain e Gout (1992) colocam como características patológicas da doença, a paraplegia ou paraparesia espástica progressiva e crônica, distúrbios no esfíncter e uma perda de sensibilidade mínima, além de haver comprometimento dos nervos periféricos e supra-espinhal em alguns casos.

Essa doença, que ocorre em cerca de 0,25 a 3,8% dos infectados pelo HTLV-1, afeta mais mulheres que homens, na proporção 2,5:1 a 3:1. Além disso, a HAM/TSP acomete indivíduos, em sua maior parte, nas 4ª e 5ª décadas de vida e, menos raramente, antes dos 20 anos e após os 70 anos. A doença é tão incapacitante que após dez anos de sua instalação, aproximadamente 30% dos acometidos encontram-se paraplégicos e confinados ao leito (ARAÚJO; SILVA, 2006; CARNEIRO-PROIETTI *et al.*, 2002; SANTOS; MUNIZ; CARVALHO, 2009).

Apesar de indivíduos HAM/TSP apresentarem essa maior mortalidade e morbidade em relação à população em geral, ainda não existe cura ou tratamento antirretroviral eficaz para o HTLV-1 (ANDERSON; MARTIN, 2014). Ainda assim, alguns estudos buscam tratamentos clínicos, a exemplo de um que utiliza anticorpos monoclonais, como anti-CCR4, que é expresso na maioria das células infectadas pelo HTLV-1, para assim reduzir a carga proviral e a produção de citocinas, além de diminuir as frequências de células T reguladoras (SUGATA *et al.*, 2016).

Embora a fisiopatologia da infecção pelo HTLV-1 não seja inteiramente conhecida, são consideradas três hipóteses para explicar o desenvolvimento da HAM/TSP pelo vírus (Figura 6).

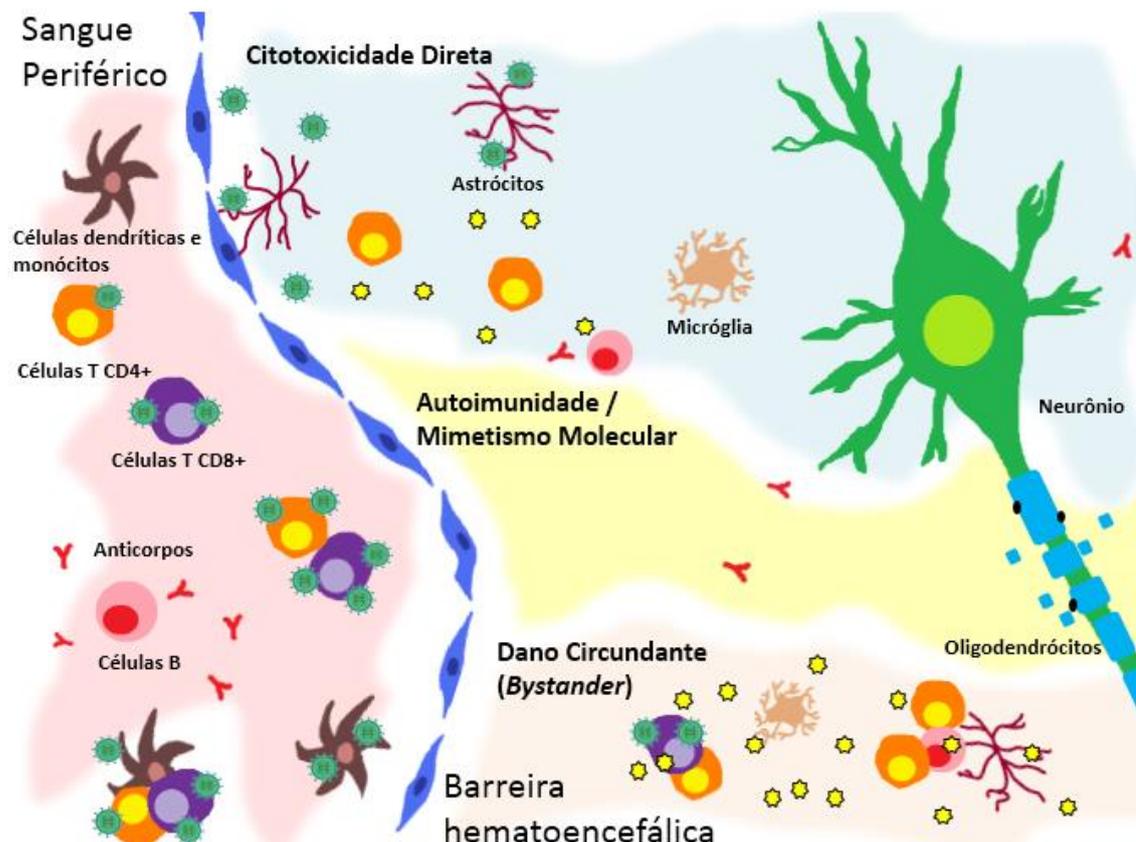
A primeira hipótese trata de um mecanismo de citotoxicidade direta, na qual células T CD8⁺, com antígenos para HTLV-1, seriam capazes de cruzar a barreira hematoencefálica e

destruir as células da glia infectadas pelo vírus, seja por citotoxicidade direta ou pela produção de citocinas (FURAKAWA *et al.*, 2003; IJICHI; OSAME, 1995; NAKAMURA *et al.*, 1993).

A segunda hipótese é chamada de autoimune e trata-se de um mecanismo de mimetismo molecular, no qual a ribonucleoproteína nuclear heterogênea (hnRNP-A1), uma proteína neuronal do hospedeiro, é bastante semelhante a Tax, a proteína mais importante do vírus, e desencadeia um intenso processo inflamatório autoimune com lesão dos neurônios (LEVIN *et al.*, 2002).

A terceira hipótese, chamada de “*bystander*” ou dano circundante, é a mais aceita e trata-se da capacidade que linfócitos T CD4⁺ infectados e linfócitos T CD8⁺ específicos para Tax teriam em atravessar a barreira hematoencefálica e produzir grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias, ocasionando inflamação e destruição tecidual (KUBOTA *et al.*, 2002; NAGAI; OSAME, 2003; OSAME, 2002). Esta hipótese corrobora com Biddison e colaboradores (1997), que mostraram a alta toxicidade de mediadores potencialmente inflamatórios (citocinas, quimiocinas e metaloproteinases) quando produzidos em altas concentrações no sistema nervoso.

Figura 6 - Hipóteses de desenvolvimeto da HAM/TSP pelo HTLV-1



No entanto, apesar do ataque direto do vírus aos neurônios não ser provado, suspeita-se que o sistema nervoso apresente contaminação indireta por linfócitos infectados, gerando respostas imunológicas humorais e celulares, uma vez que citocinas, a exemplo das interleucinas, Fator de Ativação de Plaquetas (PAF) e Fator de Necrose Tumoral (TNF) tem sido encontradas no soro de indivíduos HAM/TSP, desempenhando função na desmielinização dos neurônios (COSTA *et al.*, 2002; DE CASTRO-COSTA *et al.*, 2002; IZUMO *et al.*, 1992; LIBERSKI *et al.*, 1999).

Segundo Santos, Muniz e Carvalho (2009), os principais determinantes no desenvolvimento da HAM/TSP são fatores virais, polimorfismos genéticos do hospedeiro, carga proviral e a resposta imune do hospedeiro.

As células T, após a infecção pelo HTLV-1, são hiperativadas e proliferam-se intensamente, acarretando em uma exacerbada produção de citocinas pró-inflamatórias e também de quimiocinas como CXCL9 e CXCL10, fundamentais no recrutamento de células Th1. Além disso, células T regulatórias (CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺) encontram-se significativamente reduzidas, o que evidencia a contribuição da ausência de modulação da resposta imunológica e a exacerbção de mediadores solúveis na HAM/TSP (GUERREIRO *et al.*, 2006; SANTOS; MUNIZ; CARVALHO, 2009).

Em acréscimo, estudos envolvendo murinos apresentaram altos níveis de IL-6 e IL-17, sugerindo a presença de uma resposta do tipo Th17 na infecção pelo HTLV-1 (SWAIMS *et al.*, 2010). Inclusive, Dodon *et al.* (2004) encontraram altos níveis de expressão de IL-17 em culturas de células T infectadas pelo HTLV-1, bem como em células Jurkat, linhagem de linfócitos T derivada da ATLL.

2.4 Aspectos Imunológicos da Infecção pelo HTLV-1

O HTLV-1 infecta preferencialmente linfócitos T CD4⁺, porém estudos demonstraram a capacidade do vírus em infectar outros tipos celulares, como linfócitos T CD8⁺ e células NK (NAGAI *et al.*, 2001; TAKAMOTO *et al.*, 1997). A seguir, serão abordadas as principais respostas imunológicas na infecção pelo vírus.

2.4.1 Resposta Th1 na Infecção pelo HTLV-1

Na infecção pelo HTLV-1 predomina uma resposta imune de perfil Th1, com produção de citocinas como interferon gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), IL-6 e

quimiocinas, a exemplo das proteínas induzidas por macrófagos/monócitos (MIP-1 α e MIP-1 β , atualmente denominadas como CCL3 e CCL4, respectivamente) (BIDDISON *et al.*, 1997). A potente resposta Th1 observada na infecção pelo vírus é capaz de inibir a produção de citocinas por células Th2, a exemplo da IL-4, tornando os infectados mais susceptíveis a doenças causadas por helmintos (CARVALHO *et al.*, 2001; LAL *et al.*, 1996; SOUZA-MACHADO *et al.*, 2003).

Citocinas do tipo Th1, em especial o IFN- γ , são fundamentais para o desempenho da função citotóxica das células T, além de modular a resposta Th2 negativamente, enquanto citocinas do tipo Th2 (IL-4 e IL-10) podem regular negativamente a ação do IFN- γ sobre células T e suprimir a resposta Th1 (CARVALHO *et al.*, 2001; KOSTENSE *et al.*, 2001; MOSMANN; MOORE, 1991).

A maioria dos estudos sobre HAM/TSP em geral apresenta a produção elevada de citocinas e quimiocinas pro-inflamatórias como IFN- γ , TNF- α , CXCL9 e CXCL10, evidenciando a importância da resposta Th1 na infecção (FUTSCH *et al.*, 2018; NECO *et al.*, 2017a). Ademais, um estudo mostrou que o HTLV-1 pode induzir células CCR4⁺ a um estado Th1, e os autores postulam que esse estado seria o responsável pela produção de IFN- γ que estimularia os astrócitos a produzirem CXCL10 (YAMANO; COLER-REILLY, 2017).

2.4.2 Resposta Th17 na Infecção pelo HTLV-1

Além das células Th1 e Th2, outras subpopulações de células T *helper* efetoras foram mais recentemente descritas. As células Th17, por exemplo, foram identificadas em 2006 e caracterizam-se por produzir IL-17A e expressar o fator de transcrição RORC. Elas são diferenciadas a partir de células T CD4⁺ *naive*, na presença de IL-6, IL-23 e IL-1 β . Além disso, as células Th17 também podem produzir IL-22 e IFN- γ (ANNUNZIATO *et al.*, 2007; SUTTON *et al.*, 2006).

Estudos tem demonstrado que células Th17 também estão envolvidas na patogenia de algumas doenças autoimunes, uma vez que a deleção ou neutralização do gene *IL17*, foi capaz de inibir processos autoimunes em modelos animais (IVANOV *et al.*, 2006; NAKAE *et al.*, 2003).

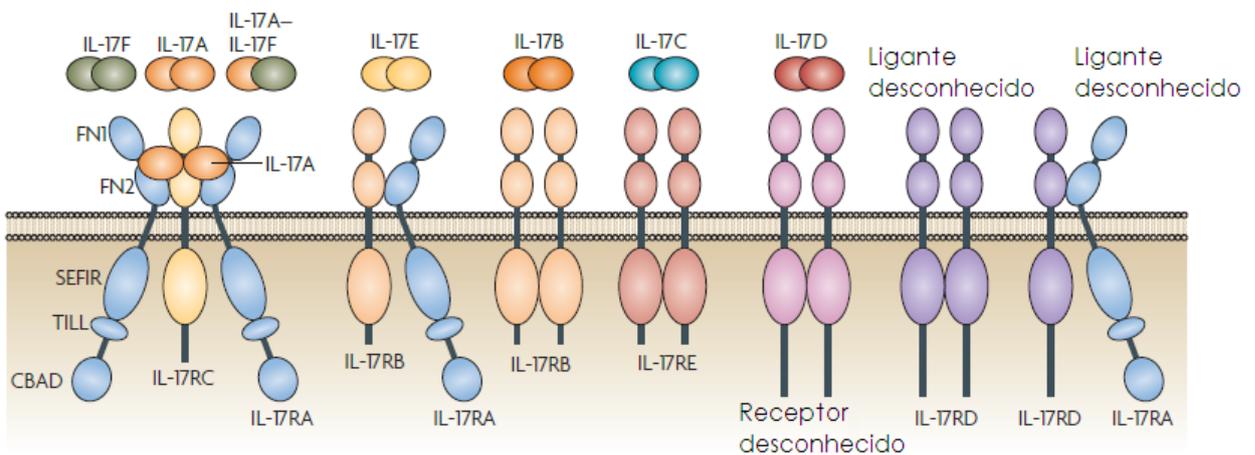
Em um estudo com murinos infectados pelo HTLV-1 foram observados altos níveis de IL-6 e IL-17, sugerindo a presença de uma resposta de perfil Th17 na infecção pelo vírus. Além disso, estudos também demonstraram que a proteína Tax é capaz de regular a expressão da IL-17 (DODON *et al.*, 2004; MARTINS *et al.*, 2010; SWAIMS *et al.*, 2010).

No entanto, apesar de ainda não estar claro se e como as células Th17 podem estar envolvidas na resposta imune contra a replicação do HTLV-1, sabe-se que a proteína viral Tax possui a capacidade de regular a expressão de diversos genes envolvidos na ativação e proliferação de células T, a exemplo do gene *IL17* (DODON *et al.*, 2004; LEAL *et al.*, 2013; MARTINS *et al.*, 2010).

Em um estudo anterior do nosso grupo, porém, não encontramos associação de um polimorfismo no gene *IL17A* com o desenvolvimento de HAM/TSP, apesar de termos observado a resposta Th1 comumente descrita na maioria dos artigos (NECO *et al.*, 2017b). Algumas pesquisas sugerem que o dano tecidual na HAM/TSP pode ocorrer devido à produção local de IFN- γ por células que se converteram para um fenótipo Th17/Th1 ou ex-Th17 (Th1 não clássica) em pacientes que não conseguiram estabelecer resposta Th1 ou atividade citotóxica eficiente (SARKIS *et al.*, 2013).

Porém, a IL-17A não é a única citocina da família IL-17 (Figura 7), que compreende diversas moléculas relacionadas a interleucina 17, que é secretada principalmente por células T ativadas. A família IL-17 agrupa seis integrantes que não possuem similaridade de sequência com nenhuma outra citocina conhecida: IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E e IL-17F. No entanto, ainda não foram descobertos todos os receptores e ligantes das moléculas dessa família (MOSELEY; HAUDENSCHILD; REDDI, 2003; STARNES *et al.*, 2002; YAO *et al.*, 1995a).

Figura 7 - Citocinas e receptores da Família IL-17



Fonte: Adaptado de Gaffen (2009)

2.4.2.1 Interleucina 17-A (IL-17A)

Antes chamada de CTLA-8 (*Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 8*), a IL-17A é a principal citocina secretada pelas células Th17 e desempenha importantes funções na defesa contra diversos patógenos e também na inflamação. Ela é uma glicoproteína homodimérica de 20 a 30 kDa, capaz de induzir diferentes tipos celulares a produzir citocinas pró-inflamatórias (IL-6), quimiocinas (CXCL8, CXCL9, CXCL10 e CXCL11) e metaloproteinases, ocasionando o recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório e inflamação tecidual. Assim, níveis de IL-17A elevados tem sido encontrados em doenças autoimunes como artrite reumatoide, doença inflamatória do intestino, esclerose múltipla entre outras (CHEN *et al.*, 2010; CHEN; KOLLS, 2017; FOSSIEZ *et al.*, 1996; HITCHON *et al.*, 2004; KAO *et al.*, 2004; KHADER *et al.*, 2007; WILSON *et al.*, 2007; YAO *et al.*, 1995a, 1995b).

2.4.2.2 Interleucinas 17B, 17C e 17D (IL-17B, IL-17C e IL-17D)

Dos membros da Família IL-17, as citocinas IL-17B, IL-17C e IL-17D são as menos caracterizadas. No entanto, apesar do receptor da IL-17D permanecer desconhecido, é sabido que a IL-17B liga-se ao receptor IL-17RB, enquanto a IL-17C é capaz de ligar-se a IL-17RE, levando à ativação da via NF- κ B. Além disso, IL-17B e IL-17C possuem a capacidade de estimular a transcrição de genes pró-inflamatórios e aumentar a produção de TNF- α , enquanto a IL-17D apresenta perfil pró-inflamatório em células endoteliais e inibe, *in vitro*, a proliferação de células progenitoras mieloides (GAFFEN, 2009; LI *et al.*, 2000; SHI *et al.*, 2000; STARNES *et al.*, 2001; YAMAGUCHI *et al.*, 2007).

2.4.2.3 Interleucina 17E (IL-17E)

A IL-17E é uma citocina produzida por células epiteliais da mucosa e outros tipos celulares, que se liga a um complexo receptor, formado por IL-17RB e IL-17RA. Estudos mostraram que a IL-17E, quando superexpressa, promove eosinofilia, além de estimular a produção de citocinas de perfil Th2 (CLAUDIO *et al.*, 2009; GAFFEN, 2009; LEE *et al.*, 2001). Segundo Dong (2008), a IL-17E também limita o desenvolvimento das células Th17 induzindo as células dendríticas a expressarem IL-13 ou inibindo a produção de IL-23 pelos macrófagos.

2.4.2.4 Interleucina 17F (IL-17F)

A IL-17F é a citocina melhor caracterizada da família IL-17, juntamente a IL-17A. É o único membro da família que foi cristalizado para estudos estruturais (HYMOWITZ *et al.*, 2001). Assim como a IL-17A, a IL-17F é um homodímero covalente, porém Chang e Dong (2007) demonstraram que essas duas citocinas podem formar heterodímeros. A sinalização de IL-17A, IL-17F e do heterodímero IL-17A - IL-17F acontece através das subunidades do receptor, IL-17RA e IL-17RC, que formam um complexo. Porém, as duas citocinas tem efeitos biológicos diferentes: enquanto a IL-17A está envolvida na patologia de doenças autoimunes e no recrutamento de neutrófilos com efeitos de sinalização mais potentes, a IL-17F está também envolvida no recrutamento de neutrófilos e na proteção contra patógenos extracelulares, no entanto, com uma resposta mais fraca (GAFFEN, 2009; KOLLS; LINDÉN, 2004; KUESTNER *et al.*, 2007; WRIGHT *et al.*, 2007; WRIGHT *et al.*, 2008;).

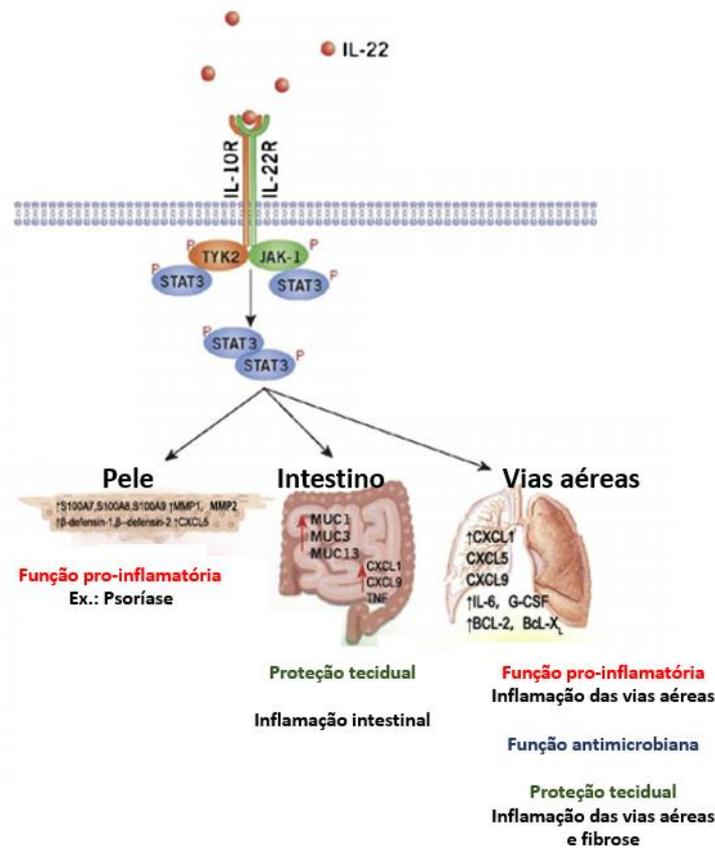
2.4.3 Células Th22 e doenças inflamatórias

As células Th22 são uma nova subpopulação de células T *helper*, diferenciadas a partir de células T CD4⁺ *naive*, na presença de IL-6 e TNF- α , e sua principal citocina efetora é a IL-22, uma citocina pertencente à família IL-10 (CHUNG *et al.*, 2006; DUMOUNTIER *et al.*, 2000; TRIFARI *et al.*, 2009).

Diferentemente das células Th17, que podem secretar IL-17, IL-22 e IFN- γ , as células Th22 são caracterizadas pela secreção de IL-22, IL-13 e TNF- α (DUHEN *et al.*, 2009; FARD *et al.*, 2016; TRIFARI *et al.*, 2009).

As células Th22 foram recentemente descobertas e associadas a patogênese de várias doenças inflamatórias. Porém, ainda não há consenso sobre qual o fator de transcrição relacionado à diferenciação destas células, apesar de estudos apontarem para o envolvimento de AhR. Sabe-se, no entanto, que a IL-22, principal citocina secretada pelas células Th22, pode levar a diferentes consequências funcionais e é importante na resposta de doenças inflamatórias, como psoríase, artrite reumatoide e doenças pulmonares (Figura 8). Porém, sua função em diversas outras desordens permanece desconhecida (SHABGAH *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2012).

Figura 8 – Consequências funcionais da via IL-22-IL-22R



Fonte: Adaptado de Yang e Zheng (2014)

Em doenças virais, como o HIV, níveis de IL-22 apresentaram-se mais elevados em relação a indivíduos controle, além de já ter sido associado à resistência à infecção pelo HIV em indivíduos que não soroconverteram apesar do contato com o vírus diversas vezes (GORENEC *et al.*, 2016; THIBODEAU *et al.*, 2017).

Portanto, é possível que as populações de células Th17 e Th22 e seus fatores de transcrição estejam envolvidos na patogênese e contribuindo para o perfil inflamatório observado nas doenças associadas ao HTLV. Desta forma, os efeitos da sinalização de citocinas produzidas por essas populações e suas atividades pró-inflamatórias na resposta imune podem revelar o potencial de uso destas vias no tratamento de diversas doenças imunológicas.

2.4.4 Células T CD8⁺ na Infecção pelo HTLV-1

Embora o HTLV-1 seja encontrado predominantemente em células T CD4⁺, as células T CD8⁺ também podem ser infectadas pelo vírus e, mais ainda, ter papel crítico na

imunopatogênese das doenças associadas a este patógeno, por exercerem função antiviral ou protetora (HANON *et al.*, 2000a; POPOVIC *et al.*, 1984).

A ATLL, por exemplo, pode ser explicada pelo desenvolvimento de linfócitos T CD8⁺ específicos para HTLV-1, uma vez que esses reconhecem como alvo principal a proteína viral Tax, cuja função é de suma importância na dinâmica viral. Assim, células T CD8⁺ autólogas exercem sua função citotóxica eliminando rapidamente as células T CD4⁺ naturalmente infectadas pelo HTLV-1 e que expressam a Tax (BANGHAM, 2009; CURRER *et al.*, 2012; HANON *et al.*, 2000a, 2000b).

Os linfócitos T CD8⁺ atuam em mecanismos antivirais e imunopatológicos. Assim, podem assumir um papel importante na manutenção da infecção pelo HTLV-1 ou desfecho clínico HAM/TSP, uma vez que, além de exercerem sua função citotóxica, secretam citocinas essenciais para a manutenção da resposta inflamatória (PROIETTI *et al.*, 2002).

Parte desse efeito se deve ao fato de sua principal citocina efetora, o interferon gama (IFN- γ), apresentar ampla gama de atividades pró-inflamatórias. Os linfócitos T CD8 que produzem IFN- γ são conhecidos como células Tc1. Quando produzido por essas células, o IFN- γ atua diretamente na diferenciação de células T CD4⁺ de perfil Th1, que também são capazes de produzi-lo e desempenham um papel crucial na eliminação dos vírus. Além disso, estudos evidenciam que o IFN- γ é o principal responsável pela ativação do sistema imunológico observada entre os portadores de HTLV-1 assintomáticos e ainda mais evidente entre os indivíduos com HAM/TSP (MONTANHEIRO *et al.*, 2009).

Atualmente, receptores inibitórios como PD-1 (*Programmed cell death-1*) tem sido estudados em diferentes populações de células T. Na população de células T CD8 de células mononucleares do sangue periférico (PBMC), por exemplo, esse receptor é um importante marcador de exaustão durante infecções virais crônicas, tendo seus níveis associados à progressão de infecções virais, como HIV. Inclusive, estudos demonstram que o bloqueio dessa via, utilizando o ligante PDL-1, pode restaurar as funções das células T CD8 e reduzir a carga viral em pacientes com HIV (AHN *et al.*, 2018; BARBER *et al.*, 2006; DAY *et al.*, 2006).

Na infecção pelo HTLV-1, estudos demonstraram o comprometimento da resposta dos linfócitos T citotóxicos (CTL), o que resulta na persistência viral, devido ao aumento da expressão de PD-1. Assim como na infecção pelo HIV, o bloqueio de PD-1, a partir de PDL-1 também melhorou a função efetora (EZINNE *et al.*, 2014; KOZAKO *et al.*, 2008).

Porém, apesar da realização de pesquisas que busquem elucidar a imunopatogênese das doenças associadas ao HTLV-1, essas continuam sendo negligenciadas do ponto de vista terapêutico. A HAM/TSP, por exemplo, foi descrita há mais de 40 anos e, embora os indivíduos possam ficar paraplégicos, ainda não há tratamento eficaz ou capaz de retardar a progressão da doença. Do mesmo modo, estudos de biomarcadores de progressão ainda são muito controversos, o que evidencia a necessidade de pesquisas que permitam responder ao questionamento dos indivíduos infectados, porém assintomáticos, que não sabem se e quando poderão progredir para alguma doença associada ao HTLV-1.

Dessa forma, o estudo de subpopulações celulares mais recentemente descritas pode contribuir para um melhor entendimento sobre a imunopatogênese da HAM/TSP e da infecção pelo HTLV-1, além de evidenciar o potencial uso dessas vias no desenvolvimento de um tratamento para as doenças relacionadas ao vírus.

3 JUSTIFICATIVA

A infecção pelo HTLV-1 é endêmica no Brasil e possui grande prevalência na região Nordeste. A Paraparesia Espástica Tropical/Mielopatia Associada ao HTLV-1 (HAM/TSP), principal manifestação neurológica relacionada ao vírus, representa um problema de saúde mundial, por não possuir tratamento efetivo e levar parte dos pacientes ao comprometimento motor, urinário e, muitas vezes, cognitivo. A resposta imune do hospedeiro é sabidamente um fator importante no desenvolvimento da HAM/TSP e de outras manifestações clínicas relacionadas ao vírus. Entretanto, ainda existem divergências na literatura sobre o papel de subpopulações celulares clássicas, como Th1, ou não existem relatos sobre populações mais recentemente descritas, como Th17, Th22 e subpopulações de T CD8⁺, na sintomatologia desencadeada pelo HTLV-1. Assim a descoberta das condições inflamatórias relacionadas ao vírus é de grande importância para o conhecimento dos mecanismos patogênicos associados ao desenvolvimento das doenças causadas por ele. A partir desse entendimento, será possível contribuir para a melhor elucidação dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos no desenvolvimento da HAM/TSP, na perspectiva de melhorar a qualidade de vida desses pacientes.

4 OBJETIVO GERAL

Verificar a existência de associação das frequências de células T CD4⁺ (Th1, Th17 e Th22) e T CD8⁺ (Tc1 e CD8⁺ IFN- γ ⁺ PD-1⁺) com a sintomatologia de indivíduos infectados pelo HTLV-1.

4.1 *Objetivos Específicos*

- a) Avaliar as características epidemiológicas e clínicas da amostra;
- b) Quantificar a carga proviral dos indivíduos infectados pelo HTLV-1;
- c) Determinar a frequência das populações de células Th17 total (CD4⁺ IFN- γ ⁻ IL-17⁺), Th17 IL-22⁺ (CD4⁺ IFN- γ ⁻ IL-17⁺ IL-22⁺), Th17/Th1 (CD4⁺ IFN- γ ⁺ IL-17⁺ IL-22⁻), Th22 (CD4⁺ IFN- γ ⁻ IL-17⁻ IL-22⁺), Th1 IL-22⁺ (CD4⁺ IFN- γ ⁺ IL-17⁻ IL-22⁺), CD4⁺ IFN- γ ⁺, Tc1 (CD8⁺ IFN- γ ⁺), CD8⁺ PD-1⁺ e CD8⁺ IFN- γ ⁺ PD-1⁺ no sangue periférico de indivíduos infectados pelo HTLV-1 assintomáticos, sintomáticos (HAM/TSP) e com outras manifestações clínicas;
- d) Verificar existência de associação entre as frequências das subpopulações estudadas com a presença de sintomatologia nos indivíduos infectados pelo HTLV-1;
- e) Verificar existência de associação entre as frequências das subpopulações estudadas com o gênero dos indivíduos infectados pelo HTLV-1;
- f) Verificar existência de correlação entre as frequências das subpopulações estudadas nos grupos estudados;
- g) Quantificar mediadores solúveis pró e anti-inflamatórios (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN- γ , TNF- α , CXCL8, CXCL9, CXCL10, CCL2 e CCL5) no plasma de indivíduos infectados pelo HTLV-1;
- h) Verificar existência de associação entre os níveis das citocinas e quimiocinas no plasma com a presença de HAM/TSP.

5 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

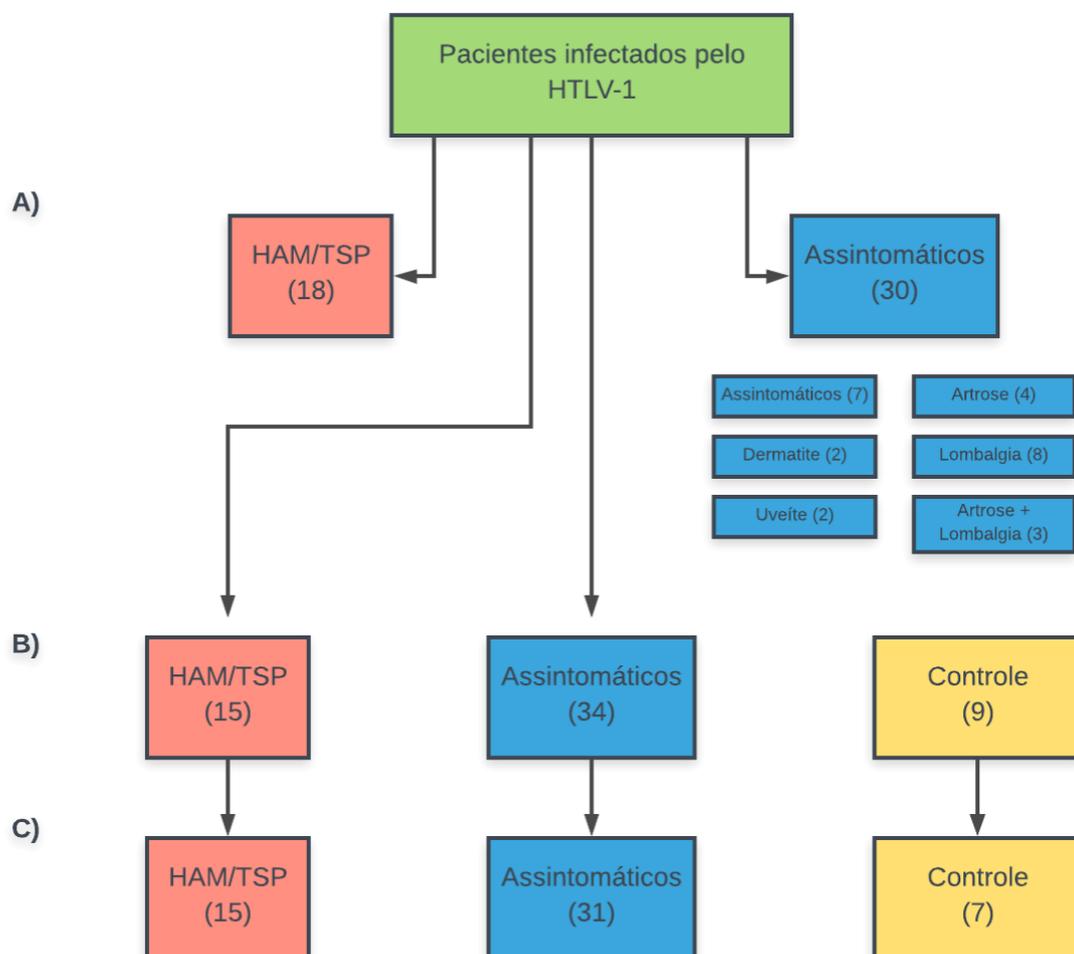
Esta pesquisa pode ser classificada como um estudo transversal analítico do tipo caso-controle com comparação de grupos. O tamanho da amostra foi definido por conveniência.

5.1 População Estudada

A amostra dos indivíduos, de ambos os sexos, com diagnóstico positivo para HTLV-1 foi formada por conveniência no período de agosto de 2016 a janeiro de 2019.

A figura abaixo (Figura 9) ilustra o número da amostra e eventuais perdas de acordo com cada parte da pesquisa (citometria de fluxo, dosagem de citocinas e quimiocinas).

Figura 9 – Número de amostra de acordo com os estudos.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota: (A) Número amostral do estudo das subpopulações celulares. Após estratificação do grupo assintomático em não-HAM, quatro indivíduos foram excluídos. (B) Número amostral do estudo de quimiocinas. (C) Número amostral para o estudo de citocinas.

5.2 Local

Os indivíduos infectados pelo HTLV participantes da pesquisa foram atendidos e são acompanhados na Unidade de Cuidados Paliativos do Hospital Universitário Oswaldo Cruz (UCP-HUOC), referência estadual e regional no atendimento de indivíduos infectados pelo vírus. Os experimentos foram realizados no Departamento de Virologia e Terapia Experimental (LaViTE) e no Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT), ambos do Instituto Aggeu Magalhães, e no Laboratório de Biologia Molecular de Vírus da Universidade de Pernambuco (LBMV-UPE).

5.3 Coleta e Processamento das Amostras

Os dados clínicos e epidemiológicos foram coletados, de forma confidencial e anônima, por meio de questionário previamente elaborado e análise de prontuários, permitindo o agrupamento dos indivíduos segundo a presença ou ausência de sintomatologia.

Os indivíduos que aceitaram participar da pesquisa permitiram a coleta de amostras de sangue periférico (25ml), através de punção venosa à vácuo em tubo com o anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Parte dessa amostra foi destinada à quantificação das células Th17, Th22 e T CD8⁺ através de citometria de fluxo. O restante da amostra foi destinado à quantificação da carga proviral e dosagem dos níveis de citocinas e quimiocinas no plasma.

5.4 Grupos do Estudo

Os participantes do estudo foram agrupados inicialmente em dois grupos: 1) Grupo formado por indivíduos maiores de 18 anos, com diagnóstico positivo para HTLV-1, e diagnóstico clínico de HAM/TSP; 2) Grupo formado por indivíduos maiores de 18 anos, com diagnóstico positivo para HTLV-1, porém assintomático para HAM/TSP (assintomático não-HAM) e com tempo de diagnóstico da infecção igual ou superior a três anos.

Posteriormente, os indivíduos assintomáticos não-HAM foram estratificados de acordo com manifestações clínicas que podem estar associadas ao vírus.

Além disso, para o estudo dos mediadores solúveis também foi criado um grupo composto por indivíduos saudáveis, com triagem negativa para HTLV-1 e 2, para servir como controle dos experimentos realizados.

5.4.1 Critérios de Inclusão

Foram incluídos no estudo indivíduos maiores de 18 anos infectados pelo vírus HTLV-1, que assinaram o termo de consentimento e com diagnóstico confirmado por outros laboratórios (LACEN-Pernambuco, HEMOPE) através das técnicas ELISA, Western Blot (WB), exame de LCR ou PCR positiva para HTLV-1.

5.4.2 Critérios de Exclusão

Foram excluídos do estudo indivíduos que se encontraram em alguma das situações abaixo:

- a) Ausência de confirmação laboratorial por Western Blot, LCR ou PCR;
- b) Portadores de outras comorbidades (HIV, HCV, Acidente Vascular Cerebral, doenças autoimunes, distúrbios neurológicos como Mal de Parkinson e Neurosífilis, e outras neoplasias que não ATLL).

5.5 Coleta de Sangue e Obtenção das Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMCs)

O volume de sangue periférico coletado de cada indivíduo foi 25 ml, através de punção venosa à vácuo, em tubos vacutainer com o anticoagulante EDTA. O sangue foi diluído em tampão fosfato salino (PBS, de *Phosphate-buffered saline*) e então transferido para tubos Falcon contendo a solução de gradiente de concentração Ficoll-Hypaque (GE Healthcare, Upsala, Sweden), que apresenta densidade de 1.077 g/mL.

Em seguida, para separação das células mononucleares do sangue periférico (PBMC), as amostras foram centrifugadas a 800xg por 30 minutos. Após este período, coletou-se 2 ml de plasma (camada superior do tubo) e o anel contendo as PBMCs foi coletado e transferido para outro tubo, que foi lavado com PBS durante centrifugação de 10 minutos a 400 xg.

Após a lavagem, as células foram ressuspensas em 1 ml de meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de Penicilina/Streptomicina, e então contadas no Vi-CELL XR Cell Viability Analyzer (Beckman Coulter Inc., Fullerton, California).

Parte das células (3×10^6) foi destinada à extração de DNA, para quantificação da carga proviral e genotipagem de SNPs, utilizando o kit de extração *DNA Purification Wizard*

Genomic (PROMEGA), seguindo as instruções do fabricante. O restante das células ($7,5 \times 10^6$) foi utilizado para os experimentos de citometria de fluxo.

5.6 Citometria de Fluxo

Para estimular as células a produzirem citocinas, estas foram incubadas por 24h a 37°C , na presença de fitohemaglutinina (PHA, de *Phytohaemagglutinin*). Quatro horas antes do final da incubação, se adicionou o inibidor de transporte de proteínas Golgistop (BD Biosciences, La Jolla, California).

5.6.1 Marcação de Superfície

Após as 24 horas de incubação com PHA, $220\mu\text{l}$ de EDTA foram adicionados aos tubos da cultura. Depois de 10 minutos, as células sofreram lavagem com PBS Wash (PBS com Azida de Sódio) e passaram por nova centrifugação, desta vez a $400 \times g$ (ou 1500 rpm) por 10 minutos. O sobrenadante foi então descartado e o pellet celular ressuspendido em 1 ml de PBS Wash.

Para marcação do painel de citometria foram utilizadas 3×10^6 células. Portanto, o volume correspondente à quantidade de células foi transferido para tubos de citometria contendo os anticorpos de superfície (Quadro 1), dependendo do painel celular a ser observado. Para os painéis das células Th17 e Th22, o anticorpo de superfície foi o anti-CD4-PECy7, enquanto para o painel das células T CD8⁺, utilizamos anti-CD8-PECy7 e anti-PD-1-PE.

Quadro 1 – Anticorpos utilizados nos experimentos de Citometria de Fluxo

Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Fabricante
Painel de Células Th17 e Th22			
CD4	PE-Cy7	SK3	BD Biosciences
IFN- γ	APC	IC285	R&D Systems
IL-17	PE	N49-653	BD Biosciences
IL-22	FITC	22URTI	eBioscience
Painel de Células T CD8			
CD8	PE-Cy7	RPA-T8	BD Biosciences
PD-1	PE	MIH4	BD Biosciences
IFN- γ	APC	BSB3	BD Biosciences

Fonte: Elaborado pelo autor.

Após adição dos anticorpos de superfície, os tubos foram então incubados por 30 minutos ao abrigo da luz, lavados e fixados, por 20 minutos, com 100 μ l de BD Cytotfix/Cytoperm.

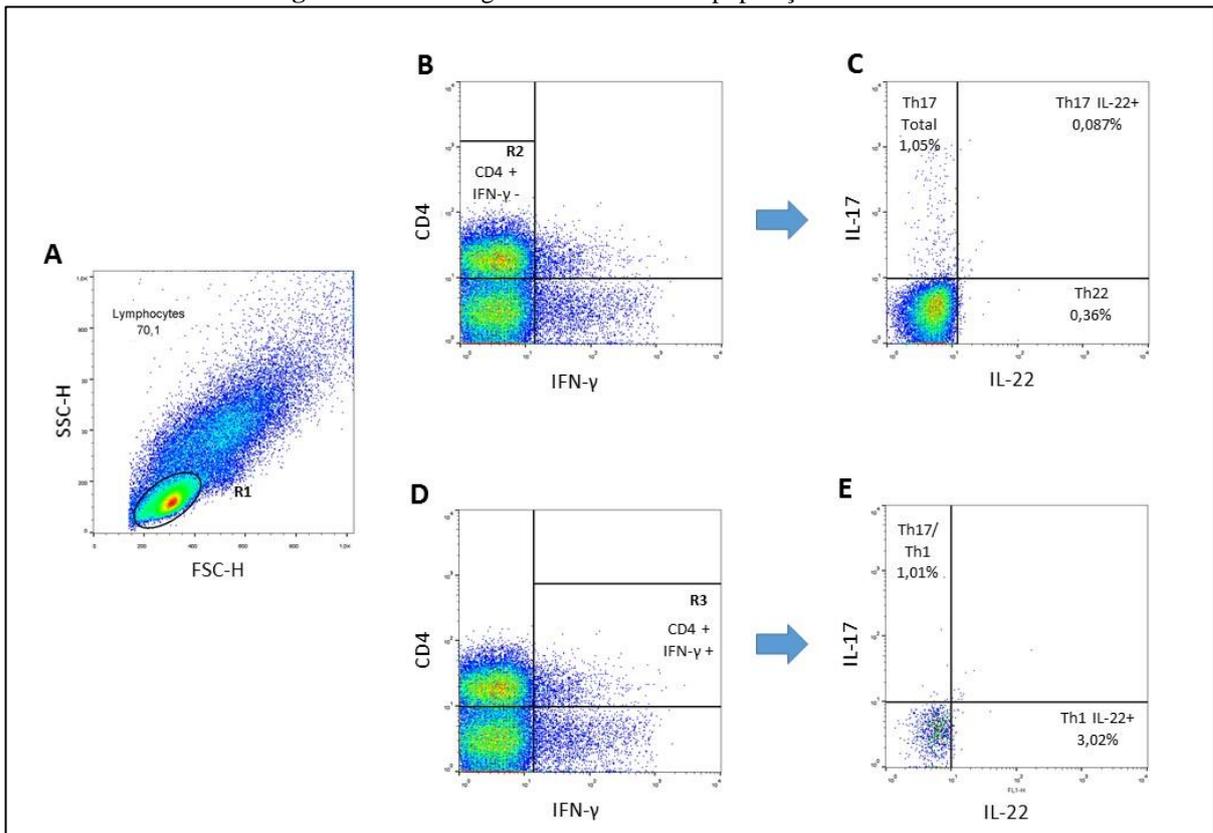
5.6.2 Marcação de Citocinas Intracelulares

Após a fixação dos anticorpos de superfície, a permeabilização foi realizada para que os anticorpos anticitocinas entrassem nas células. Para tanto, foi adicionado 1 ml de BD Perm-Wash 1X gelado nas amostras e essas foram centrifugadas por 5 minutos a 400xg. Após descartar o sobrenadante dos tubos, os anticorpos intracelulares foram adicionados aos tubos, que foram incubados por 30 minutos ao abrigo da luz.

Em seguida, foram realizadas mais duas lavagens, uma com Perm-Wash e outra com PBS-Wash, ambas de 5 minutos a 400xg, e as células passaram por fixação, com a utilização da solução BD Cytotfix por 15 minutos na câmara fria (4°C – 8°C) e ao abrigo da luz. Uma última lavagem foi feita para remover o excesso da solução fixadora, e 300 μ l de PBS-Wash foram adicionados para posterior leitura no citômetro FACS Calibur (BD Biosciences, La Jolla, California), com a aquisição de 50.000 eventos.

5.6.3 Estratégia de Análise

As frequências das populações celulares foram determinadas através do software FlowJo X (Ashland, OR, USA). Primeiramente, a população de linfócitos foi selecionada (Figura 10A) e em seguida, foi criada uma *gate* nas células CD4⁺ IFN- γ ⁻ (Figura 10B) para determinar as frequências de células Th17 totais (Figura 10C - CD4⁺ IFN- γ ⁻ IL-17⁺ IL-22⁻), Th17 IL-22⁺ (CD4⁺ IFN- γ ⁻ IL-17⁺ IL-22⁺) e Th22 (CD4⁺ IFN- γ ⁻ IL-17⁻ IL-22⁺). Na análise de outras subpopulações raras, foram selecionadas apenas as células T CD4⁺ IFN- γ ⁺ (Figura 10D), que serviram para determinar as frequências das células Th17/Th1 (Figura 10E - CD4⁺ IFN- γ ⁺ IL-17⁺ IL-22⁻) e Th1 IL-22⁺ (CD4⁺ IFN- γ ⁺ IL-17⁻ IL-22⁺).

Figura 10 – Estratégia de análise das subpopulações estudadas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.7 Quantificação de Mediadores Solúveis - Citocinas e Quimiocinas

As citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α e IL-17) e quimiocinas (CCL2, CCL5, CXCL8, CXCL9 e CXCL10) foram quantificadas no plasma dos indivíduos, através da técnica de CBA (Cytometric Bead Array), técnica que, por citometria de fluxo, detecta os níveis de diferentes proteínas em uma única amostra. Os kits utilizados foram BD *Cytometric Bead Array Human (CBA) Th1/Th2/Th17* e BD *CBA Human Chemokine Kit* (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

No início do experimento, é necessário reconstituir os padrões de citocinas e quimiocinas, de acordo com o kit, uma vez que esses vêm liofilizados. Para preparar a curva padrão, as esferas padrão foram transferidas para um tubo cônico tipo Falcon e 2 mL ou 4 mL do *Assay Diluent* foram adicionados, respectivamente, para o kit de citocinas ou quimiocinas. Esses tubos foram nomeados “*Top Standard*” e deixados em temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente, as proteínas foram reconstituídas por pipetagem e nove tubos de citometria foram nomeados para realizar a diluição seriada, respectivamente, *Top Standard*,

1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 e 1:256. Além disso, um tubo contendo apenas o *Assay Diluent* foi utilizado para servir como controle negativo (branco). Em seguida, 300 µL do *Assay Diluent* foram adicionados em cada um dos tubos para realizar a diluição seriada, transferindo 300 µL de um tubo ao outro, a começar pelo “Top Standard” para o “1:2” e assim sucessivamente, até o tubo “1:256”.

Logo depois, as beads de cada citocina (sete, no total) foram misturadas, assim como as beads das quimiocinas (cinco, no total), a depender do kit, formando o mix de beads. Cada bead possui diferentes intensidades de fluorescência e vem conjugadas ao anticorpo de captura específico de cada alvo. Após essa etapa, o mix de beads, assim como o reagente de detecção PE (Phycoerythrin) foram adicionados a cada tubo contendo a amostra, conforme o Quadro 2, e esses foram incubados por três horas, ao abrigo da luz e em temperatura ambiente.

Quadro 2 – Protocolo de preparação do CBA para citocinas e quimiocinas

Reagentes	Volume utilizado	
	Citocinas	Quimiocinas
Amostra	25µl	25 µl
Mix de Beads	35 µl	25 µl
Reagente de Detecção PE	25 µl	25 µl

Fonte: Elaborado pelo autor.

Após a incubação, 500 µl do *Wash Buffer* foram adicionados em cada tubos para lavagem dos mesmos, a partir de centrifugação a 200g, por 5 minutos. Em seguida, os sobrenadantes foram descartados e então se adicionou 300 µl de *Wash Buffer*, para ressuspender o pellet de beads e as amostras seguirem para a leitura, que foi realizada no citômetro FACS Aria III (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA), disponível no Núcleo de Plataformas Tecnológicas do IAM.

Após a leitura das amostras, os dados foram obtidos no *software* FCAP Array (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA), e analisados no GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA).

5.8 Quantificação da Carga Proviral

A carga proviral dos indivíduos participantes da amostra também foi quantificada através de PCR em Tempo Real, utilizando o sistema TaqMan[®] no equipamento *Applied Biosystems* [®]

7500 (Foster, CA, USA), nas seguintes condições de ciclagem: 1) um ciclo de 50°C, durante 2 minutos; 2) um ciclo de 95°C, por 10 minutos; 3) 50 ciclos de 90°C, durante 50 segundos; e 4) 60°C por 1 minuto. O protocolo utilizado encontra-se descrito no Quadro 3.

Quadro 3 – Protocolo da PCR em Tempo Real para quantificação da carga proviral

Reagente	Volume
Água Milli-Q	8,5 µl
Primer Forward	0,5 µl
Primer Reverse	0,5 µl
Sonda TaqMan®	0,5 µl
TaqMan® Universal PCR Master Mix	15 µl
DNA (Amostra)	5 µl
Volume final	30 µl

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.9 Análises Estatísticas

Os dados obtidos foram armazenados e analisados no software *GraphPad Prism 7.00* (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA), passando inicialmente pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk.

Para as análises de citometria de fluxo e carga proviral foram realizados os testes T de Student ou Mann-Whitney U, bem como Kruskal-Wallis, quando necessário. Nas análises de correlações, de acordo com a distribuição dos dados, foram utilizados os testes de correlação de Pearson ou Spearman.

5.10 Considerações Éticas

A pesquisa foi aprovada pelos Comitês de Ética em Pesquisa da Universidade de Pernambuco (CEP HUOC/PROCAPE), com registro CAAE 16973113.5.1001.5192 (Anexo A), e do IAM/FIOCRUZ-PE (CAAE: 50563115.9.0000.5190) (Anexo B). Todos os indivíduos participantes foram informados sobre o estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice B).

6 RESULTADOS

A população de estudo foi inicialmente classificada em dois grupos: HAM/TSP (n=18) e assintomáticos (n=30), totalizando 48 indivíduos para as análises das frequências das populações celulares. O gênero (sexo biológico) feminino foi predominante nos dois grupos, entretanto sem apresentar valor significativo do ponto de vista estatístico, assim como a idade, cuja mediana foi maior no grupo HAM/TSP em relação à média do grupo assintomático não-HAM (Tabela 1).

Tabela 1 – Características da população do estudo das subpopulações celulares

	HAM/TSP	Assintomáticos não-HAM	P
Indivíduos, n	18	30	
Idade (média)	59*	56,9	0,69 [†]
Gênero			
Feminino, n	12	20	>0,9**
Masculino	6	10	
Carga proviral (cópias/μl)	13851	637	0,001***

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota: * Mediana/ [†] Teste t / ** Teste exato de Fischer / *** Mediana. Não foi possível quantificar a carga proviral de todos os indivíduos devido à quantidade de amostra.

Entretanto, para outras análises, estratificamos o grupo dos assintomáticos não-HAM a partir da observação, nos prontuários, de manifestações clínicas comumente relacionadas ao HTLV-1. Entretanto, esses sintomas podem ou não ter o HTLV-1 como etiologia confirmada, por haver outros fatores a serem levados em consideração, como atividade laboral, sendo necessárias maiores investigações no histórico dos indivíduos. Ainda assim, essas manifestações apresentam caráter inflamatório e devem ser levadas em consideração na análise dos dados.

Dessa maneira, quando o grupo assintomático foi estratificado, puderam ser classificados seis grupos distintos: sem nenhuma manifestação clínica/assintomáticos 2 (n=7), dermatite (n=2), uveíte (n=2), artrose (n=4), lombalgia (n=8), artrose e lombalgia (n=3), totalizando 26 indivíduos, devido à exclusão de quatro indivíduos que possuíam mais de três das manifestações anteriormente citadas, que poderiam estar causando viés de classificação.

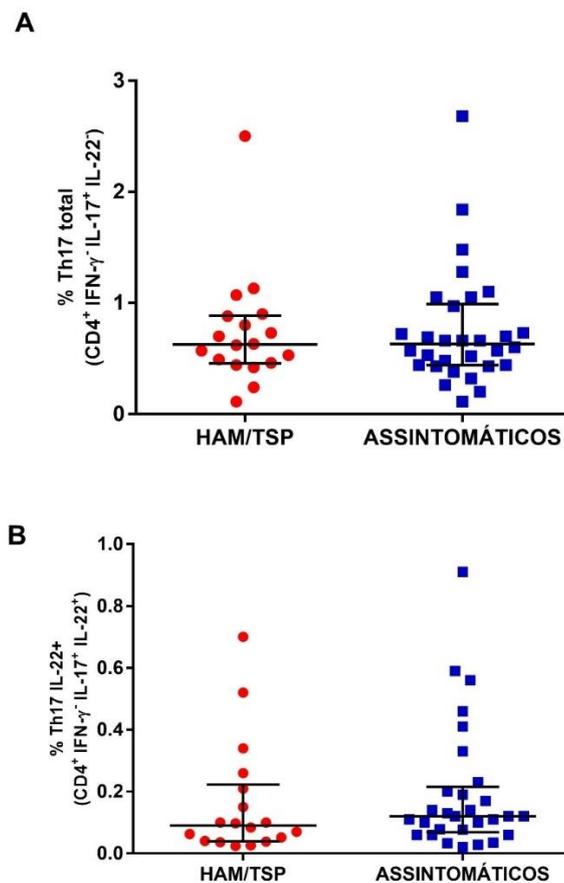
6.1 HAM/TSP x Assintomáticos

Como explicado anteriormente, a população do estudo foi inicialmente classificada em dois grupos: HAM/TSP (n=18) e assintomáticos (n=30). As análises a seguir consideraram essa classificação inicial.

6.1.1 As frequências das subpopulações de Células Th17 são similares entre indivíduos HAM/TSP e assintomáticos não-HAM

Ao analisar as frequências das células Th17 total (ou clássicas), classificadas em nosso estudo como $CD4^+ IFN-\gamma^- IL-17^+ IL-22^-$, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes, como pode ser observado na Figura 11. O mesmo se repetiu quando analisamos as frequências das células Th17 produtoras de IL-22 ($CD4^+ IFN-\gamma^- IL-17^+ IL-22^+$).

Figura 11 – Frequência das células Th17 circulantes.

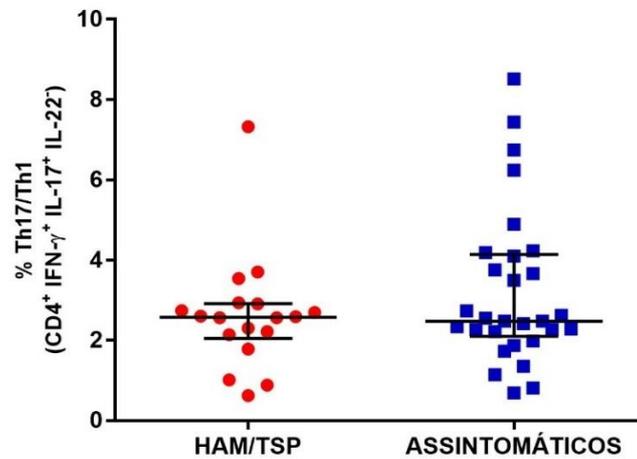


Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota: (A) A frequência de células Th17 total não diferiu entre os grupos; (B) Células T $CD4^+$ produtoras de IL-17 e IL-22 também não diferiram nos grupos estudados. Teste de Mann-Whitney. Barras representam mediana com o intervalo interquartil.

A outra subpopulação de células Th17 estudada, denominadas Th17/Th1, que são caracterizadas por coexpressar IFN- γ e IL-17, também apresentou frequências similares entre os grupos HAM/TSP e assintomáticos não-HAM (Figura 12).

Figura 12 – Frequência das células Th17/Th1 circulantes.



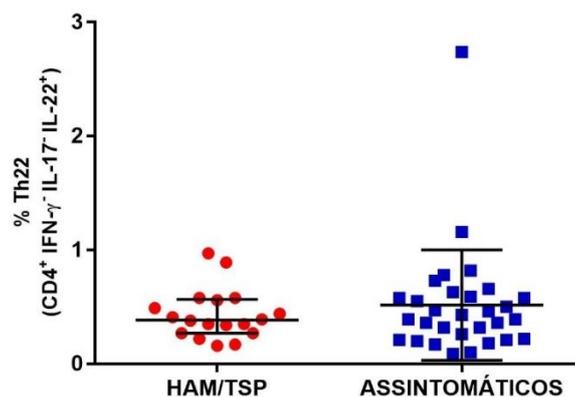
Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota: Teste de Mann-Whitney. Barras representam mediana com o intervalo interquartil.

6.1.2 As frequências das Células Th22 não diferem entre indivíduos HAM/TSP e assintomáticos não-HAM

Assim como para as células produtoras de IL-17, as frequências das células Th22 (CD4⁺ IFN- γ IL-17⁻ IL-22⁺) não se apresentaram diferentes ao comparar os indivíduos HAM/TSP com os portadores assintomáticos não-HAM infectados pelo vírus (Figura 13).

Figura 13 – Frequência das células Th22 circulantes.



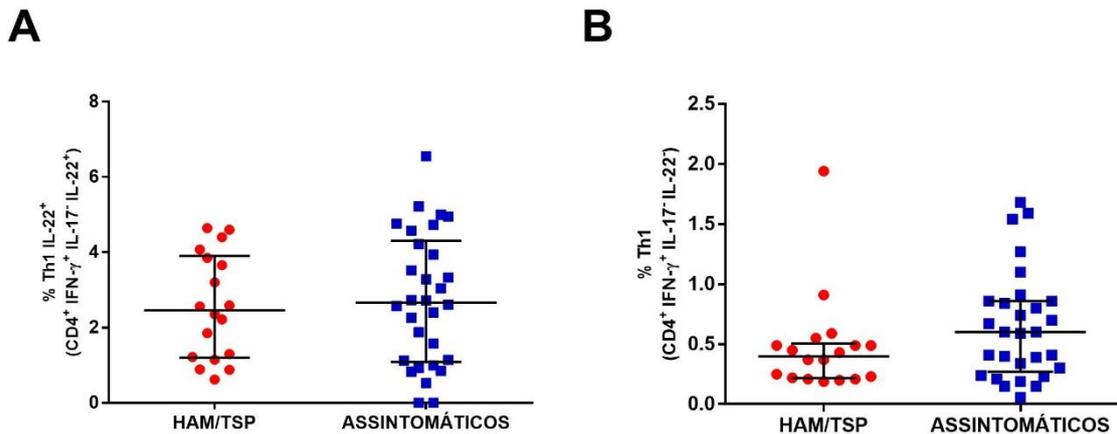
Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota: Teste de Mann-Whitney. Barras representam mediana com o intervalo interquartil.

6.1.3 As Células Th1 IL-22⁺ e Th1 apresentam frequências similares entre indivíduos HAM/TSP e assintomáticos não-HAM

Na análise das células Th1, observamos que não houve diferenças estatisticamente significantes nas frequências das células Th1 ou Th1 produtoras de IL-22 entre os grupos estudados (Figura 14A).

Figura 14 – Frequência das células Th1 IL-22⁺ e Th1 circulantes.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota: (A) A frequência de células Th1 IL-22⁺ não diferiu entre os grupos; (B) Células Th1, negativas para IL-17 e IL-22, mas positivas para IFN- γ também apresentaram frequências similares entre os grupos.

Teste de Mann-Whitney. Barras representam mediana com o intervalo interquartil.

6.1.4 As Células Tc1, CD8⁺ PD-1⁺ e CD8⁺ PD-1⁺ IFN- γ ⁺ apresentam frequências similares entre indivíduos HAM/TSP e assintomáticos não-HAM

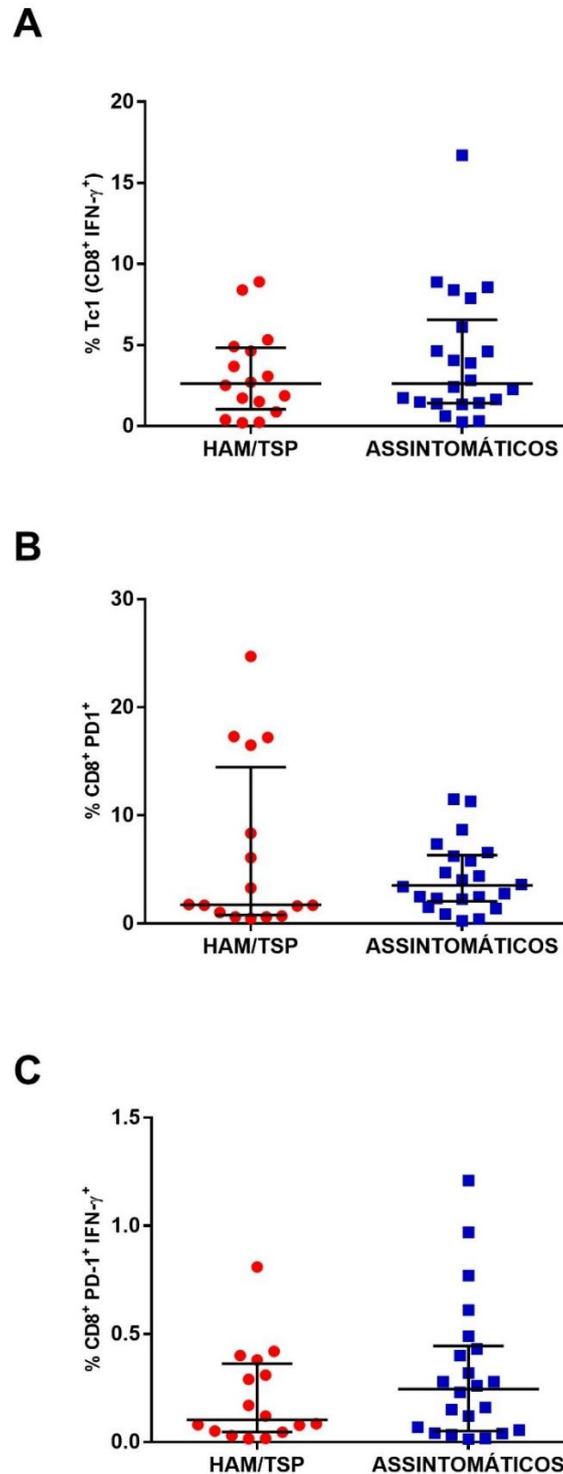
Ao longo do desenvolvimento do projeto, ao perceber que grande parte do IFN- γ não era produzida por células T CD4⁺, como pôde ser observado anteriormente, nos Procedimentos Metodológico, decidimos avaliar o percentual de células T CD8⁺ que estariam produzindo esta citocina. Além disso, incluímos no painel o anticorpo anti-PD-1, a fim de verificar a frequência de células T CD8⁺ que expressam esse marcador de exaustão.

Dessa maneira, como o projeto já estava em andamento, o número da amostra se reduziu um pouco e a população estudada para as análises das células T CD8⁺ foi constituída por 16 indivíduos HAM/TSP e 22 portadores assintomáticos não-HAM, todos participantes da amostra inicial, mas agora totalizando 38 indivíduos estudados.

Diferentemente do resultado para as células T CD4⁺, no qual o grupo assintomático coexpressou mais IFN- γ em relação aos indivíduos HAM/TSP, para as células T CD8⁺ não

foram encontradas diferenças estatisticamente significantes na coexpressão de CD8 isoladamente com IFN- γ ou PD-1, ou com ambos, como pode ser visto na Figura 15.

Figura 15 – Frequência das células T CD8⁺ circulantes.



Fonte: Elaborada pelo autor.

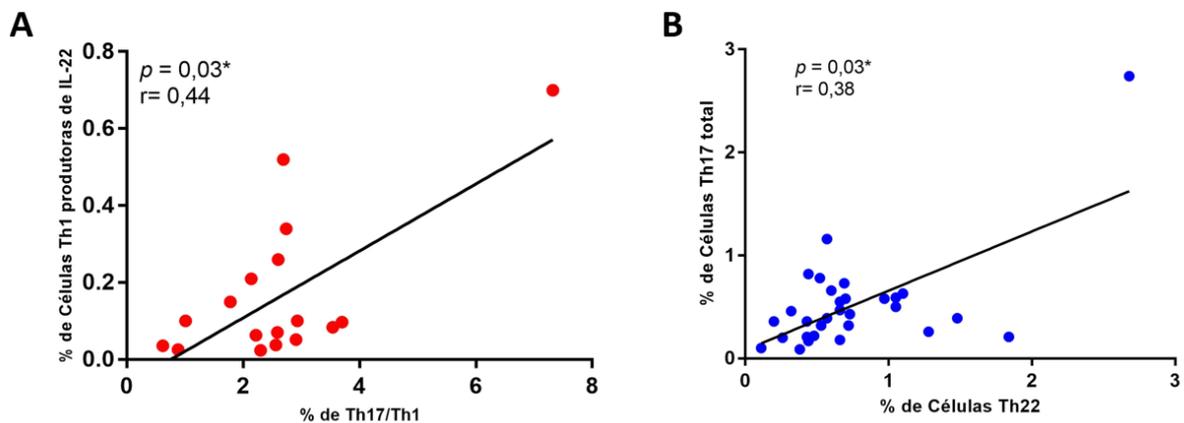
Nota: (A) A frequência de células Tc1 se apresentou similar entre os grupos; (B) Não houve diferença entre as células T CD8⁺ que expressam PD-1; ou (C) Células T CD8⁺ que coexpressaram PD-1 e IFN- γ .

Teste de Mann-Whitney. Barras representam mediana com o intervalo interquartil.

6.1.5 Populações produtoras de IL-22 estão correlacionadas com subpopulações de Th17

As frequências de algumas subpopulações estudadas apresentaram correlação com outras nos grupos estudados (Figura 16). Observamos moderada correlação positiva entre as células Th1 IL-22⁺ com as células Th17/Th1, no grupo HAM/TSP ($p=0,03$), enquanto no grupo assintomático não-HAM foi observada fraca correlação entre as células Th17 total e as células Th22 ($p=0,03$).

Figura 16 – Correlações encontradas entre as frequências dos diferentes subtipos celulares.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota: (A) As células Th1 IL-22⁺ apresentaram correlação positiva moderada com as células Th17/Th1, no grupo HAM/TSP. (B) No grupo assintomático não-HAM só se observou uma fraca correlação entre as células Th17 total e as células Th22.

* Diferença estatisticamente significativa. Correlação de Spearman. Em A, a correlação foi encontrada utilizando uma cauda.

6.2 HAM/TSP x Outras Manifestações Clínicas x Assintomáticos 2

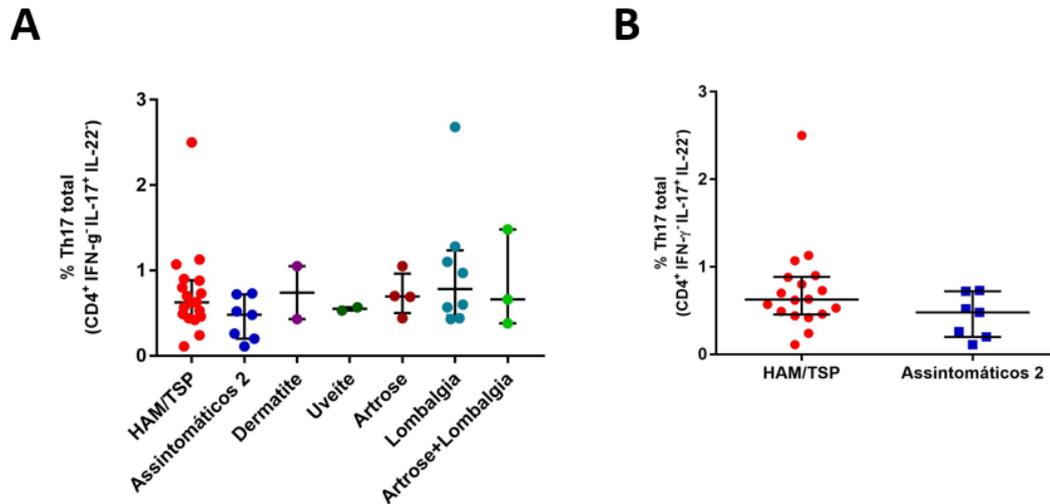
Em uma segunda análise, como explicitado antes, o grupo anteriormente classificado unicamente como assintomático foi estratificado em seis grupos. As análises a seguir apresentam os resultados dessa estratificação.

6.2.1 Frequências de células Th17 IL-22⁺ estão elevadas em indivíduos com lombalgia

Os assintomáticos não-HAM, apresentados nos gráficos como “assintomáticos” foram estratificados para se observar as frequências celulares em outras manifestações clínicas que não HAM/TSP. Com a estratificação desse grupo, os indivíduos sem nenhuma manifestação clínica foram denominados “Assintomáticos 2”.

Entretanto, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes nas frequências das células Th17 total entre os grupos observados, apesar do grupo HAM/TSP apresentar leve elevação na frequência (Figura 17).

Figura 17 – Frequência das células Th17 total após estratificação do grupo assintomático não-HAM.

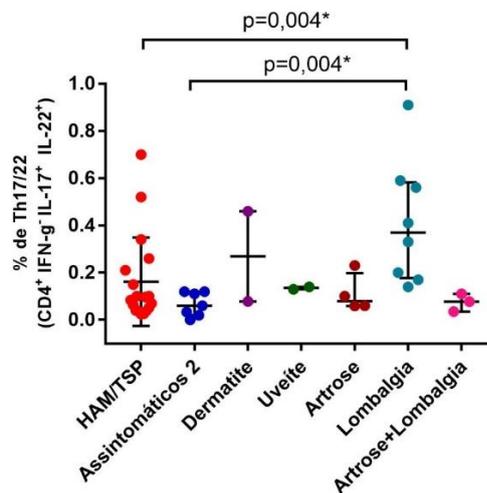


Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota: (A) O grupo HAM/TSP parece ter um leve aumento na frequência de células Th17 total, em relação ao grupo assintomático 2, quando utilizado o teste de comparação múltipla; (B) A análise com o teste de Mann-Whitney mostrou não haver diferença entre HAM/TSP e assintomáticos 2. Barras representam mediana com o intervalo interquartil.

Porém, quando analisamos as células Th17 produtoras de IL-22, pudemos observar que indivíduos com lombalgia possuem maiores frequências desse subtipo celular em relação aos indivíduos HAM/TSP ($p=0,004$) e também aos assintomáticos ($p=0,004$) (Figura 18).

Figura 18 – Frequência das células Th17/22 após estratificação do grupo assintomático não-HAM.

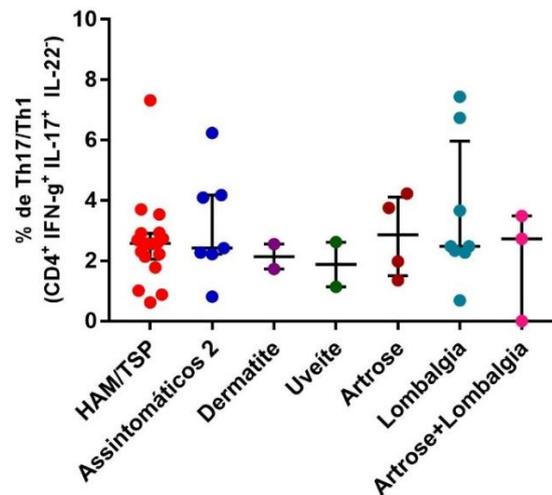


Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota: Barras representam mediana com o intervalo interquartil.

Como pode ser observado na Figura 19, para as células Th17/Th1 circulantes, as frequências também não diferiram entre os grupos, se apresentando similares em todos eles.

Figura 19 – Frequência das células Th17/Th1 após estratificação do grupo assintomático não-HAM.



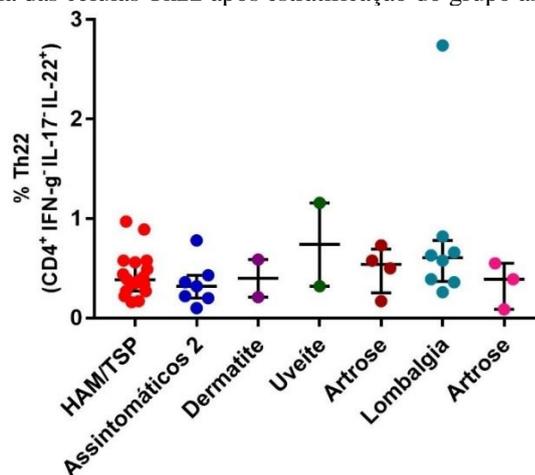
Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota: Barras representam mediana com o intervalo interquartil.

6.2.2 Frequência de células Th22 não difere entre HAM/TSP, assintomáticos 2 ou outras manifestações clínicas

Da mesma maneira, não conseguimos encontrar diferenças estatisticamente significantes nas frequências das células Th22 em relação as diferentes manifestações clínicas (Figura 20).

Figura 20 – Frequência das células Th22 após estratificação do grupo assintomático não-HAM.



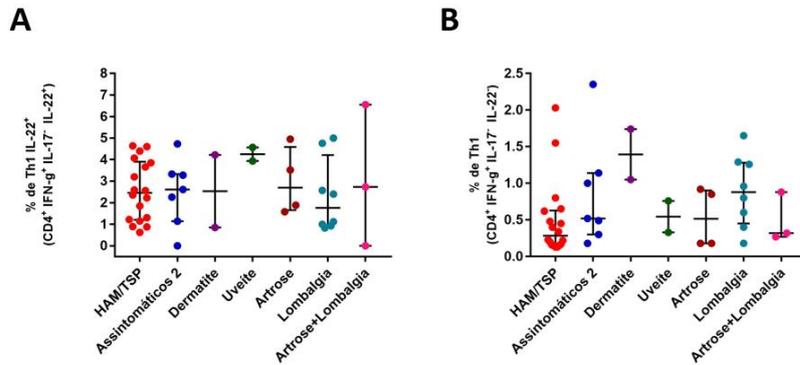
Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota: Barras representam mediana com o intervalo interquartil.

6.2.3 Frequências de células Th1 IL-22⁺ e Th1 não diferiram entre os grupos com diferentes manifestações clínicas

A ausência de associação entre as frequências celulares e os grupos estudados se manteve para as subpopulações de Th1 produtoras de IL-22, bem como para as células T CD4⁺ IFN- γ ⁺ (Figura 21).

Figura 21 – Frequência das células Th1 IL-22⁺ após estratificação do grupo assintomático não-HAM.



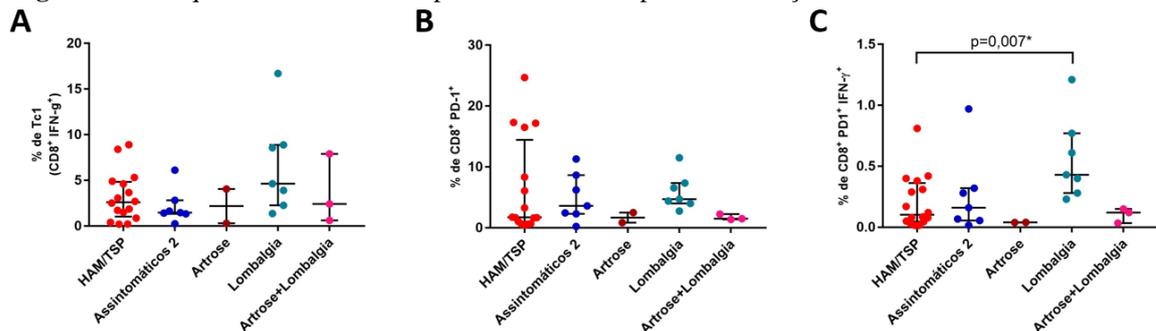
Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota: (A) As células Th1 IL-22⁺ apresentaram frequências similares nos grupos estudados após estratificação do grupo assintomático não-HAM; (B) As células Th1 também não apresentaram frequências diferentes. Barras representam mediana com o intervalo interquartil.

6.2.4 Indivíduos com lombalgia apresentam alta frequência de células T CD8⁺PD-1⁺IFN- γ ⁺

Os grupos “Dermatite” e “Uveíte” não puderam ser incluídos nessa análise. Apesar de as frequências das células Tc1 e CD8⁺ PD-1⁺ permanecerem similares entre os grupos (Figura 22), encontramos maiores frequências de células T CD8⁺ coexpressando PD-1⁺ e IFN- γ ⁺ no grupo “Lombalgia”, quando comparados com HAM/TSP (p=0,007).

Figura 22 – Frequência das células do painel de T CD8⁺ após estratificação dos assintomáticos não-HAM.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota: (A) As células Tc1 apresentaram frequências similares; (B) As células T CD8⁺ PD-1⁺ Th1 também não apresentaram frequências diferentes; (C) O grupo “Lombalgia” apresentou maiores frequências de CD8⁺ PD-1⁺ IFN- γ ⁺ em relação aos indivíduos HAM/TSP. Barras representam mediana com o intervalo interquartil.

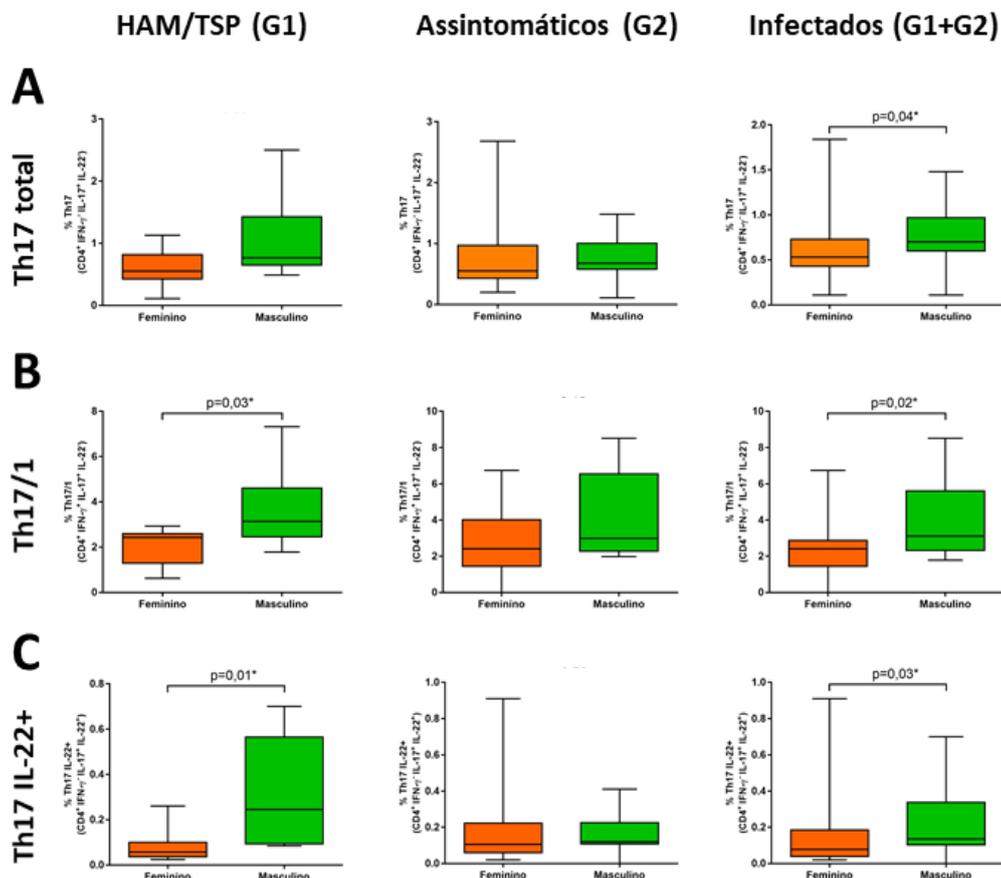
6.3 Frequências Celulares x Gênero

Com o propósito de avaliar se há dimorfismo sexual distinto no estado de ativação do sistema imunológico em indivíduos infectados pelo HTLV, avaliamos se existe diferença entre as frequências celulares e o gênero.

Para as células Th17 total, observamos que quando agrupamos os indivíduos infectados pelo HTLV (n=48), independentemente de ter HAM/TSP (n=18) ou ser assintomático não-HAM (n=30), indivíduos do gênero masculino (n=16) possuem maior frequência dessa subpopulação (p=0,04) em relação as mulheres (n=32), como está apresentado na Figura 23.

Enquanto isso, para as células Th17/Th1 foi observado que, tanto no grupo HAM/TSP, quanto no grupo dos infectados pelo vírus, as frequências das células Th17 produtoras de IFN- γ se apresentou elevada nos homens (p=0,03 e p=0,02, respectivamente). O mesmo se repetiu quando avaliamos as células Th17 produtoras de IL-22 (p=0,01 e p=0,03, respectivamente).

Figura 23 – Frequências celulares de Th17 de acordo com o gênero

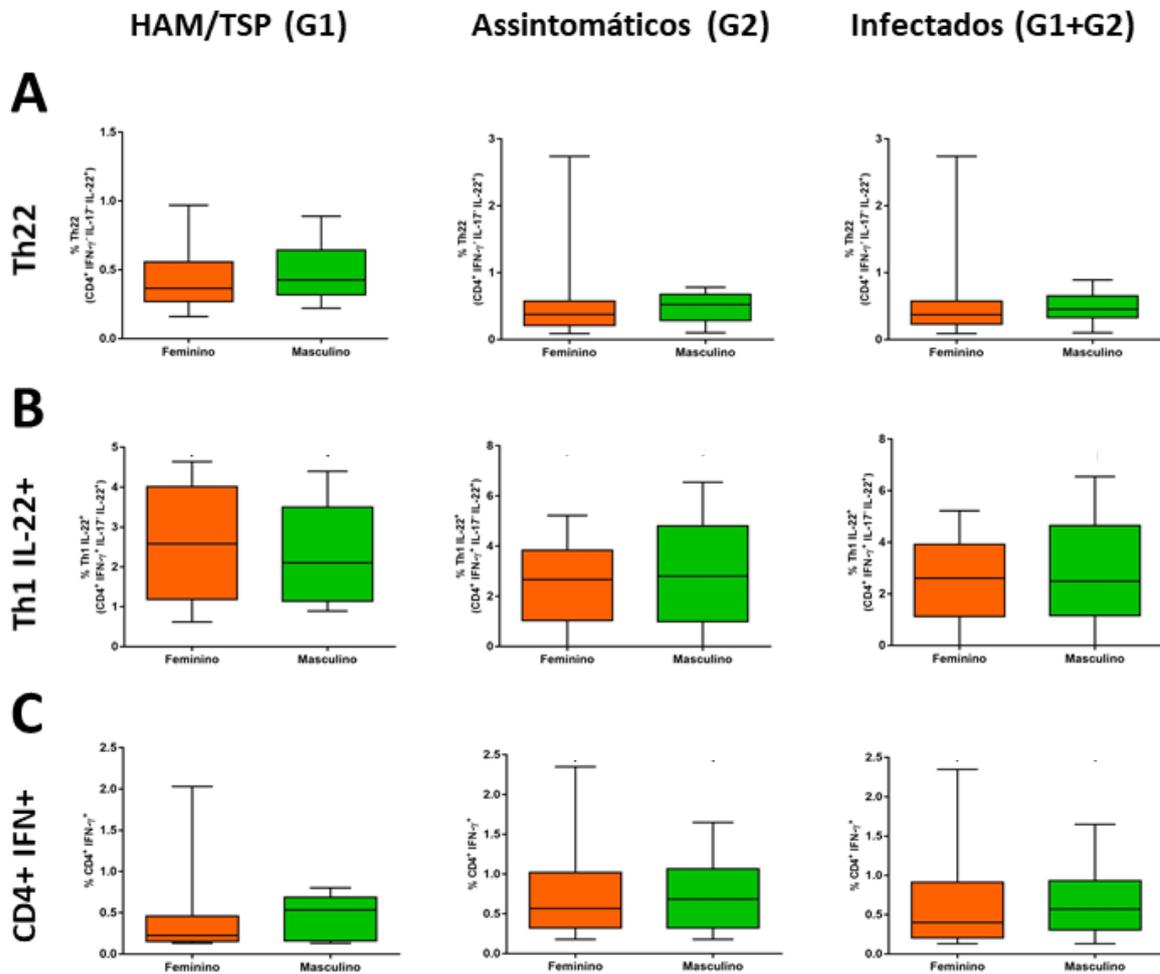


Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota: (A) Homens infectados pelo HTLV (n=16) apresentaram maior frequência de Th17 total em relação a mulheres infectadas (n=32); (B e C) Homens HAM/TSP (n=6) possuem maior frequência de Th17 produtoras de IFN- γ e IL-22, o que não se repete para homens assintomáticos (n=10).

Entretanto, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes nas frequências celulares de Th22, Th1 produtoras de IL-22 e CD4⁺ IFN- γ ⁺ entre os gêneros masculino e feminino em nenhum grupo estudado (Figura 24).

Figura 24 – Frequências das células Th22, Th1 produtoras de IL-22 e CD4⁺ IFN- γ ⁺ de acordo com o gênero.

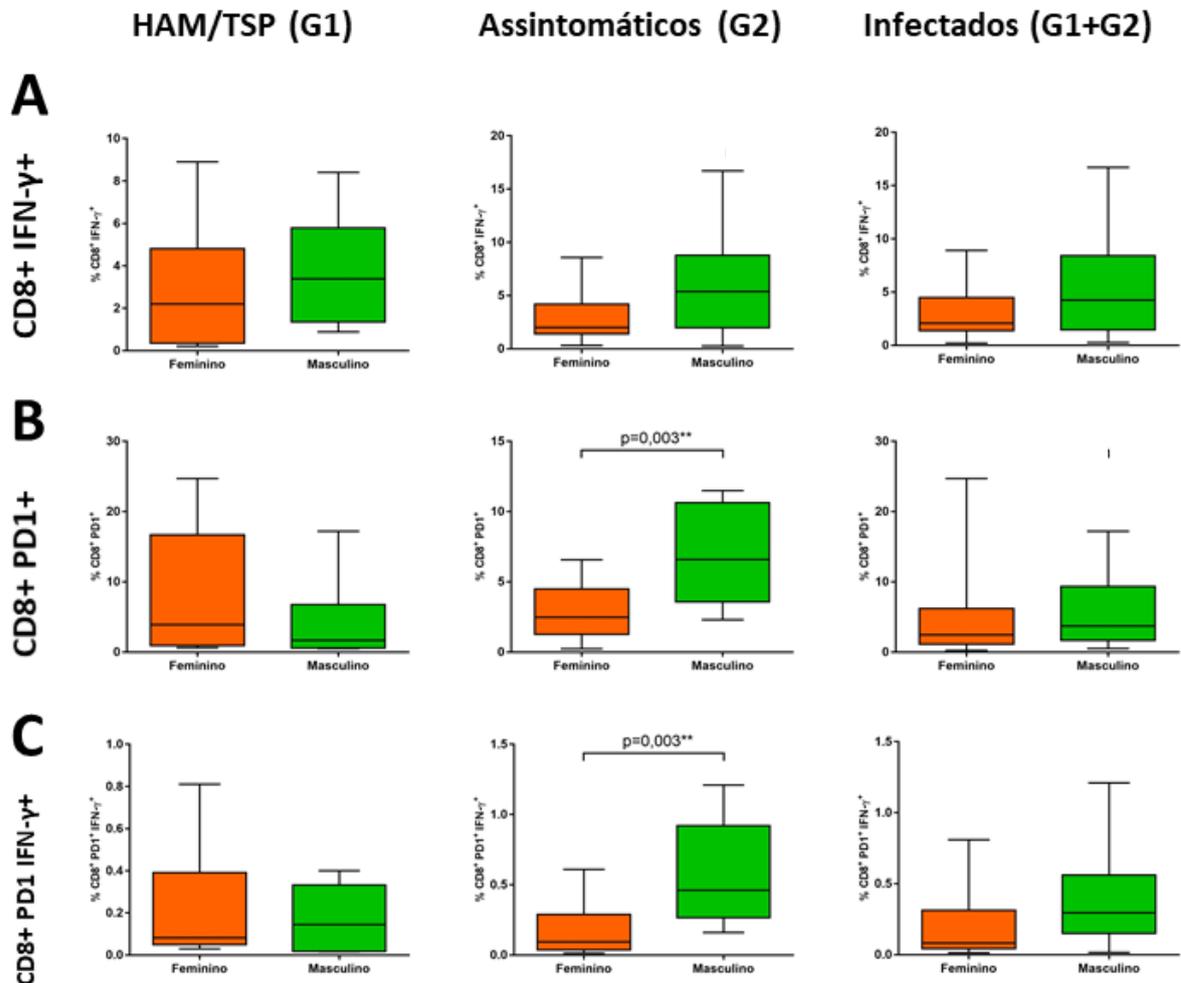


Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota: (A) As frequências das células Th22 se apresentaram similares entre mulheres e homens, independente do desfecho clínico ou da infecção pelo HTLV. (B) As frequências de células Th1 produtoras de IL-22 também não diferiram quando os gêneros foram estratificados. (C) Células T CD4⁺ IFN- γ ⁺ apresentaram frequências similares entre as mulheres e homens do estudo.

Na análise das células T CD8 produtoras de IFN- γ ⁺ não foi possível encontrar diferenças significativas entre os gêneros masculino e feminino em nenhum grupo estudado (Figura 25). No entanto, observamos que a frequência de células T CD8 que expressam PD-1 é mais elevada em homens do grupo assintomático ($p=0,003$), em relação ao grupo feminino. Resultado similar se repetiu para as células T CD8 que coexpressaram PD-1 e IFN- γ ⁺, que apresentaram maior frequência em homens assintomáticos ($p=0,003$).

Figura 25 – Frequências celulares das células T CD8⁺ de acordo com o gênero.



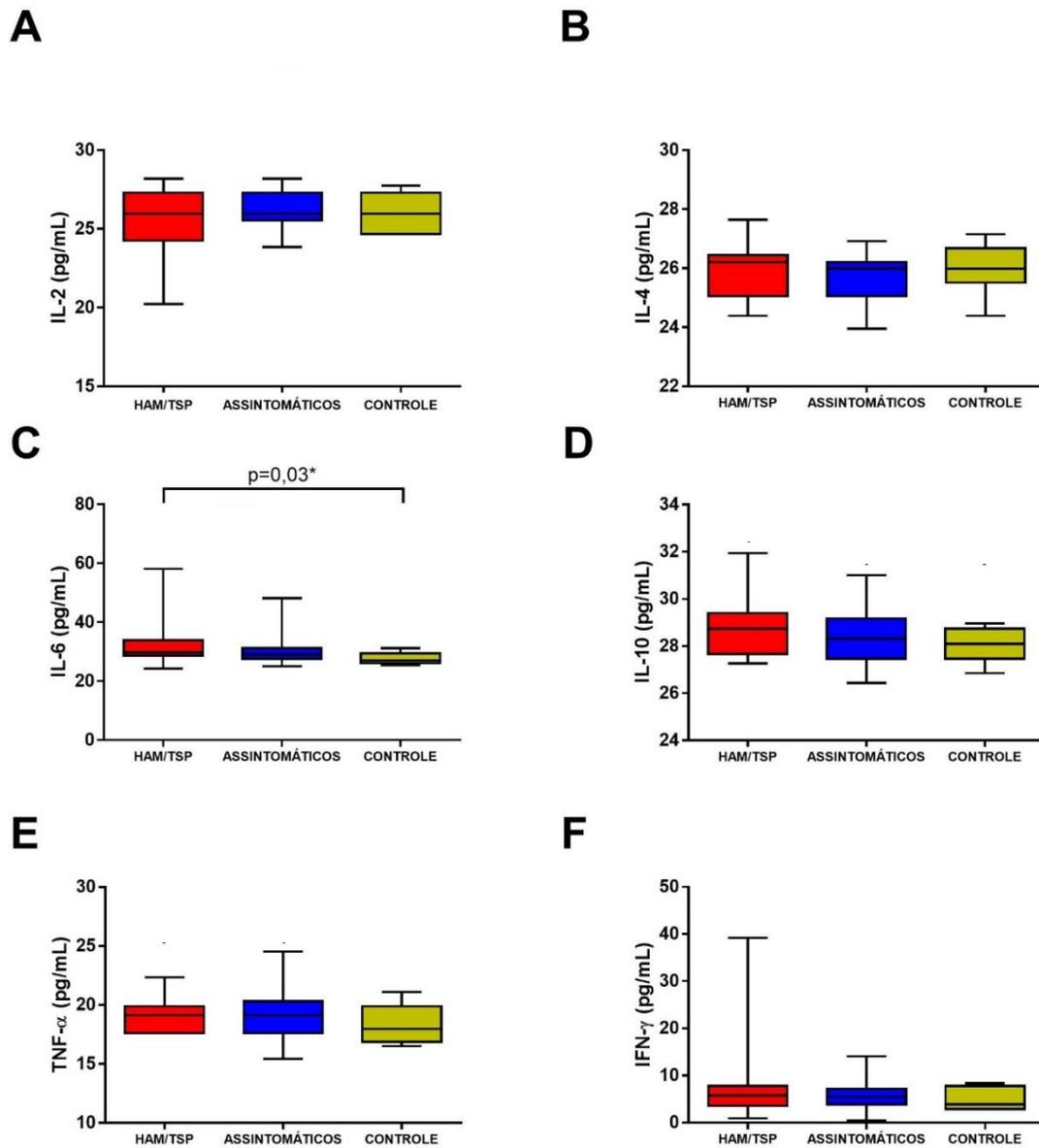
Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota: (A) A frequência das células T CD8 produtoras de IFN- γ foi similar entre indivíduos do gênero feminino e masculino. (B e C) A frequência das células T CD8 que expressam PD-1 ou coexpressam PD-1 e IFN- γ foi maior no grupo masculino assintomático, em relação ao feminino.

6.4 Quantificação de Citocinas e Quimiocinas

As citocinas foram dosadas no plasma de 15 indivíduos HAM/TSP, 31 indivíduos assintomáticos e sete indivíduos controle. Com exceção da IL-17, todas as citocinas foram detectadas, entretanto os níveis se apresentaram similares entre os grupos sintomático e assintomático (Figura 26). No entanto, quando os indivíduos infectados pelo HTLV foram comparados com o grupo controle, se observou que apenas a citocina IL-6 se apresentou aumentada ($p=0,03$) no grupo HAM/TSP (Figura 26C).

Figura 26 – Níveis plasmáticos das citocinas dos perfis Th1 e Th2 nos indivíduos sintomáticos, assintomáticos e controles.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota: (A) Níveis de IL-2 foram similares entre os grupos, assim como os níveis de IL-4 (B). Os níveis de IL-6 apresentaram-se elevados no grupo HAM/TSP em relação ao controle (C). Frequências de IL-10 (D), TNF- α (E) e IFN- γ (F) permaneceram similares entre os grupos.

Ademais, encontramos correlações entre citocinas nos grupos HAM/TSP e assintomáticos, como ilustra a Figura 27. No grupo HAM/TSP, IL-2 apresentou correlação positiva moderada com IFN- γ ($p=0,03$) e correlação negativa moderada com TNF- α ($p=0,02$). As citocinas IL-6 e IL-10 também apresentaram correlação positiva moderada ($p=0,02$) nesse grupo.

No grupo assintomático as citocinas apresentaram mais correlações entre si. O IFN- γ , por exemplo, se apresentou fracamente correlacionado à IL-6 ($p=0,04$), moderadamente correlacionado à IL-2 ($p=0,01$) e TNF- α ($p=0,0004$), e fortemente correlacionado à IL-10 ($<0,0001$). A citocina IL-10 também apresentou correlação fraca com IL-2 ($p=0,02$), e moderada com IL-6 ($p=0,001$) e TNF- α ($p=0,005$). Inclusive, TNF- α também apresentou correlação positiva, porém fraca, com IL-4 ($p=0,04$).

Figura 27 – Correlações entre as citocinas plasmáticas nos grupos HAM/TSP e assintomáticos.

A

HAM/TSP					
TNF- α	-0,338192				
IL-10	0,105598	-0,352515			
IL-6	0,057296	-0,157621	0,56 (0,02)		
IL-4	-0,193521	-0,000911	-0,380781	-0,348027	
IL-2	0,53 (0,03)	-0,56 (0,02)	0,119137	-0,170994	-0,057606
	IFN- γ	TNF- α	IL-10	IL-6	IL-4

B

Assintomáticos					
TNF- α	0,59 (0,0004)				
IL-10	0,70 (<0,0001)	0,46 (0,007)			
IL-6	0,36 (0,04)	0,2138289	0,55 (0,001)		
IL-4	0,280614904	0,35 (0,04)	0,22696678	0,076342	
IL-2	0,43 (0,01)	0,1700363	0,39 (0,02)	0,235039	0,118182
	IFN- γ	TNF- α	IL-10	IL-6	IL-4

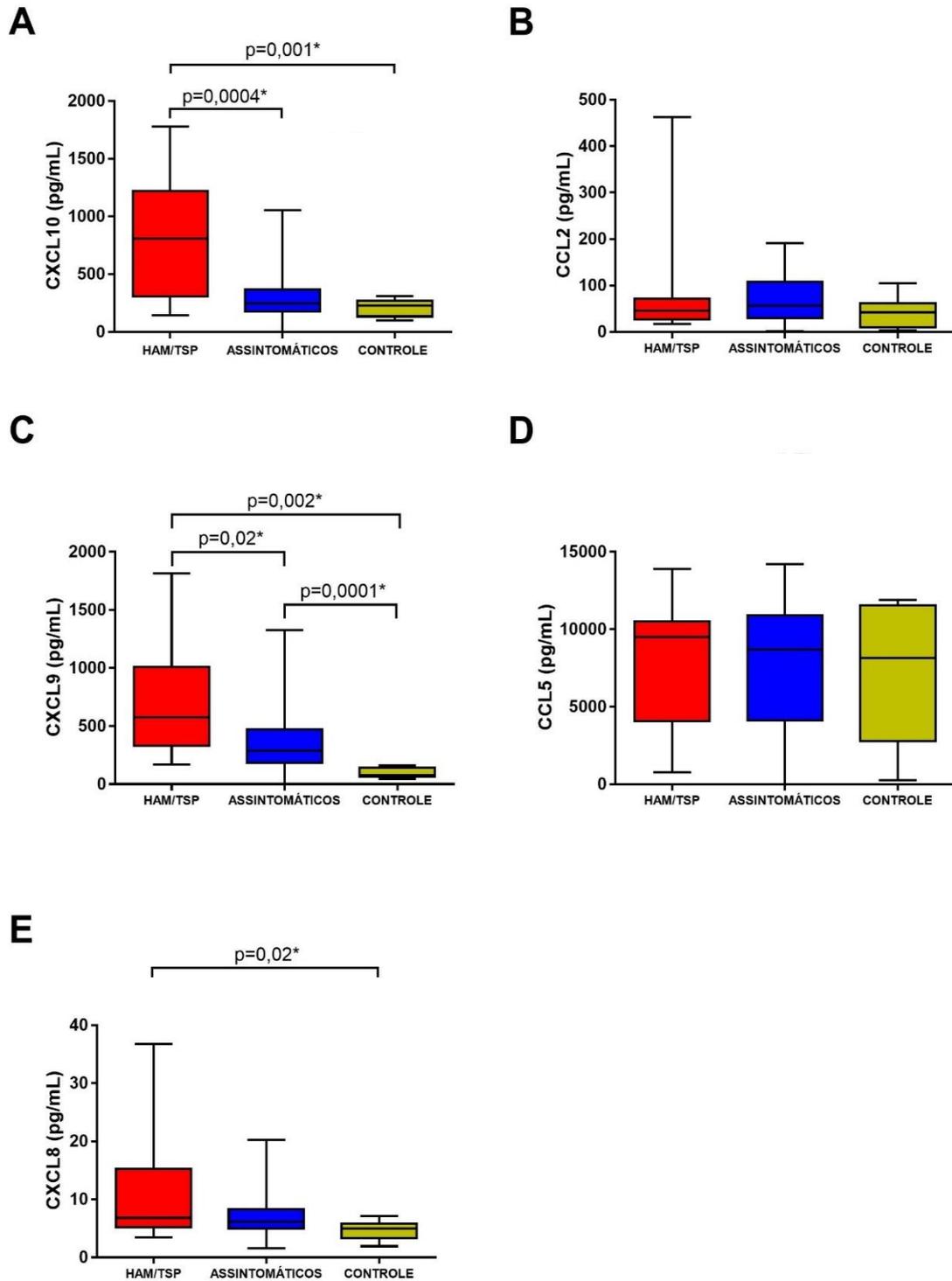
Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota: (A) Correlações das citocinas no grupo HAM/TSP. (B) Correlações entre as citocinas no grupo assintomático. As correlações foram calculadas utilizando a correlação de Spearman. O índice “r” está apresentado em cada retângulo. Estão coloridos apenas as correlações significantes, com o p entre parênteses e a cor indicando a força da correlação (Vermelho= correlação forte; Laranja= correlação moderada; Amarelo= correlação fraca).

As quimiocinas, por sua vez, foram quantificadas no plasma de 15 indivíduos HAM/TSP, 34 portadores assintomáticos e nove indivíduos controle. Observamos que os níveis plasmáticos das quimiocinas CXCL10 e CXCL9 apresentaram-se significativamente

aumentados ($p=0,0004$ e $p=0,02$, respectivamente) nos indivíduos HAM/TSP quando comparados com os indivíduos assintomáticos (Figura 28).

Figura 28 – Níveis de quimiocinas plasmáticas detectados nos grupos estudados.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota: (A) Indivíduos HAM/TSP possuem maiores níveis de CXCL10 e CXCL9 (B) em relação aos assintomáticos e controles. (C) CXCL9 apresentou diferenças estatísticas em todos os grupos. (D) As quantidades de CCL5 não diferiram entre os grupos. (E) CXCL8 apresentou-se mais elevado no grupo HAM/TSP em relação ao controle.

Do mesmo modo, essas quimiocinas também se apresentaram aumentadas quando os indivíduos infectados, separados de acordo com a presença ou ausência de HAM/TSP, foram comparados com indivíduos sem infecção ($p=0,001$ e $p=0,002$, respectivamente).

A contraponto, os níveis de CCL2 e CCL5 não diferiram entre os grupos estudados, enquanto CXCL8 apresentou-se diferencialmente mais elevado no grupo HAM/TSP em relação ao controle ($p=0,02$). Também foi observado uma possível significância nos níveis dessa quimiocina quando comparamos os grupos assintomático e sem infecção, apresentando valor p limítrofe de 0,05.

Nas correlações entre as quimiocinas (Figura 29), encontramos que apenas CXCL9 foi fortemente correlacionada com CXCL10 no grupo HAM/TSP ($<0,0001$) e no grupo assintomático ($p=0,0009$). Porém, CXCL8 apresentou correlação positiva moderada com CXCL10 ($p=0,007$), CCL2 ($p=0,01$) e CXCL9 ($p=0,01$) no grupo assintomático.

Figura 29 – Correlações entre os níveis de quimiocinas no plasma dos grupos HAM/TSP e assintomáticos.

A

HAM/TSP

CCL2	0,11081327			
CXCL9	0,77 (0,0009)	0,230563		
CCL5	-0,323793	0,408237	-0,062612	
CXCL8	0,3467383	0,13059	0,466488	0,229185
	CXCL10	CCL2	CXCL9	CCL5

B

Assintomáticos

CCL2	0,1311989			
CXCL9	0,66 (<0,0001)	0,1860003		
CCL5	0,125382276	0,1451724	-0,0154446	
CXCL8	0,45 (0,006)	0,43 (0,01)	0,42 (0,01)	0,168516
	CXCL10	CCL2	CXCL9	CCL5

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nota: (A) Apenas CXCL9 e CXCL10 apresentaram correlação significativa no grupo HAM/TSP. (B) No grupo assintomático, CXCL9 também foi fortemente correlacionada a CXCL10. CXCL8 também apresentou correlação positiva com CXCL10, CCL2 e CXCL9. Correlações entre as citocinas no grupo assintomático. As correlações foram calculadas utilizando a correlação de Spearman. O índice “r” está apresentado em cada retângulo. Estão coloridos apenas as correlações significantes, com o p entre parênteses e a cor indicando a força da correlação (Vermelho= correlação forte; Laranja= correlação moderada).

7 DISCUSSÃO

O HTLV-1 é o agente etiológico da HAM/TSP, doença neurodegenerativa que afeta menos de 5% dos infectados. No entanto, essa síndrome desmielinizante causa condições inflamatórias progressivas que aumentam a morbidade e mortalidade dos indivíduos afetados. Apesar de não ser agudo como o HIV, o HTLV-1 é capaz de causar imunossupressão, deixando o indivíduo suscetível a infecções oportunistas, o que o coloca como mais um desafio para a saúde pública (MARTIN, TAGAYA E GALLO, 2018).

O número “relativamente pequeno” de indivíduos com HAM/TSP pode estar relacionado a determinantes de risco, como fatores virais e carga proviral, além de fatores do hospedeiro, como aspectos genéticos e resposta imunológica (SANTOS, MUNIZ E CARVALHO, 2009).

Nossa pesquisa é a primeira envolvendo HTLV-1 a apresentar as subpopulações estudadas bem caracterizadas fenotipicamente, o que possibilita o melhor entendimento de cada alvo na imunopatogênese da infecção pelo vírus.

A resposta imune de perfil Th1 é amplamente descrita nas pesquisas envolvendo o HTLV-1, que atribuem a inflamação nos indivíduos infectados à elevada produção de citocinas desse perfil, como IFN- γ e TNF- α . Porém, estudos que abordem o perfil de células Th17, subpopulação capaz de produzir IL-17, IL-22 e IFN- γ ainda são escassos e controversos. Essas células podem ser classificadas imunofenotipicamente como Th17 total (CD4⁺ IFN- γ ⁻ IL-17⁺ IL-22⁻), Th17/IL-22⁺ (CD4⁺ IFN- γ ⁻ IL-17⁺ IL-22⁺) e Th17/Th1 (CD4⁺ IFN- γ ⁺ IL-17⁺ IL-22⁻) (FUTSCH *et al.*, 2018; NECO *et al.*, 2017a; ZHONG, *et al.*, 2017).

Em um dos primeiros trabalhos que tentaram relacionar a IL-17 à infecção pelo HTLV-1, Dodon e colaboradores (2004) analisaram a expressão gênica de *IL17* em células de cultura (C91PL, MT2 e HUT-102) infectadas pelo vírus e observaram que a proteína viral Tax possui capacidade de induzir a expressão do mRNA de *IL17*, uma vez que atua como transativadora desse gene nas células T ativadas.

A IL-17 desempenha função na patogênese da infecção do HIV e é capaz de promover a ruptura da barreira hematoencefálica, causando inflamação no sistema nervoso central (FAVRE, *et al.*, 2010; KEBIR, *et al.*, 2007). Em nosso estudo não encontramos associação entre as frequências de células Th17 total com o desenvolvimento da HAM/TSP ou outra manifestação clínica, quando o grupo assintomático foi estratificado. Esse resultado corrobora com o que foi visto por Leal e colaboradores (2013), que relataram um número de células secretoras de IL-17 significativamente menor em indivíduos com a mielopatia quando

comparados com portadores não infectados, e níveis similares entre os portadores assintomáticos e sintomáticos, o que parece estar relacionado a uma função protetora.

É possível que as frequências similares em nosso estudo indiquem que essa subpopulação de célula T pode estar relacionada a mecanismos antivirais, ao invés de promover a inflamação característica de manifestações relacionadas ao HTLV-1.

Embora as células Th17 desempenhem funções inflamatórias em doenças autoimunes muito similares à HAM/TSP, como é o caso da esclerose múltipla, no caso da infecção pelo HTLV-1 pode estar havendo um desbalanço da resposta imunológica. Assim, células T CD4⁺ e células com fenótipo supressivo, por exemplo CD39⁺ CD25⁺, que geralmente estão aumentadas em indivíduos infectados pelo vírus, podem suprimir as células Th17, reduzindo suas frequências (FARD *et al.*, 2016; LEAL *et al.*, 2013).

Recentemente, um estudo mostrou que a produção de IL-17 em indivíduos HTLV-1⁺ co-infectados com *Mycobacterium tuberculosis* foi menor em relação a indivíduos que só apresentavam tuberculose, após estímulo com PPD (Proteína Purificada Derivada do *M. tuberculosis*). Diferentemente, indivíduos saudáveis estimulados com a mesma proteína ou com PHA produziram níveis mais elevados da citocina, sugerindo que a infecção pelo HTLV-1 interfere na resposta Th17 (CARVALHO *et al.*, 2018). Entretanto, alguns estudos já encontraram alta expressão de IL-17 em infectados pelo HTLV-1 que apresentavam periodontite e bexiga hiperativa, demonstrando que a infecção pelo vírus pode levar ao aumento dos níveis dessa citocina (GARLET *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2012).

As células Th17 também são capazes de produzir outras citocinas, como anteriormente citado. Segundo Yamano *et al.* (2009), células T CD4⁺ CD25⁺ CCR4⁺ em indivíduos com mielopatia associada ao HTLV-1 apresentam maiores níveis de IFN- γ em relação a indivíduos saudáveis, enquanto os níveis de IL-17 estão diminuídos. Enquanto o estudo anterior analisa as citocinas de maneira isolada, pesquisas vem sendo realizadas apresentando células que co-expressam citocinas, como IL-17 e IL-22 (Células Th17 IL-22⁺) ou IFN- γ e IL-17 (Células Th17/Th1).

Apesar de não termos encontrado associações entre as frequências das subpopulações Th17 IL-22⁺ ou Th17/Th1 entre HAM/TSP e assintomáticos não-HAM, a literatura tem apresentado a influência dessas subpopulações em doenças inflamatórias e com características semelhantes à mielopatia associada ao HTLV-1. O estudo de Zhong e colaboradores (2017), por exemplo, nos apresenta frequências elevadas de células Th17 produtoras de IL-22 em indivíduos com artrite reumatoide.

Quando estratificamos o grupo assintomático não-HAM, interessante verificamos que indivíduos com lombalgia possuem significativamente mais células Th17 produtoras de IL-22 do que os assintomáticos 2 (sem nenhuma manifestação clínica) e os HAM/TSP. Estudos envolvendo patologias do disco intervertebral, caracterizadas por também causar dor lombar, apresentam concentração de células Th17 e IL-17 elevada, bem como de IL-23, cuja sinalização está relacionada à IL-22 (JIANG *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2014). Até então, não existem estudos que abordem especificamente células Th17 IL-22⁺ nessas patologias.

Nosso resultado sugere que as células Th17/22 possuem ação local, através das citocinas IL-17 e IL-22 que podem atuar sinergicamente na infecção pelo HTLV-1. Dessa maneira, individualmente, essas citocinas não possuem papel no desfecho HAM/TSP, quando a doença já está instalada, ou em indivíduos que permanecem assintomáticos. Porém, a nível lombar, por exemplo, essas células e os mediadores produzidos por elas parecem causar inflamação local.

Ainda assim, para outras infecções virais, como a do enterovírus 71, causador da doença mão-pé-boca em crianças, níveis elevados de Th17 IL-22⁺ já foram descritos (CUI *et al.*, 2017). A contraponto, enquanto a IL-17 é capaz de causar uma resposta inflamatória tecidual em doenças autoimunes, a IL-22 já foi associada à proteção e regeneração (EYERICH *et al.*, 2010).

Do mesmo modo, segundo Bazzazi e colaboradores (2018), as frequências de células Th17/Th1 são maiores em novos casos de artrite reumatoide, em relação ao grupo controle, mas não em indivíduos com artrite estabelecida. Algumas pesquisas nessa doença indicam que o IFN- γ pode inibir a diferenciação das células Th17 e, durante o processo de instalação da patologia, as células Th17 gradualmente se convertem em Th1 (KIRKHAM *et al.*, 2006).

Em pacientes que falharam em estabelecer uma resposta Th1 ou atividade citotóxica eficiente, por exemplo, o dano tecidual na mielopatia associada ao HTLV-1 pode estar relacionado à produção local de IFN- γ por células que tiveram seu fenótipo alterado para Th17/Th1 (SARKIS *et al.*, 2013).

Em nosso estudo, as frequências das células Th22 não diferiram entre os grupos, o que sugere que essa subpopulação não está envolvida nos desfechos clínicos relacionados ao HTLV-1. Segundo Wolk *et al.* (2004), a IL-22 atua como mediador de células T que potencializa a imunidade inata e inespecífica dos tecidos, não possuindo papel na comunicação entre as células do sistema imune. Ademais, a IL-22, assim como a IL-17, aumenta a proteção contra patógenos microbiológicos em modelos experimentais, bem como contra infecções como *Leishmania donovani* em humanos. Em estudos com HTLV-1, já se observou que níveis

de mRNA de IL-22 estão elevados em indivíduos HAM/TSP (PITTA *et al.*, 2009; SARKIS *et al.*, 2013).

Alguns trabalhos, porém, relatam aumento na frequência de células Th22 circulantes em doenças como linfoma não-Hodgkin de células B, artrite reumatoide e leucemia linfóide aguda de células T, além de níveis elevados de IL-22 terem sido relatados na doença de Behçet, que já foi associada ao HTLV-1 (LU *et al.*, 2016; SUGITA *et al.*, 2013; TIAN *et al.*, 2013; ZHONG *et al.*, 2017). Em indivíduos infectados pelo HIV, a IL-22 foi associada à resistência contra a infecção pelo HIV em um estudo envolvendo indivíduos que não soroconverteram apesar de contato com o vírus em diferentes momentos (GORENEC *et al.*, 2016; THIBODEAU *et al.*, 2017).

A resposta Th1, por sua vez, já é bem descrita e está associada à promoção da inflamação nos indivíduos HAM/TSP, nos quais predominam citocinas de perfil Th1, como IFN- γ e TNF- α , em contraste com a redução de citocinas Th2, como IL-4 e IL-10 (AHUJA *et al.*, 2007; MORGAN, 2011; YAMANO *et al.*, 2009).

Atualmente se sabe que células Th1 produzem outras citocinas, como IL-22, sendo uma das principais fontes dela, e frequências elevadas dessa subpopulação já foram relatadas em indivíduos com artrite reumatoide (ZHONG *et al.*, 2017). Entretanto, em nosso estudo não conseguimos verificar diferenças entre as frequências de células T CD4⁺ IFN- γ ⁺ IL-17⁻ IL-22⁺, apesar de parecer que a IL-22 tenha propriedade sinérgica junto à IL-17, principalmente quando encontramos correlação entre as células Th1 IL-22⁺ e Th17/Th1 no grupo HAM/TSP e entre Th17 total e Th22 no grupo assintomático. Isso demonstra que essas citocinas estão presentes juntas, produzidas por subtipos celulares diferentes, nos grupos sintomáticos e assintomáticos.

Assim, no grupo HAM/TSP, embora o IFN- γ ⁺ continue sendo produzido, levando à inflamação, o fenótipo destas células pode mudar, fazendo com que elas passem a produzir IL-17, que é pro-inflamatória, e IL-22, que pode possuir funções pro ou anti-inflamatórias, juntas. Portanto, o desbalanço entre esses mediadores pode levar a diferentes desfechos.

Em nosso estudo, apesar de não encontrarmos diferenças nas frequências de células Th1 entre os grupos estudados, ressaltamos a boa caracterização fenotípica realizada, uma vez que a maioria dos estudos que relatam resposta Th1 aumentada no grupo HAM/TSP apenas classifica essa população com base apenas no fenótipo CD4⁺ IFN- γ ⁺, utilizando apenas dois marcadores. Ainda assim, o IFN- γ é uma citocina tradicionalmente associada à resposta Th1 e funções pro-inflamatórias, além de possuir propriedades paradoxais que fazem com que atue como reguladora da resposta imune. Inclusive, células T regulatórias produtoras de IFN- γ ⁺

possuem função imunomoduladora na prevenção de doenças como enxerto x hospedeiro (KOENECKE *et al.*, 2012; ZHANG, 2007).

Enquanto isso, a ausência de associação entre as populações de células Tc1 (CD8⁺ IFN- γ ⁺) entre o grupo HAM/TSP e assintomático pode ser explicada pelo fato do IFN- γ produzido pelas células T CD8 atuar diretamente na diferenciação de células T CD4⁺ de perfil Th1, que produzirão mais IFN- γ , desempenhando importante função na eliminação dos vírus (DAS; SHERIDAN; JANEWAY, 2001). Logo, as células T CD8⁺ IFN- γ ⁺ poderiam estar ajudando a controlar a infecção pelo HTLV-1.

Quando avaliamos a expressão de PD-1 ou sua co-expressão com IFN- γ nas células T CD8, encontramos diferenças estatísticas apenas quando o grupo assintomático foi estratificado, no qual os indivíduos com lombalgia apresentaram maiores frequências de células T CD8⁺ PD-1⁺ IFN- γ ⁺ em relação aos indivíduos HAM/TSP. O estudo de Ndhlovu *et al.* (2011), que entre seus marcadores possuía PD-1, também não encontrou diferença na expressão de PD-1 nas células T CD8⁺ de indivíduos HAM/TSP, assintomáticos e controles.

No entanto, o padrão de expressão de PD-1 é mais elevado em indivíduos infectados pelo HTLV-1, bem como em células T específicas para CMV e EBV em portadores assintomáticos, comparado com indivíduos saudáveis (KOZAKO *et al.*, 2009). Segundo Ndhlovu e colaboradores (2011), a associação entre as frequências de PD-1 e Tim-3, outro marcador de exaustão, com a secreção de IFN- γ em resposta a Tax ou outros epítomos apresenta correlações diferentes. Segundo esses pesquisadores, PD-1 indica ativação precoce de células T, enquanto Tim-3 aparece mais tardiamente durante o comprometimento. Petrovas *et al.* (2006), por sua vez demonstraram que células T que expressam PD-1 possuem capacidade de secretar citocinas, respondendo a antígenos virais, apesar da expressão de PD-1 não ter efeito na produção dessas.

Muitos estudos avaliam as funções de diferentes subtipos celulares em diversas patologias. No entanto, recentemente, alguns trabalhos apresentam as frequências dessas subpopulações celulares em relação à gênero, medicação entre outros. O estudo das diferenças nas frequências celulares entre os gêneros é importante por elucidar a natureza gênero-dirigida de diversas doenças, incluindo as autoimunes, e auxiliar no desenvolvimento de tratamentos direcionados de acordo com a pessoa (DINESH; HAHN; SINGH, 2010).

Em esclerose múltipla e espondilite anquilosante, como exemplo, já se observou que níveis de IL-17 e/ou frequências das células Th17 apresentam-se aumentadas em indivíduos do gênero masculino (GHAFARI *et al.*, 2017; GRACEY *et al.*, 2016). Essas pesquisas corroboram com nosso estudo, no qual foi observado que homens infectados pelo HTLV-1

possuem frequências significativamente mais elevadas das três subpopulações de células Th17, em relação as mulheres.

A diferença encontrada nas frequências celulares de Th17 entre os gêneros pode ser relacionada ao efeito dos hormônios sexuais. Inclusive, em modelos experimentais de doenças inflamatórias, se tem indícios que a frequência dos linfócitos Th17 elevada em machos se deve a efeitos inibitórios do estrógeno na diferenciação desse subtipo celular (LI; YUE; XIONG, 2013). Porém, em outros estudos com murinos, fêmeas com infecção na bexiga expressaram maiores níveis de IL-17 (SCHARFF *et al.*, 2018).

Poucos são os estudos que abordam a participação do gênero na resposta imunológica das patologias. Nossos achados incluem que as frequências das células Th22 não diferiram entre os gêneros de indivíduos infectados pelo HTLV-1, ratificando estudos em outras doenças, como linfoma não-Hodgkin de células B (LU, *et al.*, 2016; RØ *et al.*, 2017).

Nossas análises mostraram que, no grupo assintomático, a frequência de células T CD8 PD-1⁺ ou PD-1⁺ IFN- γ ⁺ esteve significativamente aumentada no gênero masculino. Entretanto, a expressão de PD-1 pode sofrer ação do estrógeno. Em uma pesquisa envolvendo murinos ERKO, *knockout* para o receptor de estrógeno alfa (*Esr1*), apresentaram diminuição na expressão de PD-1, porém, em células FoxP3⁺ (POLANCZYK *et al.*, 2007). Outro estudo sobre o tema, no entanto, não encontrou relação entre a expressão de PD-1 com carcinoma hepatocelular associado ao HBV (ZENG *et al.*, 2011).

Ao avaliar os níveis de citocinas plasmáticas, fomos surpreendidos por não encontrarmos diferenças entre os níveis de IFN- γ e TNF- α produzidos pelos indivíduos sintomáticos e assintomáticos não-HAM, pois em trabalhos anteriores do nosso grupo, essas citocinas apresentaram níveis, embora séricos, elevados nos indivíduos HAM/TSP (NECO *et al.*, 2017a, 2017b).

Entretanto, outros trabalhos também relataram não encontrar diferenças nos níveis plasmáticos de diversas citocinas que estudamos, como IFN- γ e IL-2 (VALLINOTO *et al.*, 2015; STARLING *et al.*, 2013). Assim como Rosa e colaboradores (2018) que, embora não tenham encontrado diferença nos níveis plasmáticos de todas as citocinas estudadas em nosso estudo, conseguiram detectar níveis elevados de IFN- γ e TNF- α no CSF.

A interação vírus-hospedeiro também figura como um dos fatores que provocam mudanças na resposta imunológica, levando à patogênese da mielopatia, como aumento da produção de citocinas pro-inflamatórias e proliferação espontânea de células T CD4⁺ (FUZZI *et al.*, 2014).

Apesar da ausência de associação entre os níveis de citocinas plasmáticas circulantes nos grupos HAM/TSP e assintomático, encontramos correlações interessantes. No grupo HAM/TSP, IL-2 apresentou moderadas correlações positivas e negativas com IFN- γ e TNF- α , respectivamente. O processo inflamatório crônico visto nesses indivíduos, segundo alguns estudos, é mantido pela resposta de células T CD4⁺, através da constante resposta inflamatória pela excessiva produção de IFN- γ , TNF- α e IL-2 (HANON *et al.*, 2001; MUNIZ *et al.*, 2006).

Nesse ínterim, citocinas de perfil Th2, como IL-4 e IL-10 estão reduzidas em indivíduos HTLV-1⁺ e, inclusive, é por esse motivo que pessoas coinfectadas pelo HTLV-1 e *Strongyloides stercoralis* são susceptíveis a formas mais graves de estrogiloidíase (AHUJA *et al.*, 2007; MORGAN *et al.*, 2011; PORTO *et al.*, 2002; YAMANO *et al.*, 2009). Além disso, a IL-10, que possui funções imunomodulatórias na infecção pelo vírus, pode atuar como fator de diferenciação para células T citotóxicas HTLV-1-específicas (SHIRDEL *et al.*, 2013).

Os níveis de IL-6 na nossa amostra, só diferiram quando o grupo HAM/TSP foi comparado com indivíduos controle. Apesar disso, várias pesquisas demonstraram a elevada produção de IFN- γ , TNF- α e IL-6 no sangue periférico de indivíduos com a mielopatia, quando comparados ao grupo assintomático. A IL-6 é considerada uma das principais citocinas indicadoras de grau de lesão tecidual. Ademais, após administração de uma vacina anti-HTLV-1 baseada em células dendríticas para tratar camundongos infectados, foi observado aumento nos níveis de IL-6 séricos nos indivíduos da amostra (GADELHA *et al.*, 2008; LAIRMORE; HAINES; ANUPAN, 2012).

As frequências relativamente maiores de IL-6 no grupo HAM/TSP e assintomáticos não-HAM, em relação aos controles, pode explicar a correlação encontrada entre as células Th17 total e Th22, já que essas subpopulações têm a IL-6 como participante no processo de diferenciação. Além disso, a correlação encontrada entre IL-6 e IL-10 nos indivíduos com mielopatia e assintomático, esse fato pode representar o esforço do sistema imunológico em restaurar a homeostase do organismo (GADELHA *et al.*, 2008; LAIRMORE; HAINES; ANUPAN, 2012; MORGAN, 2011; SAGAR *et al.*, 2014; SAPAN *et al.*, 2016).

O fato de não termos detectado níveis plasmáticos de IL-17 em nosso estudo pode se dar ao fato dessa citocina ser liberada apenas em pequenas quantidades, atingindo seu pico mais de 96 horas depois, e atuando apenas localmente, o que dificultaria sua detecção em determinadas amostras, como o plasma. Porém, a detecção dessa citocina por citometria de fluxo, amplamente discutida anteriormente, evidencia a importância do seu estudo em doenças inflamatórias como as causadas pelo HTLV-1.

A presença da correlação do IFN- γ com IL-6, IL-2, IL-10 e TNF- α no grupo assintomático pode evidenciar a desregulação do sistema imunológico, uma vez que o IFN- γ apresenta atividade antiviral e imunomoduladora capaz de inibir a proliferação de células secretoras de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13. Um estudo com outro retrovírus, o HIV, apresentou correlações entre TNF- α e outras citocinas como IL-4 e IL-10, assim como nosso estudo (MEIRA *et al.*, 2004; VARELLA; FORTE, 2001).

Além das citocinas avaliadas, níveis de quimiocinas como CXCL8 (IL-8), CXCL9 e CXCL10 tem se apresentado elevados no sangue e/ou CSF de pacientes com doenças neurológicas como HAM/TSP ou esclerose múltipla (CHAVES *et al.*, 2016; GUERREIRO *et al.*, 2006; NARIKAWA *et al.*, 2005; NECO *et al.*, 2017a ; SATO *et al.*, 2013; TANAKA *et al.*, 2008; TATTERMUSCH *et al.*, 2012;). A importância desses marcadores na infecção pelo HTLV-1 é tamanha que, em nosso estudo, foram fortemente correlacionados nos grupos HAM/TSP e assintomáticos, corroborando com o estudo de Sato e colaboradores (2013), que os considera candidatos viáveis para o prognóstico da mielopatia.

Parte da importância das quimiocinas no estudo da infecção pelo vírus está no fato de que células T CD4⁺ IFN- γ ⁺ infectadas pelo HTLV-1 induzem a produção de CXCL10 pelos astrócitos e encontram-se associadas no CSF com a progressão da doença e a carga proviral (ANDO *et al.*, 2013; CHAVES *et al.*, 2016; SATO *et al.*, 2013; YAMANO *et al.*, 2017).

Outra quimiocina que parece ter importância na imunopatogênese das doenças associadas ao vírus é a CXCL8, também conhecida como IL-8. Estudos apontam que essa quimiocina é constantemente expressa em células infectadas pelo HTLV-1 e possui a capacidade de ativar neutrófilos e fazê-los migrar para locais de infecção (RÚA *et al.*, 2015).

O estudo de Romanelli *et al.* (2018) detectou níveis plasmáticos similares de CXCL8 (IL-8) em HAM/TSP e assintomáticos, mas encontrou diferença em seus níveis no CSF. Em nosso trabalho, essa diferença só foi detectada quando comparamos HAM/TSP com indivíduos saudáveis, apesar dos assintomáticos não-HAM demonstrarem leve aumento de IL-8 em relação aos indivíduos saudáveis. Além disso, essa citocina apresentou correlação moderada com CXCL10, CXCL9 e CCL2 no grupo assintomático.

Apesar dos níveis de CCL2 e CCL5 terem sido similares entre os grupos que estudamos, pesquisas anteriores apresentam resultados controversos dessas quimiocinas. Enquanto Montanheiro e colaboradores (2007) relataram concentrações aumentadas de CCL5 em HAM/TSP, Silva-Mata *et al.* (2017) encontraram níveis elevados em CCL2 e CCL5 no grupo soronegativo para HTLV-1.

Embora não tenhamos encontrado diferenças significativas entre idade e gênero com o desenvolvimento de HAM/TSP na população estudada, se sabe que um dos determinantes para o desenvolvimento da HAM/TSP é a idade, estando a doença presente em indivíduos acima de 50 ou 60 anos, geralmente acometendo indivíduos entre as 4^a e 5^a décadas de vida. Um estudo anterior do nosso grupo, com maior número amostral, conseguiu encontrar resultados similares para idade (CARNEIRO-PROIETTI *et al.*, 2002; NECO *et al.*, 2017a; SHOIEBI *et al.*, 2013).

Da mesma maneira, a HAM/TSP apresentou-se mais frequente no gênero feminino em um dos estudos de polimorfismo mais recentes do grupo (dados não publicados), condizendo com outros trabalhos que evidenciam a frequência mais elevada da doença em mulheres em uma proporção de 2,5 a 3:1, em relação aos homens (DOURADO *et al.*, 2003; ESHIMA *et al.*, 2009; YAMANO *et al.*, 2012).

8 CONCLUSÕES

Abaixo, apresentamos nossas principais conclusões:

- a) As células Th17 total, Th17/Th22 e Th17/Th1 não estão associadas ao desenvolvimento de HAM/TSP. Porém, indivíduos infectados pelo HTLV-1 e que apresentam lombalgia possuem maiores frequências de células Th17 IL-22⁺ em relação a pacientes HAM/TSP e assintomáticos;
- b) As células Th17, após mudar seu fenótipo para Th17/22, passam a produzir IL-17 e IL-22 em quantidades suficientes para causar inflamação a nível local (lombalgia), mas não quando a HAM/TSP já está instalada;
- c) As células Th22 sozinhas parecem não desempenhar função importante na sintomatologia pelo HTLV-1, mas sua principal citocina, IL-22, que também é produzida por células Th1, pode ter papel na modulação da resposta imune, junto a outras citocinas, como IL-17;
- d) Células T CD8⁺ produzem a maior parte do IFN- γ nos indivíduos infectados;
- e) As frequências similares encontradas entre as subpopulações Th17 e Th22 podem indicar que os indivíduos HAM/TSP estabilizaram, enquanto os assintomáticos não-HAM podem estar cronificando;
- f) As subpopulações de células Th17 estão aumentadas em homens infectados pelo HTLV-1, o que evidencia haver algum papel do estrógeno sobre a diferenciação dessa subpopulação de células T nas mulheres;
- g) CXCL9 e CXCL10 são bons candidatos a biomarcadores de progressão para HAM/TSP.

REFERÊNCIAS

- AHN, E. et al. Role of PD-1 during effector CD8 T cell differentiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v.115, n.18, p.4749-4754, 2018.
- AHUJA, J. et al. Induction of pro-inflammatory cytokines by human T-cell leukemia virus type-1 Tax protein as determined by multiplexed cytokine protein array analyses of human dendritic cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Paris, v. 61, n. 4, p. 201-208, 2007.
- AKBARIN, M. M. et al. Comparison of HTLV-I Proviral Load in Adult T Cell Leukemia/Lymphoma (ATL), HTLV-I-Associated Myelopathy (HAM-TSP) and Healthy Carriers. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, Mashhad, v.16, p.208-212, 2013.
- ALVAREZ, C. et al. Family aggregation of human T-lymphotropic virus 1-associated diseases: a systematic review. **Frontiers in Microbiology**, Lausana, v.7, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5083714/>>. Acesso em: 20 dez. 2018.
- ANDERSON, R.; MARTIN, F. HAM/TSP introduction: systematic review of HAM/TSP clinical trials. **Retrovirology**, London, v.11, n.1, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4044304/>>. Acesso em: 12 set. 2017.
- ANDO, H. et al. Positive feedback loop via astrocytes causes chronic inflammation in virus-associated myelopathy. **Brain**, London, v.136, p. 2876–2887, 2013.
- ANNUNZIATO, F. et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.204, n.8, p.1849-1861, 2007.
- ARAÚJO, A.Q.C.; SILVA, M.T.T. The HTLV-1 neurological complex. **The Lancet Neurology**, London, v.5, n.12, p.1068-1076, 2006.
- ARAYA, N. et al. Human T-Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1) and Regulatory T Cells in HTLV-1-Associated Neuroinflammatory Disease. **Viruses**, Basileia, v.3, p.1532-1548, 2011.
- ARISAWA, T. et al. The influence of polymorphisms of interleukin-17A and interleukin-17F genes on the susceptibility to ulcerative colitis. **Journal of Clinical Immunology**, Amsterdã, v.1, p.44-49, 2008.
- BANGHAM, C. R. M. Human T cell leukemia virus type 1: Persistence and Pathogenesis. **Annual Reviews of Immunology**, Palo Alto, v.36. n.1. p.25-53, 2018.
- BANGHAM, CR. CTL quality and the control of human retroviral infections. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v.39, n.7, p.1700–1712, 2009.
- BARBER, D. L. et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. **Nature**, London, v.439, n.7077, p.682-687, 2006.
- BARMAK, H. E. et al. Human T cell leukemia virus type I-induced disease: pathways to cancer and neurodegeneration. **Virology**, New York, v.308. n.1. p.1-12, 2003.

BARNARD, A. L. et al. Engagement of specific T-cell surface molecules regulates cytoskeletal polarization in HTLV-1-infected lymphocytes. **Blood**, New York, v.106, n.3, p.988-995, 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15831709>>. Acesso em: 20 mar. 2018.

BARTMAN, M. T. et al. Long-term increases in lymphocytes and platelets in human T-lymphotropic virus type II infection. **Blood**, New York, v.112, n.10, p.3995-4002, 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18755983>>. Acesso em: 12 mar. 2017.

BASTIAN, I.; HINUMA, Y.; DOHERTY, R. R. HTLV-I among Northern Territory aborigines. **The Medical Journal of Australia**, Sidney, v.159, n.1, p-12-16, 1993.

BAZARBACHI, A. et al. Outcome of Patients With HTLV-1 Associated Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma (ATL) Who Have Undergone Stem Cell Transplantation: A Retrospective Study of The EBMT Lymphoma Working Party. **Blood**, New York, v.122, n.21, 2013. Disponível em: <<http://www.bloodjournal.org/content/122/21/3398?sso-checked=true>>. Acesso em: 17 fev. 2016.

BAZZAZI, H. et al. Th1-Th17 Ratio as a New Insight in Rheumatoid Arthritis Disease. **Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology**, Teerã, v.17, n.1, p.68-77, 2018.

BERTOTTO, A. et al. Human breast milk T lymphocytes display the phenotype and functional characteristics of memory cells. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v.20, n.8, p.1877-1880, 1990.

BESNARD, A.G.; SABAT, R.; DUMOUTIER, L. et al. Dual role of IL-22 in allergic airway inflammation and its cross-talk with IL-17A. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v.183, p.1153-1163, 2011.

BIDDISON, W. E. et al. Human T cell leukemia virus type I (HTLV-I)-specific CD8⁺ CTL clones from patients with HTLV-I-associated neurologic disease secrete proinflammatory cytokines, chemokines, and matrix metalloproteinase. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v.159, n.4, p.2018-2025, 1997.

BISWAS, H. H. et al. Neurologic abnormalities in HTLV-I- and HTLV-II-infected individuals without overt myelopathy. **Neurology**, Hagerstown, v.73, n.10, p.781-789, 2009.

BISWAS, H. H. et al. Increased All-Cause and Cancer Moratlity in HTLV-II Infection. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, Hagerstown, v.54, n.3, p.290-296, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n.1376, de 19 de novembro de 1993. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2 dez. 1993. Disponível em: <sna.saude.gov.br/legisla/legisla/hemo/GM_P1376_93hemo.doc>. Acesso em: 27 jan. 2019

CABRERA, M. E. et al. HTLV-I positive adult T-cell leukaemia/lymphoma (ATLL) in Chile. **Leukemia**, Baltimore, v.8, n.10, p.1763-1767, 1994.

- CALATTINI, S. et al. Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. **Retrovirology**, London, v. 2, n. 30, 2005. Disponível em: <<https://retrovirology.biomedcentral.com/articles/10.1186/1742-4690-2-30>>. Acesso em: 30 jan. 2018.
- CARNEIRO-PROIETTI, A. B. F. et al Infecção e doença pelos vírus linfotrópicos humanos de células T (HTLV-I/II) no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v.35, n.5, p.499-508, 2002.
- CARNEIRO-PROIETTI, A. B.; CATALAN-SOARES, B.; PROIETTI, F. A. Human T cell lymphotropic viruses (HTLV-I/II) in South America: should it be a public health concern?. **Journal of Biomedical Science**, London, v.9, n.6, p.587-595, 2002.
- CARVALHO, E. M. et al. Cytokine Profile and Immunomodulation in Asymptomatic Human T-Lymphotropic Virus Type 1-Infected Blood Donors. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, Hagerstown, v.27, n.1, p.1-6, 2001.
- CARVALHO, N. B. et al. Impaired TNF, IL-1 β , and IL-17 production and increased susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis* infection in HTLV-1 infected individuals. **Tuberculosis**, Edimburgo, v.108, p.35-40, 2018.
- CATALAN-SOARES, B.; CARNEIRO-PROIETTI, A. B. F.; PROIETTI, F. A. 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. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.21, n.3, p.926-931, 2005.
- CESSAY, M. M. et al. Phase II study on combination therapy with CHOP-Zenapax for HTLV-I associated adult T-cell leukaemia/lymphoma (ATLL). **Leukemia Research**, New York, v.36, n.7, p.857-861, 2012.
- CHAMPS, A. P. S.; et al. Mielopatia associada ao HTLV-1: análise clínico-epidemiológica em uma série de casos de 10 anos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v.43, p.668-672, 2010.
- CHANG, S. H.; DONG, C. A novel heterodimeric cytokine consisting of IL-17 and IL-17F regulates inflammatory responses. **Cell Research**, Basingstoke, v.17, p.435-440, 2007.
- CHAVES, D. G. et al. Plasmatic proinflammatory chemokines levels are tricky markers to monitoring HTLV-1 carriers. **Journal of Medical Virology**, New York, v.88, p.1438–1447, 2016.
- CHEN, J. et al. The polymorphism of IL-17 G-152A was associated with childhood asthma and bacterial colonization of the hypopharynx in bronchiolitis. **Journal of Clinical Immunology**, Amsterdã, v.30, p.539-545, 2010.
- CHEN, K.; KOLLS, J. K. Interleukin-17A (IL17A). **Gene**, Amsterdã, v.614, p.8-14, 2017.
- CHEVALIER, S.A. et al. The Transcription Profile of Tax-3 Is More Similar to Tax-1 than Tax-2: Insights into HTLV-3 Potential Leukemogenic Properties. **PLOS One**, San Francisco,

v. 7, n. 7, p. 7997-7999, 2005. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3401231/>>. Acesso em: 14 mar. 2018.

CHUNG, Y.; YANG, X.; CHANG, S.H. et al. Expression and regulation of IL-22 in the IL-17-producing CD4+ T lymphocytes. **Cell Research**, Basingstoke, v.16, p.902-907, 2006.

CLAUDIO, E. et al. The Adaptor Protein CIKS/Act1 Is Essential for IL-25-Mediated Allergic Airway Inflammation. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v.182, p.1617-1630, 2009.

CLERC, I. et al. 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 Downregulation of Tax-dependent Viral Transcription by HBZ. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 283, n. 35, 2008. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18599479>>. Acesso em: 15 mar. 2018.

COOK, L. B. et al. HTLV-1: Persistence and pathogenesis. **Virology**, New York, v.435, p.131-140, 2013.

COOPER, S. A.; VAN DER LOEFF, M. S.; TAYLOR, G.P. The neurology of HTLV-1 infection. **Practical Neurology**, London, v.9, n.1, p.16-26, 2009.

COSTA, C. M. C. et al. Neuropathology of Human and Experimental TSP/HAM: a critical review. **Acta Neurologica Belgica**, Bruxelas, v.102, p.21-29, 2002.

COUROUCÉ, A. M. et al. HTLV Testing in Blood Transfusion. **Vox Sanguinis**, Basileia, v.74, n.2, p.165-169, 1998.

CUI, D. et al. Changes of circulating Th22 cells in children with hand, foot, and mouth disease caused by enterovirus 71 infection. **Oncotarget**, Albany, v.8, n.17, p.29370-29382, 2017.

CURRER, R. et al. HTLV tax: a fascinating multifunctional co-regulator of viral and cellular pathways. **Frontiers in Microbiology**, Lausana, v.3, n.406, 2012. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23226145>>. Acesso em: 2 nov. 2018.

DAS, G. S.; SHERIDAN, C. A.; JANEWAY. The source of early IFN- γ that plays a role in Th1 priming. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v.167, 2001. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11489982>>. Acesso em: 5 set. 2017.

DAY, C. D. et al. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. **Nature**, London, v.443, p.350-354, 2006.

DE CASTRO-COSTA, C. M. et al. Neuropathology of two brazilian autopsied cases of tropical paraparesis/HTLV-I associated myelopathy (TSP/HAM) of long evolution. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, São Paulo, v.60, p.531-536, 2002.

DE THÉ, G.; BOMFORD, R. An HTLV-1 vaccine: why, how, for whom? **AIDS Research and Human Retroviruses**, New York, v.9, n.5, p.381-386, 1993.

DINESH, R. K.; HAHN, B. H.; SINGH, R. P. PD-1, gender, and autoimmunity. **Autoimmunity Reviews**, Amsterdã, v. 9, p.583-587, 2010.

DODON, M. D. et al. Tax protein of human T-cell leukaemia virus type 1 induces interleukin 17 gene expression in T cells. **The Journal of General Virology**, London, v.85, p.1921-1932, 2004.

DONG, C. Regulation and pro-inflammatory function of interleukin-17 family cytokine. **Immunological reviews**, Copenhage, v.226, n.1, p.80-86, 2008.

DOURADO, I. et al. HTLV-1 in the General Population of Salvador, Brazil: A City With African Ethnic and Sociodemographic Characteristics. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, Hagerstown, v. 34, n. 5, p. 527-531, 2003.

DOUVILLE, R.N. et al. HTLV-1 HBZ protein inhibits IRF3-mediated innate immune responses. **Retrovirology**, London, v. 8, n. 1, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3112817>>. Acesso em: 15 jun. 2016.

DUHEN, T.; GEIGER, R.; JARROSSAY, D. et al. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. **Nature Immunology**, New York, v.10, p.857-863, 2009.

DUMAS, M. et al. Seroepidemiology of human T-cell lymphotropic virus tpe I/II in Benin (West Africa). **AIDS Research and Human Retroviruses**, New York, v.7, n.5, p.447-451, 1991.

DUMOUNTIER, L.; LOUAHED, J.; RENAULD, J.C. Cloning and characterization of IL-10-related T cell-derived inducible factor (IL-TIF), a novel cytokine structurally related to IL-10 and inducible by IL-9. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.164, p.1814-1819, 2000.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. **Geographical distribution of areas with a high prevalence of HTLV-1 infection**. Stockholm, 2015 (Technical report).

ESHIMA et al. Age and gender specific prevalence of HTLV-1. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdã, v. 45, p. 135-138, 2009.

EYERICH, S. et al. IL-17 and IL-22: siblings, not twins. **Trends in Immunology**, Oxford, v.31, n.9, p.354-361, 2010.

EZINNE, C. C. et al. HTLV-1 Specific CD8⁺ T Cell Function Augmented by Blockade of 2B4/CD48 Interaction in HTLV-1 Infection. **PLOS One**, San Francisco, v.9, n.2, 2014. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0087631>>. Acesso em: 15 fev. 2019.

FAN, J. et al. APOBEC3G Generates Nonsense Mutations in Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Proviral Genomes *In Vivo*. **Journal of Virology**, Baltimore, v.84, n.14, p.7278-7287, 2010.

FARD, N. A.; AZIZI, G.; MIRSHAFIEY, A. The Potential Role of T Helper Cell 22 and IL-22 in Immunopathogenesis of Multiple Sclerosis. **Inovations in Clinical Neuroscience**, Edgemont, v.13, n. 7-8, p.30-36, 2016.

FAVRE, D. et al. Tryptophan catabolism by indoleamine 2,3 dioxygenase 1 alters the balance of Th17 to regulatory T cells in HIV disease. **Science Translational Medicine**, Washington, v.2, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20484731>>. Acesso em: 18 abr. 2018.

FERREIRA JÚNIOR, O. C.; PLANELLES, V.; ROSENBLATT, J. D. Human T-cell leukemia viruses: epidemiology, biology, and pathogenesis. **Blood Reviews**, London, v.11, n.2, p.91-104, 1997.

FLORÊNCIO, M. M. et al., 1990 apud LOUREIRO, P. Alterações hematológicas em pacientes com infecção pelo HTLV-1. **Revista Ciências Médicas de Pernambuco**, Recife, v.7, n.2, 2011.

FOSSIEZ, F. et al. T Cell Interleukin-17 Induces Stromal Cells to Produce Proinflammatory and Hematopoietic Cytokines. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v.183, p.2593-2603, 1996.

FURAKAWA, Y. et al. Different Cytokine Production in Tax-Expressing Cells between Patients with Human T Cell Lymphotropic Virus Type I (HTLV-I)-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis and Asymptomatic HTLV-I Carriers. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.187, p.1116-1125, 2003.

FUTSCH, N. et al. Cytokine Networks Dysregulation during HTLV-1 Infection and Associated Diseases. **Viruses**, Basileia, v.10, n.12, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6315340/>>. Acesso em: 3 fev. 2019.

FUZZI, H. T. et al. Immunopathogenesis of HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). **Life Sciences**, Oxford, v. 104, p. 9-14, 2014.

GADELHA, S.R. et al. Correlation between polymorphisms at interleukin-6 but not at interleukin-10 promoter and the risk of human T lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in Brazilian individuals. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 80, n. 12, p. 2141-2146, 2008.

GAFFEN, S. L. Structure and signaling in the IL-17 receptor family. **Nature Reviews Immunology**, London, v.9, p.556-567, 2009.

GALLO, R. C. History of the discoveries of the first human retroviruses: HTLV-1 and HTLV-2. **Oncogene**, Basingstoke, v.24, p.5926-5930, 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC555587/>>. Acesso em: 17 jan. 2018.

GALLO, R. C. Human retroviruses after 20 years: a perspective from the past and prospects for their future control. **Immunological Reviews**, Copenhagen, v.185, n.1, p.236-265, 2002.

- GALLO, R. C.; POIESZ, B. J.; RUSCETTI, F. W. Regulation of human T-cell proliferation: T-cell growth factor and isolation of a new class of type-C retroviruses from human T-cells. **Haematology and Blood Transfusion.**, Berlim, n.26, p.502-514, 1981.
- GALVÃO-CASTRO, B. et al. Distribution of human T-lymphotropic virus type I among blood donors: a nationwide Brazilian study. **Transfusion**, Arlington, v.37, n.2, p.242-243, 1997.
- GARLET, G. P. Association of human T lymphotropic virus 1 amplification of periodontitis severity with altered cytokine expression in response to a standard periodontopathogen infection. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v.50, n.3, p.e11-e18, 2010.
- GESSAIN, A. et al. Antibodies to Human T-Lymphotropic Virus Type-I in Patients With Tropical Spastic Paraparesis. **The Lancet**, London, v.326, n.8452, p.407-410, 1985.
- GESSAIN, A. et al. HTLV-3/4 and simian foamy retroviruses in humans: discovery, epidemiology, cross-species transmission and molecular virology. **Virology**, New York, v. 435, n. 1, p. 187-199, 2013.
- GESSAIN, A.; CASSAR, O. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. **Frontiers in Microbiology**, Lausana, v. 3, p. 1-23, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23162541>>. Acesso em: 12 mar. 2016.
- GESSAIN, A.; GOUT, O. Chronic Myelopathy Associated with Human T-Lymphotropic Virus Type I (HTLV-I). **Annals of Internal Medicine**, Filadélfia, v.117, n.11, p.933-946, 1992.
- GHAFFARI, S. A. et al. Circulating concentrations of interleukin (IL)-17 in patients with multiple sclerosis: Evaluation of the effects of gender, treatment, disease patterns and IL-23 receptor gene polymorphisms. **Iranian Journal of Neurology**, Teerã, v.16, n.1, p.15-25, 2017.
- GHEZ, D. et al. Neuropilin-1 is Involved in Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 Entry. **Journal of Virology**, Baltimore, v.80, n.14, p.6844-6854, 2006.
- GONÇALVES, D. U. et al. Epidemiology, Treatment and Prevention of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1-Associated Diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.23, n.3, p.577-589, 2010.
- GORENEC, S.Z. et al. The comparison of Th1, Th2, Th9, Th17 and Th22 cytokine profiles in acute and chronic HIV-1 infection. **Microbial Pathogenesis**, London, v.97, p.125-130, 2016.
- GRACEY, E. et al. Sexual Dimorphism in the Th17 Signature of Ankylosing Spondylitis. **Arthritis & Rheumatology**, Malden, v.68, n.3, p.679-689, 2016.
- GUERREIRO, J. B. et al. Levels of serum chemokines discriminate clinical myelopathy associated with human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) disease from HTLV-1 carrier state. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v.145, p.296-301, 2006.

- HANON, E. et al. 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**, New York, v.95, p.1386–1392, 2000b. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10666215>>. Acesso em: 15 mar. 2018.
- HANON, E. et al. Fratricide among CD8(+) T lymphocytes naturally infected with human T cell lymphotropic virus type I. **Immunity**. v.13, n.5, p. 657–64, 2000a.
- HANON, E. et al. High production of interferon g but not interleukin-2 by human Tlymphotropic virus type I–infected peripheral blood mononuclear cells. **Blood**, New York, v. 98, n. 3, p. 721-726, 2001. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11468172>>. Acesso em: 15 mar. 2018.
- HITCHON, C.A.; ALEX, P.; ERDILE, L.B. et al. A distinct multicytokine profile is associated with anti-cyclical citrullinated peptide antibodies in patients with early untreated inflammatory arthritis. **The Journal of Rheumatology**, Toronto, v.31, p.2336-2346, 2004.
- HONARBAKHSI, S. et al. High prevalence of bronchiectasis is linked to HTLV-1-associated inflammatory diseases. **BMC Infectious Diseases**, London, v.15, n.258, 2015.
- HYMOWITZ, S. G. et al. IL-17s adopt a cystine knot fold: structure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and implications for receptor binding. **The EMBO Journal**, Oxford, v.20, n.19, p.5332-5341, 2001.
- IGAKURA, T. et al. Spread of HTLV-I Between Lymphocytes by Virus-Induced Polarization of the Cytoskeleton. **Science**, New York, v.299, n.5613, p.1713-1716, 2003.
- IJICH, S.; OSAME, M. Human T Lymphotropic Virus Type I (HTLV-I)-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP): Recent Perspectives. **Internal Medicine**, Tóquio, v.34, p.713-721, 1995.
- IVANOV, I. I. et al. The orphan nuclear receptor ROR gamma T directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. **Cell**, Cambridge, v.126, n.6, p.1121-1133, 2006.
- IZUMO, S. et al. Neuropathology of HTLV-I-Associated Myelopathy: A Report of Two Autopsy Cases. **Pediatrics International**, Carlton South, v.34, n.3, p.358-364, 1992.
- JIANG, H. et al. Interleukin-23 may contribute to the pathogenesis of lumbar disc herniation through the IL-23/IL-17 pathway. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, London, v.11, n.12, 2016.
- JONES, K. S. et al. Cell-free HTLV-1 infects dendritic cells leading to transmission and transformation of CD4⁺ T cells. **Nature Medicine**, New York, n.14, p.429-436, 2008.
- JONES, K. S. et al. Heparan Sulfate Proteoglycans Mediate Attachment and Entry of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Virions into CD4⁺ T Cells. **Journal of Virology**, Baltimore, v.79, n.20, p.12692-12702, 2005.

JONES, K. S. et al. Molecular Aspects of HTLV-1 Entry: Functional Domains of the HTLV-1 Surface Subunit (SU) and Their Relationships to the Entry Receptors. **Viruses**, Basileia, n.3, p.794-810, 2011.

JOURNO, C.; MAHIEUX, R. HTLV-1 and innate immunity. **Viruses**, Basileia, n.8, p. 1374-1394, 2011.

KAO, C.Y.; CHEN, P.; THAI, P. et al. IL-17 markedly up-regulates β -defensin-2 expression in human airway epithelium via JAK and NF-kappaB signaling pathways. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v.173, p.3482-3491, 2004.

KASHANCHI, F.; BRADY, J. N. Transcriptional and post-transcriptional gene regulation of HTLV-1. **Oncogene**, Basingstoke, n.24, 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16155601>>. Acesso em: 13 jul. 2017.

KAZANJI, M.; GESSAIN, A. Human T-cell Lymphotropic Virus types I and II (HTLV-I/II) in French Guiana: clinical and molecular epidemiology. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.19, n.5, p.1227-1240, 2003.

KEBIR, H. et al. Human Th17 Lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. **Nature Medicine**, New York, v.13, p.1173-1175, 2007.

KHADER, S.A.; BELL, G.K.; PEARL, J.E. et al. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during *Mycobacterium tuberculosis* challenge. **Nature Immunology**, New York, v.8, p.369-377, 2007.

KINOSHITA, K. et al. Milk-borne transmission of HTLV-1 from carrier mothers to their children. **Japanese Journal of Cancer Research**, Tóquio, v.78, n.7, p.674-680, 1987.

KIRKHAM, B.W. et al. Synovial membrane cytokine expression is predictive of joint damage progression in rheumatoid arthritis: a two-year prospective study (the DAMAGE study cohort). **Arthritis & Rheumatology**, Atlanta, v.54, n.4, p.1122-1131, 2006.

KITAGAWA, T. et al. Antibodies to HTLV-I in Japanese Immigrants in Brazil. **JAMA - The Journal of the American Medical Association**, Chicago, v.256, n.17, 1986. Disponível em: <<https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/vol/256/pg/2342>>. Acesso em: 29 mai. 2015.

KOENECKE, C. et al. IFN- Production by Allogeneic Foxp3+ Regulatory T Cells Is Essential for Preventing Experimental Graft-versus-Host Disease. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v.189, p.2890-2896, 2012.

KOKORIS, S. I. et al. Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma (ATLL): Report of Two Fully Documented Hellenic Patients. **Leukemia & Lymphoma**, London, v.45, n.4, p.715-721, 2004.

KOLLS, J. K.; LINDÉN, A. Interleukin-17 Family Members and Inflammation. **Immunity**, Cambridge, v.21, p.467-476, 2004.

- KOSTENSE, S. et al. High viral burden in the presence of major HIV-specific CD8⁺ T cell expansions: evidence for impaired CTL effector function. **European Journal of Immunology**, Weinheim, n.31, p.677-686, 2001.
- KOYANAGI, Y. et al. In vivo infection of human T-cell leukemia virus type I in non-T cells. **Virology**, New York, v.196, n.1, p.25-33. 1993.
- KOZAKO, T. et al. PD-1/PD-L1 expression in human T-cell leukemia virus type 1 carriers and adult T-cell leukemia/lymphoma patients. **Leukemia**, London, v.23, n.2, p.375-382, 2009.
- KOZAKO, T. PD-1/PDL1 expression in human T cell leukemia type 1 ACs and ATLL patients. **Leukemia**, London, v.23, p.375-382, 2008.
- KROOM, E. G. et al. HTLV-1- e HTLV-2 – O vírus, sua multiplicação e estrutura genômica. In: CARNEIRO-PROIETTI, A.B.F (Org.). **Cadernos Hemominas HTLV**. 6. ed. Belo Horizonte: Fundação Hemominas, 2010. v.15, p.11-20.
- KUBOTA, R. et al. Degenerate specificity of HTLV-I-specific CD8⁺ T cells during viral replication in patients with HTLV-I-associated myelopathy (HAM/TSP). **Blood**, New York, v.8, 2002. Disponível em: <<http://www.bloodjournal.org/content/101/8/3074?sso-checked=true>>. Acesso em: 15 dez. 2018.
- KUESTNER, R. E. et al. Identification of the IL-17 Receptor Related Molecule IL-17RC as the Receptor for IL-17F. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v.179, p.5462-5473, 2007.
- LAL, R. B. et al. Costimulatory effects of T cell proliferation during infection with human T lymphotropic virus types I and II are mediated through CD80 and CD86 ligands. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v.157, n.3, p.1288-1296, 1996.
- LAIRMORE, M.D; HAINES, R.; ANUPAN, R. Mechanisms of human T-lymphotropic virus type 1 transmission and disease. **Current Opinion in Virology**, Amsterdã, v. 2, n. 4, p. 474-481, 2012.
- LE BLANC, I. et al. HTLV-1 structural proteins. **Virus Research**, Amsterdã, v. 78, n. 1, p. 5-16, 2001.
- LEAL, F. E. et al. Expansion in CD39⁺ CD4⁺ Immunoregulator T Cells and Rarity of Th17 Cells in HTLV-1 Infected Patients Is Associated with Neurological Complications. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v.7, n.2, 2013. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0002028>>. Acesso em: 14 out. 2018.
- LEE, J. et al. IL-17E, a Novel Proinflammatory Ligand for the IL-17 Receptor Homolog IL-17Rh1. **The Journal of Biological Biochemistry**, Baltimore, v.276, p.1660-1664, 2001.
- LEVIN, M. C. et al. Autoimmunity due to molecular mimicry as a cause of neurological disease. **Nature Medicine**, New York, n.8, p.509-513, 2002.

LI, H. et al. Cloning and characterization of IL-17B and IL-17C, two new members of the IL-17 cytokine family. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v.97, n.2, p.773-778, 2000.

LI, Z.; YUE, Y.; XIONG, S. Distinct Th17 inductions contribute to the gender bias in CVB3-induced myocarditis. **Cardiovascular Pathology**, New York, v.22, n.5, p.373-382, 2013.

LIBERSKI, P. P. et al. Ultrastructural Pathology of a Chilean Case of Tropical Spastic Paraparesis/Human T-cell Lymphotropic Type-I-associated myelopathy (TSP/HAM). **Ultrastructural Pathology**, London, v.23, n.3, p.153-162, 1999.

LOUREIRO, P. et al., 1994 apud LOUREIRO, P. **Infecção pelo HTLV-1: diagnóstico e determinação da carga proviral em indivíduos assintomáticos e com enfermidades associadas em serviço de referência no Nordeste**. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, 2008.

LU, T. et al. Increased frequency of circulating Th22 cells in patients with B-cell non-Hodgkin's lymphoma. **Oncotarget**, Albany, v.7, n.35, p.56574-56583, 2016.

MAHIEUX, R.; GESSAIN, A. HTLV-1 and associated adult T-cell leukemia/lymphoma. **Reviews in Clinical and Experimental Hematology**, Gênova, v.7, n.4, p.336-361, 2003.

MAHIEUX, R.; GESSAIN, A. HTLV-3/STLV-3 and HTLV-4 Viruses: Discovery, Epidemiology, Serology and Molecular Aspects. **Viruses**, Basileia, v. 3, n. 7, p. 1074-1090, 2011.

MAJOROVITS, E. et al. Human T-lymphotropic virus-1 visualized at the virological synapse by electron tomography. **PLoS One**, San Francisco, v.3, n.5, e2251, 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC18509526/>>. Acesso em: 10 mar. 2018.

MALONEY, E. M. et al. A survey of the human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) in South-Western Colombia. **International Journal of Cancer**, New York, v.44, n.3, p.419-423, 1989.

MANEL, N. et al. The Ubiquitous Glucose Transporter GLUT-1 Is a Receptor for HTLV. **Cell**, Cambridge, v.115, p.449-459, 2003.

MANNS, A.; HISADA, M.; LA GRENADE, L. Human T-Lymphotropic virus type I infection. **The Lancet**, London, v.353 n.9168, p.1951-1958, 1999.

MARRIOTT, S. J.; SEMMES, O. J. Impact of HTLV-I Tax on cell cycle progression and the cellular DNA damage repair response. **Oncogene**, Basingstoke, v.24, p.5986-5995, 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16155605>>. Acesso em: 11 jul. 2018.

MARTIN-LATIL, S. et al. Transcytosis of HTLV-1 across a tight human epithelial barrier and infection of subepithelial dendritic cells. **Blood**, New York, v.120, n.3, p.572-580, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22589473>>. Acesso em: 10 mai. 2016.

- MARTINS, M. L. et al. Patogênese da infecção pelo HTLV. In: CARNEIRO-PROIETTI, A.B.F (Org.). **Cadernos Hemominas HTLV**. 6. ed. Belo Horizonte: Fundação Hemominas, 2010. v.15, p.30-59.
- MARTINS, M.L.; GUIMARÃES, J.C.; RIBAS, J.G. et al. Long-term follow-up of HTLV-1 proviral load in asymptomatic carriers and in incident cases of HAM/TSP: what is its relevance as a prognostic marker for neurologic disease?. **Journal of Neurovirology**, Basingstoke, v.23, n.1, p.125-133, 2016.
- MARTIN, F.; TAGAYA, Y.; GALLO, R. Time to eradicate HTLV-1: an open letter to WHO. **The Lancet**, London, v.391, n.10136, p.02-08, 1893-1894, 2018.
- MATSUOKA, M.; GREEN, P. L. The HBZ gene, a key player in HTLV-I pathogenesis. **Retrovirology**, London, v.6, n.71, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19650892>>. Acesso em: 4 set. 2016.
- MATSUOKA, M.; JEANG, K. Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. **Nature Reviews Cancer**, London, n.7, p.270-280, 2007.
- MATSUOKA, M.; YASUNAGA, J. Human T-cell leukemia virus type 1: replication, proliferation and propagation by Tax and HTLV-1 bZIP factor. **Current Opinion in Virology**, Amsterdã, n.3, p.684-691, 2013.
- MELAMED, A. et al. Clonality of HTLV-2 in Natural Infection. **PLOS Pathogens**, San Francisco, v. 10, n. 3, p. 1-9, 2014. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1004006>>. Acesso em: 30 mai. 2018.
- MEIRA, D. A. et al. Correlation between cytokine serum levels, number of CD4⁺ T cells/mm³ and viral load in HIV-1 infected individuals with or without antiretroviral therapy. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, São Paulo, v.10, n.3, p.293-310, 2004.
- MESQUITA Jr, D. et al. Autoimmune diseases in the TH17 era. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v.42, n.6, p.476-486, 2009.
- MIYAZAKI, Y. et al. Development of a novel redirected T-cell-based adoptive immunotherapy targeting human telomerase reverse transcriptase for adult T-cell leukemia. **Blood**, Novas York, v.121, n.24, p.4894-4901, 2013. Disponível em: <<http://www.bloodjournal.org/content/121/24/4894?sso-checked=true>>. Acesso em: 30 jan. 2014.
- MONTANHEIRO, A. et al. The Elevated Interferon Gamma Production is an Important Immunological Marker in HAM/TSP Pathogenesis. **Scandinavian Journal of Immunology**, Oslo, v. 70, p. 403–407, 2009.
- MONTANHEIRO, P. et al. High production of RANTES and MIP-1alpha in the tropical spastic paraparesis/HTLV-1-associated myelopathy (TSP/HAM). **Journal of Neuroimmunology**, Amsterdã, v.188, n.(1-2), p.138-142, 2007.

- MORGAN, O. HTLV-1 Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis How Far have We Come?. **The West Indian Medical Journal**, Mona, v. 60, n. 6, p. 505-512, 2011.
- MORI, S. et al. Bronchoalveolar lymphocytosis correlates with human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) proviral DNA load in HTLV-I carriers. **Thorax**, London, v.60, p.138-143, 2005.
- MOSELEY, T. A.; HAUDENSCHILD, D. R.; REDDI, A. H. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, Oxford, n.14, p.155-174, 2003.
- MOSMANN, T. R.; MOORE, K. W. The role of IL-10 in crossregulation of Th1 and Th2 responses. **Immunology Today**, Amsterdã, v.12, n.3, p.A49-A53, 1991.
- MUNIZ, A.L. et al. Association of cytokines, neurological disability, and disease duration in HAM/TSP patients. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, São Paulo, v. 64, n. 2, 2006.
- MURPHY, E. et al. Human T-Lymphotropic Virus Type I (HTLV-I) Seroprevalence in Jamaica. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v.133, n.11, p.1114-1124, 1991.
- NAGAI, M. et al. CD8⁺ cells are an in vivo reservoir for human T-cell lymphotropic virus type I. **Blood**, New York, v.98, n.6, p.1858-1861, 2001. Disponível em: <<http://www.bloodjournal.org/content/98/6/1858>>. Acesso em: 17 ago. 2017.
- NAGAI, M.; OSAME, M. Human T-cell lymphotropic virus type I and neurological diseases. **Journal of Neurovirology**, Basingstoke, v.9, n.2, p.228-235, 2003.
- NAKAE, S. et al. Suppression of Immune Induction of Collagen-Induced Arthritis in IL-17-Deficient Mice. **The Journal of Immunology**, Baltimore, n.171, p.6173-6177, 2003.
- NAKAGAWA, M. et al. Therapeutic trials in 200 patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Journal of Neurovirology**, Basingstoke, v.2, p.345-355, 1996.
- NAKAMURA, S. et al. Detection of tumor necrosis factor-alpha-positive cells in cerebrospinal fluid of patients with HTLV-I-associated myelopathy. **Journal of Neuroimmunology**, Amsterdã, v.42, n.2, p.127-130, 1993.
- NAKAMURA, T. HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP): the role of HTLV-I-infected Th1 cells in the pathogenesis, and therapeutic strategy. **Folia Neuropathologica**, Varsovia, v.47, n.2, p.182-194, 2009.
- NDHLOVU, L. C. et al. HTLV-1 Tax Specific CD8⁺ T Cells Express Low Levels of Tim-3 in HTLV-1 Infection: Implications for Progression to Neurological Complications. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v.5, n.4, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3082508/>>. Acesso em: 30 mai. 2017.
- NARIKAWA, K. et al. CSF-chemokines in HTLV-I-associated myelopathy: CXCL10 up-regulation and therapeutic effect of interferon-alpha. **Journal of Neuroimmunology**, Amsterdã, v.159, n.(1-2), p.177-182, 2005.

NECO, H.V.P.C. et al. Mediators go Together: High Production of CXCL9, CXCL10, IFN- γ and TNF- α in HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis. **AIDS Research and Human Retroviruses**, New York, v.33, p.1134-1139, 2017a.

NECO, H.V.P.C. et al. IL17A Polymorphism is not Associated with Human T-Lymphotropic Virus-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis. **Viral Immunology**, New York, v.30, p.1-4, 2017b.

OLIVEIRA, S.R.; AVELINO, M.M. Importância Da Infecção Pelo Vírus Linfotrópico-T Humano Tipo 1 (HTLV-1), Síndromes Clínicas Associadas e Transmissão Vertical. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 36, n. 1, p. 18-34, 2007.

ORLAND, J.R. et al. Prevalence and clinical features of HTLV neurologic disease in the HTLV Outcomes Study. **Neurology**, Hagerstown, n. 61, v. 11, p. 1588–1594, 2003.

OSAME, M. et al. HTLV-I Associated Myelopathy, a New Clinical Entity. **The Lancet**, London, p.1031-1032, 1986.

OSAME, M. Pathological mechanisms of human T-cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy (HAM/TSP). **Journal of Neurovirology**, Basingstoke, v.8, n.5, p.359-364, 2002.

PAIS-CORREIA, A. M. Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses. **Nature Medicine**, New York, v.16, n.1, p.83-89, 2010.

PETERS, A. Th17 cells induce ectopic lymphoid follicles in central nervous system tissue inflammation. **Immunity**, Cambridge, v.35, n.6, p.986-996, 2011.

PETROVAS, C. et al. PD-1 is a regulator of virus-specific CD8+ T cell survival in HIV infection. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v.203, p.2281–2292, 2006.

PHILIP, S. et al. Regulation of Human T-Lymphotropic Virus Type I Latency and Reactivation by HBZ and Rex. **PLOS Pathogens**, San Francisco, v. 10, n. 4, 2014.

Disponível em:

<<https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1004040>>. Acesso em: 1 fev. 2016.

PITTA, M. G. R. et al. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v.119, n.8, p.2379-2387, 2009.

PLANK, M.W. et al. Th22 Cells Form a Distinct Th Lineage from Th17 Cells In Vitro with Unique Transcriptional Properties and Tbet-Dependent Th1 Plasticity. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v.198, n.5, p.2182-2190, 2017.

POIESZ, B. J. et al. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v.77, n.12, p.7415-7419, 1980.

POLANCZYK, M. J. Treg suppressive activity involves estrogen-dependent expression of programmed death-1 (PD-1). **International Immunology**, v.19, p.337–43, 2007.

POPOVIC, M. et al. Alteration of T-cell functions by infection with HTLV-I or HTLV-II. **Science**, New York, v.226, n.4773, 1984.

PORTO, M.A.F. et al. Implicações clínicas e imunológicas da associação entre o HTLV-1 e a estrogênio-dependência. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 35, n. 6, p. 641-649, 2002.

PROIETTI A. et al. Infection and disease caused by the human T cell lymphotropic viruses type I and II in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v.35, n.5, 2002.

PROIETTI, F. A. et al. Global epidemiology of HTLV-1 infection and associated diseases. **Oncogene**, Basingstoke, n.24, p.6058-6068, 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16155612>>. Acesso em: 9 jun. 2018.

QIAGEN. **HTLV-I Replication Cycle**. Disponível em: <<http://www.qiagen.com/products/genes%20and%20pathways/pathway%20details.aspx?pid=229>>. Acesso em: 25 jan. 2019.

RØ, A. D. B. et al. Reduced Th22 cell proportion and prevention of atopic dermatitis in infants following maternal probiotic supplementation. **Clinical e Experimental Allergy**, Oxford, v.47, n.8, p.1014-1021, 2017.

RODRIGUES, E. S. et al. HTLV-1 infects human mesenchymal stromal cell in vitro and modifies their phenotypic characteristics. **Virology**, New York, n.449, p.190-199, 2014.

ROMÁN, G.C.; OSAME, M. Identity of HTLV-I-associated tropical spastic paraparesis and HTLV-I-associated myelopathy. **Lancet**, London, v.1, n.8586, 651, 1988.

ROMANELLI, L. C. F.; CARAMELLI, P.; PROIETTI, A. B. F. C. O vírus linfotrópico da célula t humanos tipo 1 (HTLV-1): quando suspeitar da infecção. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v.56. p.340-347, 2010.

ROMANELLI, L. C. F. et al. Spinal cord hypometabolism associated with infection by human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1). **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v.12, n.8, 2018. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0006720>>. Acesso em: 12 jan. 2019.

ROMANOS, M. T. V. et al. **Viroses Oncogênicas. Introdução à Virologia Humana**. 2 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2008, v. 1, p. 448-478.

ROSA, D. V. et al. Plasma and cerebrospinal fluid levels of cytokines as disease markers of neurologic manifestation in long-term HTLV-1 infected individuals. **Biomarkers in Medicine**, London, v.12, n.5, p.447-454, 2018.

ROUCOUX, D. F.; MURPHY, E. L. The epidemiology and disease outcomes of human T-lymphotropic virus type II. **AIDS reviews**, Barcelona, v.6, n.3, p.144-154, 2004.

RÚA, J. et al. IL8 Gene Polymorphism SNP rs4073 analysis between HTLV-1 Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis and HTLV-1 Carriers. **Retrovirology**, London, v.12, n.1, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4578272/>>. Acesso em: 5 nov. 2016.

SAGAR, D. et al. In vivo immunogenicity of Tax (11–19) epitope in HLA-A2/DTR transgenic mice: Implication for dendritic cell-based anti-HTLV-1 vaccine. **Vaccine**, Amsterdã, v. 32, n. 26, p. 3274-3284, 2014.

SAITO, M. Immunogenetics and the Pathological Mechanisms of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1- (HTLV-1-) Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP). **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, Cairo, doi: 10.1155/2010/478461, 2010.

SANTOS, S. B. et al. Immunological and viral features in patients with overactive bladder associated with human T-cell lymphotropic virus type 1 infection. **Journal of Medical Virology**, New York, v.84, n.11, p.1809-1817, 2012.

SANTOS, S. B.; MUNIZ, A. L.; CARVALHO, E. M. Imunopatogênese da Mielopatia Associada ao HTLV-I. **Gazeta Médica da Bahia**, Salvador, v.79, n.1, p.11-17, 2009.

SAPAN et al. Pattern of cytokine (IL-6 and IL-10) level as inflammation and anti-inflammation mediator of multiple organ dysfunction syndrome (MODS) in polytrauma. **International Journal of Burns and Trauma**, Madison, v.6, n.2, p.37-43, 2016.

SARKIS, S. et al. Increased osteopontin expression in HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) patient cells is associated with IL-17 expression. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdã, v.58, n.1, p.295-298, 2013.

SATO, T. et al. CSF CXCL10, CXCL9, and neopterin as candidate prognostic biomarkers for HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v.7, e249, 2013. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0002479>>. Acesso em: 12 fev. 2017.

SATOU, Y. et al. HTLV-I basic leucine zipper factor gene mRNA supports proliferation of adult T cell leukemia cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v.103, n.3, p.720-725, 2006.

SEGUCHI, T. et al. Human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) associated myelopathy and Sjögren's syndrome representing pulmonary nodular amyloidosis and multiple bullae: report of an autopsy case. **Virchows Archiv**, Berlim, v.449, n.6, p.8740876, 2006.

SHABGAH, A. G. Interleukin-22 in human inflammatory diseases and viral infections. **Autoimmunity Reviews**, Amsterdã, v.16, n.12, p.1209-1218, 2017.

SCHARFF, A. Z. et al. Sex differences in IL-17 determine chronicity in male versus female urinary tract infection. **bioRxiv**. doi 10.1101/449124, 2018. Disponível em: <<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/449124v1>>. Acesso em: 10 fev. 2019.

SHI, Y. et al. A Novel Cytokine Receptor-Ligand Pair: Identification, molecular characterization, and in vivo immunomodulatory activity. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.275, n.25 p.19167-19176, 2000.

SHIMOYAMA, M. Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukaemia lymphoma: a report from the Lymphoma Study Group (1984-87). **British Journal of Haematology**, Oxford, v.79, p.428-437, 1991.

SHIRDEL, A. et al. Association of IL-10 Gene Polymorphisms and Human T Lymphotropic Virus Type I-Associated Myelopathy/tropical Spastic Paraparesis in North-East of Iran (Mashhad). **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, Mashhad, v. 16, n. 3, p. 258-263, 2013.

SHOIEBI, A. et al. Clinical features of HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in northeast Iran. **Acta Neurologica Belgica**, Milão, v. 113, n. 4, p. 427-433, 2013.

SILVA-MATA, M. C. F. et al. The Duffy null genotype is associated with a lower level of CCL2, leukocytes and neutrophil count but not with the clinical outcome of HTLV-1 infection. **Journal of Medical Microbiology**, London, v.66, p.1207–1212, 2017.

SONNENBERG, G.F.; NAIR, M.G.; KIRN, T.J. et al. Pathological versus protective functions of IL-22 in airway inflammation are regulated by IL-17A. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.207, p.1293-1305, 2010.

SOUZA-MACHADO, A. et al. Imunopatogênese da infecção pelo HTLV-1: influência sobre a resposta imune Th2. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, São Paulo, v.26, n.4, p.159-167, 2003.

STARLING, A.L.B. et al. Cytokines, chemokines and leukotrienes profile and signature analysis in HTLV-1 infection as an evidence of disease progression. **Retrovirology**, London, v. 11, n. 1, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4044697/>>. Acesso em: 4 jan. 2019.

STARNES, T. Cutting Edge: IL-17F, a Novel Cytokine Selectively Expressed in Activated T Cells and Monocytes, Regulates Angiogenesis and Endothelial Cell Cytokine Production. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v.167, p.4137-4140, 2001.

STARNES, T. et al. Cutting Edge: IL-17D, a Novel Member of the IL-17 Family, Stimulates Cytokine Production and Inhibits Hemopoiesis. **The Journal of Immunology**, Baltimore, n.169, p.642-646, 2002.

SUGATA, K. et al. HTLV-1 Viral Factor HBZ Induces CCR4 to Promote T-cell Migration and Proliferation. **Cancer Research**, Chicago v.76, n.17, p.5068-5079, 2016.

SUGITA, et al. Role of IL-22 and TNF- α Producing Th22 Cells in Uveitis Patients with Behçet's Disease. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v.190, n.11, p.5799-5808, 2013.

- SUTTON, C.; BRERETON, C.; KEOGH, B. et al. A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v.7, p.1685-1691, 2006.
- SWAIMS, A. Y. et al. Immune activation induces immortalization of HTLV-1 LTR-Tax transgenic CD4⁺ T cells. **Blood**, New York, v.116, p.2994-3003, 2010. Disponível em: <<http://www.bloodjournal.org/content/116/16/2994/tab-figures-only>>. Acesso em: 17 out. 2017.
- TAKAMOTO, T. et al. HTLV-I-infected T cells activate autologous CD4⁺ T cells susceptible to HTLV-I infection in a costimulatory molecule-dependent fashion. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v.27, n.6, p.1427-1432, 1997.
- TAKATSUKI, K. Discovery of adult T-cell leukemia. **Retrovirology**, London, v.2, n.16, p.02-16, 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15743528>>. Acesso em: 28 mar. 2015.
- TANAKA, M. et al. Distinct CSF cytokine/chemokine profiles in atopic myelitis and other causes of myelitis. **Neurology**, Hagerstown, v.71, n.13, p.974-981, 2008.
- TANAKA-NAKANISHI, A. et al. HTLV-1 bZIP factor suppresses apoptosis by attenuating the function of FoxO3a and altering its localization. **Cancer Research**, Chicago, v. 74, n. 1, p. 188-200, 2014.
- TATTERMUSCH, S. et al. Systems biology approaches reveal a specific interferon-inducible signature in HTLV-1 associated myelopathy. **PLOS Pathogens**, San Francisco, v.8, n.1, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22291590>>. Acesso em: 25 fev. 2017.
- TAYLOR, G. P. et al. Effect of Lamivudine on Human T-Cell Leuemia Virus Type 1 (HTLV-1) DNA Copy Number, T-Cell Phenotype, and Anti-Tax Cytotoxic T-Cell Frequency in Patients with HTLV-1-Associated Myelopathy. **Journal of Virology**, Baltimore, v.73, n.12, p.10289-10295, 1999.
- THIBODEAU, V. et al. Highly Exposed HIV-1 seronegative Female Commercial Sex Workers sustain in their genital mucosa increased frequencies of tolerogenic myeloid and regulatory T-cells. **Scientific Reports**, London, v.7, 2017.
- TIAN, T. et al. Increased Th22 cells as well as Th17 cells in patients with adult T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdã, v.426, p.108-113, 2013.
- TRIFARI, S.; KAPLAN C.D.; TRAN, E.H. et al. Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17 and T(H)2 cells. **Nature Immunology**, New York, v.10, 864-871, 2009.
- VALLINOTO, A. C. et al. HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis Is Not Associated with SNP rs12979860 of the IL-28B Gene. **Mediators of Inflammation**, Oxford, v. 2015, 804167, 2015.

- VAN DOREEN, S. J. A. **Molecular investigation of the evolutionary history and diversity of primate T-lymphotropic virus types 1 and 3**. 2005. Tese (Doutorado em Integrômica) – Universiteit Utrecht, Utrecht, 2005.
- VARELLA, P.P.V.; FORTE, W.C.N. Citocinas: revisão. **Brazilian Journal of Allergy and Immunology**, São Paulo, v. 24, n. 4, 2001.
- VARMUS, H. Regulation of HIV and HTLV gene expression. **Genes & Development**, New York, n.2, p.1055-1062, 1988.
- VASQUEZ, P. et al. Human T-lymphotropic virus type I: new risk for Chilean population. **Blood**, New York, n.78, p-850-851, 1991.
- VERDONCK, K. et al. Human T-lymphotropic virus 1: recent knowledge about an ancient infection. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, n.7, p.266-281, 2007.
- VERDONCK, K.; GOTUZZO, E. HTLV: revisitando um velho amigo. **Cadernos Hemominas HTLV**. 5 ed. Belo Horizonte: Fundação Hemominas, 2010, v. XV, p.21-29.
- VERONESI, R. Doenças associadas ao HTLV. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Atheneu, 2002. p.422-445.
- WILSON, N.J. et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. **Nature Immunology**, New York, v.8, n.9, p.950-957, 2007.
- WOLFE, D.W. et al. Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 102, n. 22, p. 7994-7999, 2005.
- WOLK, K. et al. IL-22 Increases the Innate Immunity of Tissues. **Immunity**, Cambridge, v.21, n.2, p.241-254, 2004.
- WRIGHT, J. F. et al. Identification of an Interleukin 17F/17A Heterodimer in Activated Human CD4+ T Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.282, p.13447-13455, 2007.
- WRIGHT, J. F. et al. The Human IL-17F/IL-17A Heterodimeric Cytokine Signals through the IL-17RA/IL-17RC Receptor Complex. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v.181, p. 2799-2805, 2008.
- YAMAGUCHI, Y. et al. IL-17B and IL-17C Are Associated with TNF- α Production and Contribute to the Exacerbation of Inflammatory Arthritis. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v.179, p.7128-7136, 2007.
- YAMANO, Y.; SATO, T. Clinical Pathophysiology of Human T-Lymphotropic Virus-Type 1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis. **Frontiers in Microbiology**, Lausana, v.3, 2012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23162542>>. Acesso em: 12 abr. 2018.

YAMANO, Y; COLER-REILLY, A. HTLV-1 induces a Th1-like state in CD4+CCR4+ T cells that produces an inflammatory positive feedback loop via astrocytes in HAM/TSP. **Journal of Neuroimmunology**, Amsterdã, v.15, n.304, p.51-55, 2017.

YAMASHIRO, T. et al. CT scans of the chest in carriers of human T-cell lymphotropic virus type 1: presence of interstitial pneumonia. **Academic Radiology**, Reston, v.19, p.952-957, 2012.

YANG, X.; ZHENG, S.G. Interleukin-22: A likely target for treatment of autoimmune diseases. **Autoimmunity Reviews**, Amsterdã, v.13, p.615-619, 2014.

YAO, Z. et al. Herpesvirus Saimiri Encodes a New Cytokine, IL-17, Which Binds to a Novel Cytokine Receptor. **Immunity**, Cambridge, v.3, p.811-821, 1995b.

YAO, Z. et al. Human IL-17: A Novel Cytokine Derived from T Cells. **The Journal of Immunology**, Baltimore, n.155, p.5483-5486, 1995a.

YASUNAGA, J. et al. Impaired production of naive T lymphocytes in human T-cell leukemia virus type I-infected individuals: its implications in the immunodeficient state. **Blood**, New York, v.97, n.10, 2001. Disponível em: <<http://www.bloodjournal.org/content/97/10/3177>>. Acesso em: 13 nov. 2018.

YOSHIDA, M. Multiple Viral Strategies of HTLV-1 for Dysregulation of Cell Growth Control. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v.19, p.475-496, 2001.

YOSHIDA, M.; MIYOSHI, I.; HINUMA, Y. Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v.79, p.2031-2035, 1982.

ZENG, Z. et al. Upregulation of Circulating PD-L1/PD-1 Is Associated with Poor Post-Cryoablation Prognosis in Patients with HBV-Related Hepatocellular Carcinoma. **PLoS ONE**, San Francisco, v.6, n.9, e23621, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21912640>>. Acesso em: 20 fev. 2015.

ZHANG, L. et al. Increased frequencies of Th22 cells as well as Th17 cells in the peripheral blood of patients with ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. **PLoS One**, San Francisco, v.7, n.4, p.e31000, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22485125>>. Acesso em: 9 fev. 2018.

ZHANG, W. et al. Th17 Cell Frequency and IL-17 Concentration Correlate with Pre- and Postoperative Pain Sensation in Patients With Intervertebral Disk Degeneration. **Orthopedics**, Thorofare, v.37, n.7, p.e685-e691, 2014

ZHANG, J. Paradoxical roles of interferon- γ in autoimmune disease. **Expert Review of Clinical Immunology**, London, v.3, n.1, p.35-38, 2007.

ZHONG, W. IL-22-producing CD4⁺ T cells in the treatment response of rheumatoid arthritis to combination therapy with methotrexate and leflunomide. **Scientific Reports**, London, v.7, 41143, 2017.

APÊNDICE A – QUESTIONÁRIO CLÍNICO

Número Amostra _____ Data da coleta _____ Coletador _____ Recoleta? ()

I - Contato e Identificação

1-Nome: _____

2-Sexo: ()M ()F 3-Cor da Pele (auto classificação) _____

4-Data de nascimento ____/____/____ 5-Idade: _____

6-Endereço: _____ n° _____

Bairro: _____ Cidade: _____ UF: _____

5-Registro HUOC Prontuário n°: _____ Escolaridade - _____

6-Telefone fixo e/ou celular: _____ Email: _____

Primeira consulta: _____ Ano diagnóstico: _____ Idade ao diagnóstico: _____

8-Tempo de diagnóstico da infecção pelo HTLV em anos: _____

II – Dados do paciente

9 - Exames sorológicos:

ELISA: SIM() NAO() NI ()	POS () NEG ()
WB: SIM () NÃO () NI ()	POS () NEG ()
LCR: SIM () NÃO () NI ()	POS () NEG ()
PCR: SIM () NÃO () NI ()	POS () NEG ()

Tipo viral:

1 () 2 () Ind () NP ()

OBS: _____

Obs: 1- por * no exame confirmatório do tipo viral/ 2- local que realizou (Ex. Hemope)/ 3- fazer observação caso esteja no aguardo do exame

10 – Parasitológico de Fezes: ()+ () - (colocar as datas)

Parasitoses: _____

Sumário de Urina: _____

11 - Outros exames importantes (principalmente alterações)

Obs: colocar a data de realização dos exames ou da consulta na qual foi apresentado

12- Presença de Manifestação Clínicas: ()SIM ()NÃO

HAM/TSP: ()SIM ()NÃO DERMATITE: ()SIM ()NÃO UVEITE: ()SIM ()NÃO URO: ()SIM ()NÃO

Obs: colocar a especialidade que deu o diagnóstico.

Critério diagnóstico/escala: _____

Oligossintomático? () SIM ()NÃO

() Impotência () Constipação

Manifestações Neurológicas: _____

Manifestações Urológicas: _____

Outras manifestações clínicas: _____

Doador: ()SIM ()NÃO/ Onde? _____ Encaminhado de: _____

Co-infecção/Outras doenças : _____

Via de infecção: () Vertical () Parenteral () Sexual () NI Obs: _____

Infecção na família: ()SIM ()NÃO Quem? _____

11-Outras observações/ Tratamento _____

APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título da Pesquisa: Avaliação da influência de fatores biológicos relacionados à resposta imune no desfecho clínico da infecção pelo vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV-1/2).

Eu, _____, após ter recebido os esclarecimentos e ciente dos meus direitos, concordo em participar como voluntário do projeto de pesquisa supracitado, sobre a responsabilidade dos pesquisadores Patrícia Muniz Mendes Freire de Moura, Paula Machado Ribeiro Magalhães, ou ainda da aluna do Mestrado de Biologia Celular e Molecular Aplicada do Instituto de Ciências Biológicas / Universidade de Pernambuco. Também autorizo a divulgação e a publicação de toda informação por mim transmitida em publicações e eventos de caráter científico.

Assinando este Termo de Consentimento estou ciente de que:

O objetivo dessa pesquisa é fazer um levantamento das características clínicas e epidemiológicas dos indivíduos com HTLV atendidos neste local, bem como investigar os fatores celulares, genéticos e moleculares no sangue dos pacientes com infecção por HTLV e sua influência na progressão para um quadro sintomático e desenvolvimento de doenças de caráter inflamatório. Assim espera-se entender melhor o rumo da infecção pelo HTLV, para que no futuro seja possível um melhor acompanhamento clínico dos pacientes. Durante o estudo será realizada uma coleta de amostras de sangue, as quais serão processadas e armazenadas, para que possam ser submetidas às diversas técnicas, entre elas PCR em tempo real, citometria de fluxo e ELISA, que permitirão atingir o objetivo pretendido. As informações sócio-demográficas e clínicas serão compiladas através da aplicação de um questionário e por meio da coleta de dados do seu prontuário. Os pacientes que preencherem os critérios de doença poderão ser contatados e convidados a participar de uma segunda etapa, onde haverá uma nova coleta de sangue; os mesmos estarão livres para rejeitar nova participação, sem nenhum constrangimento.

1. Obtive todas as informações necessárias para poder conscientemente decidir sobre a minha participação na referida pesquisa;
2. Estou livre para interromper a qualquer momento minha participação na pesquisa, sem nenhuma forma de prejuízo a esta instituição.
3. Os autores da pesquisa se comprometem a preservar a minha privacidade e me assegurar a confidencialidade dos dados e informações coletadas, garantindo que os resultados obtidos serão utilizados apenas para alcançar os objetivos do trabalho, expostos acima, incluídos sua publicação na literatura científica especializada.
4. Dúvidas ou outras informações posteriores poderão ser obtidas com a equipe da pesquisa nos telefones (81) _____ (81) _____ ou ainda no (81) _____ (ambulatório DIP- HUOC), no endereço R. Arnóbio Marques, 310, Santo Amaro, Recife/PE.
5. Poderei contatar o Comitê de Ética do HUOC para apresentar recursos ou reclamações em relação à pesquisa ou ensaio clínico, o qual tomará as medidas cabíveis. O mesmo está localizado no campus na Rua Arnóbio Marques, 310, Santo Amaro, Recife-PE, CEP: 50100-300 - Telefone 81 _____ / e-mail: cep_huoc.procaprocape@yahoo.com.br

Recife, ___ de _____ de 20 ___.

Voluntário R.G.: _____

Pesquisador



ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA HUOC/PROCAPE

COMPLEXO HOSPITALAR
HUOC/PROCAPE

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

Título da Pesquisa: Avaliação dos fatores biológicos envolvidos na resposta imune em pacientes com infecção pelo vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV-1/2)

Pesquisador: Patrícia Muniz Mendes Freire de Moura

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 16973113.5.1001.5192

Instituição Proponente: FUNDACAO UNIVERSIDADE DE PERNAMBUCO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 416.875

Data da Relatoria: 07/10/2013

Apresentação do Projeto:

A imunopatologia do HTLV não tem sido completamente elucidada, sabe-se que diversos mecanismos contribuem na patogênese, entre eles a carga pró-viral, alterações nas populações de células T e ação das mesmas, o desenvolvimento de autoimunidade, os níveis de citocinas, entre outros. Neste contexto este estudo visa analisar as populações celulares, investigar a frequência de polimorfismos em genes relacionados às moléculas do sistema imune, bem como dosar tais moléculas, relacionando estes fatores biológicos no sangue periférico com o desfecho clínico dos pacientes portadores de HTLV.

Objetivo da Pesquisa:

Análise das populações celulares envolvidas na resposta imune, predominantemente linfócitos, no sangue periférico de portadores de HTLV, estabelecendo as diferenças de perfil celular e molecular entre os indivíduos controle sem infecção, pacientes com manifestações inflamatórias e os pacientes assintomáticos

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Adequados

**COMPLEXO HOSPITALAR
HUOC/PROCAPE**

Continuação do Parecer: 416.875

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante no intuito de compreender mecanismos envolvidos nas manifestações clínicas da infecção pelo HTLV.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos de apresentação obrigatórios adequados

Recomendações:

sem recomendação

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

projeto aprovado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

projeto aprovado

RECIFE, 07 de Outubro de 2013

**Assinador por:
RAQUEL ROFFÉ
(Coordenador)**

Endereço: Rua Arnóbio Marques, 310
Bairro: Santo Amaro CEP: 50.100-130
UF: PE Município: RECIFE
Telefone: (81)3184-1271 Fax: (81)3184-1271 E-mail: cep_huoc.procaprocape@yahoo.com.br

ANEXO B – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES



Comitê de Ética
em Pesquisa

Título do Projeto: "Estudos fenotípicos e funcionais das diferentes subpopulações de linfócitos T na infecção pelos retrovírus humanos HIV-1 e HTLV-1".

Pesquisador responsável: Leila Rodrigues de Mendonça Vieira

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/Fiocruz

Data de apresentação ao CEP: 29/10/2015

Registro no CAAE: 50563115.9.0000.5190

Número do Parecer PlatBr: 1.508.891

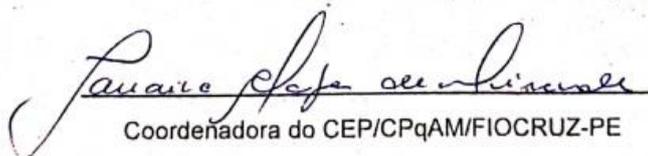
PARECER

O Comitê avaliou e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 466/12, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP.

Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 13 de maio de 2016.


 Coordenadora do CEP/CPqAM/FIOCRUZ-PE


Janaina Campos de Miranda
 Pesquisadora em Saúde Pública
 Coordenadora
 Mat. SIAPE 464777
 CEP / CPqAM / FIOCRUZ

Campus da UFPE - Av. Moraes Rego, s/n
 CEP 50.670-420 Fone: (81) 2101.2639
 Fax: (81) 3453.1911 | 2101.2639
 Recife - PE - Brasil
 comitedeetica@cpqam.fiocruz.br

