



FIOCRUZ

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

INSTITUTO GONÇALO MONIZ

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO CELULAR APÓS INFECÇÃO *IN VITRO* PELO VÍRUS
ZIKA EM INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HTLV-1**

MONIQUE LÍRIO CANTHARINO DE CARVALHO

Salvador – Bahia

2020

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

INSTITUTO GONÇALO MONIZ

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

**AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO CELULAR APÓS INFECÇÃO *IN VITRO* PELO VÍRUS
ZIKA EM INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HTLV-1**

MONIQUE LÍRIO CANTHARINO DE CARVALHO

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Fernanda Rios Grassi

Co- orientadora: Prof^a. Dr^a. Luana Leandro Góis

Dissertação apresentada ao Curso
de Pós-Graduação em
Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa para a obtenção do
grau de Mestre.

Salvador – Bahia

2020

(verso da folha de rosto)

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

C331a Carvalho, Monique Lírio Cantharino de.
Avaliação da ativação celular após infecção *in vitro* pelo vírus zika em indivíduos infectados pelo HTLV-1. / Monique Lírio Cantharino de Carvalho. - 2020.
61 f.: il.; 30 cm.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Fernanda Rios Grassi, Laboratório Avançado em Saúde Pública.
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, 2020.

1. Vírus Zika. 2. HTLV-1. 3. Coinfecção. 4. Ativação celular. I. Título.

CDU 616-022.6

MONIQUE LÍRIO CANTHARINO CARVALHO

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 27 de julho de 2020.

COMISSÃO EXAMINADORA

Valéria de Matos Borges

Dra. Valeria de Matos Borges
Pesquisadora
IGM/FIOCRUZ

Natalia Barbosa Carvalho

Dra. Natalia Barbosa Carvalho
Professora Associada
UFBA

Theolis Costa Barbosa Bessa

Dra. Theolis Costa Barbosa Bessa
Pesquisadora
IGM/FIOCRUZ

FINANCIAMENTO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

Comunidade Européia ZIKAlliance

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB)

Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz)

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Fernanda Grassi, pelas oportunidades em diversas etapas da minha formação acadêmica desde a iniciação científica até a orientação neste estudo;

À minha coorientadora, Dra Luana Gois, pela paciência em me ensinar princípios e conceitos de áreas tão distintas das que atuo profissionalmente.

À Dra Sílvia Sardi e ao Dr Gúbio Soares, pela generosa colaboração neste estudo e por cada ensinamento recebido;

Ao Dr. Bernardo Galvão pela oportunidade de trabalhar no Centro de HTLV e poder compreender um pouco da realidade daqueles que são o objetivo maior de cada pesquisa: os pacientes;

E a eles, meus queridos pacientes, agradeço a confiança e parceria;

À toda equipe do Centro de HTLV, e em especial ao colaborador e amigo Nofilson Lázaro e ao Dr Evérton Baptista;

A todos os profissionais e estudantes do LASP, em especial, Dr Gabriel Queiroz, Dr Carlos Silva, à ex-aluna e hoje biomédica, Jaqueline Gomes, à aluna Mariana Drummond e às colaboradoras Rita e Jurema;

Ao Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz/Fiocruz e a pesquisadores desta instituição que deram contribuições fundamentais para o desenvolvimento deste estudo: Dr Lucas Carvalho, Dr Ricardo Khouri, Dra Dalila Zanette, Ellen Pimentel, Marie Laurence e Fábio Carvalho;

Aos colaboradores da Biblioteca do IGM pelo suporte e disponibilidade e em especial a Sra. Ana Fiscina pela cuidadosa revisão deste manuscrito;

A Deus pela oportunidade de viver e vencer desafios;

À minha família, fonte de força, acolhimento e aconchego. Em especial aos meus pais, Washington e Carmen, por me ensinarem a trilhar o caminho do estudo, do esforço e por me encherem de amor;

A Thiago, por ser o par que escolheu continuar trilhando este caminho junto comigo, pelo amor, companheirismo, paciência, apoio e pelo incansável incentivo;

Aos hoje, parceiros de trabalho, e há muito, profissionais tão importantes na minha formação: Dr Marcio Oliveira, Dra Ana Verena Mendes, Dra Silviana Ultchak, Dra Lis Moreno, Dra Maria Goreth Barberino, Dr Fábio Amorim, Dr Julio Sampaio e Dra Maria Luisa Gonçalves pela compreensão e apoio em mais esta etapa da minha formação.

À amiga, parceira de disciplinas do mestrado, da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública e de tantas oportunidades felizes que tivemos de trabalhar juntas, MSc Viviane Ferreira;

Ao querido amigo e biomédico Dr Pedro Paulo Carneiro pela gentileza e solicitude em ajudar nas diversas vezes que precisei;

A todos aqueles cujos nomes não estão aqui citados, mas que muito ajudaram pelo simples fato de serem amigos, colegas solícitos, profissionais comprometidos.

Meus sinceros agradecimentos a cada um!

“Recria tua vida, sempre, sempre.
Remove pedras e planta roseiras e faz doces.
Recomeça”.

(Cora Coralina)

CARVALHO, Monique Lírio Cantharino de. Avaliação da ativação celular após infecção *in vitro* pelo vírus zika em indivíduos infectados pelo HTLV-1. 2020. 60 f. Dissertação (Mestrado Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2020.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A linfoproliferação espontânea, elevação de carga proviral e produção de citocinas pró-inflamatórias são marcadores imunológicos associados à ativação celular em indivíduos infectados pelo HTLV-1. Tais alterações estão associadas a disfunção do sistema imune e ao desenvolvimento de diversas doenças inflamatórias e infecciosas. O vírus Zika (ZIKV) foi identificado no Brasil em 2015 e se tornou um problema de saúde pública devido a sua associação com complicações neurológicas. Pouco ainda é conhecido sobre a resposta imune ao ZIKV, especialmente em indivíduos com co-infecções virais crônicas. É possível que a infecção aguda pelo ZIKV aumente a ativação celular em indivíduos infectados pelo HTLV-1, podendo influenciar no desfecho clínico e progressão para doenças associadas a ambos os vírus.

Objetivo: O presente estudo avaliou os efeitos da infecção *in vitro* pelo ZIKV na ativação celular em pacientes infectados pelo HTLV-1. **MÉTODOS:** Células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes infectados por HTLV-1 e controles sadios foram infectadas por ZIKV. A confirmação da infecção foi realizada por RT-PCR e Triplex Real Time RT-PCR. A linfoproliferação e o fenótipo celular foram avaliados por citometria de fluxo, a produção de citocinas foi determinada por ELISA e RT-PCR e a carga proviral do HTLV-1 foi quantificada por RT-PCR. **RESULTADOS:** Foram incluídos vinte indivíduos infectados pelo HTLV-1, 10 assintomáticos e 10 com HAM/TSP. Seis indivíduos não infectados foram incluídos como controles. A presença de ZIKV no sobrenadante da cultura foi detectada em 8 dos 12 indivíduos com HTLV-1 e em todos os indivíduos controles. Não houve aumento da produção de citocinas inflamatórias ou de IL-10 nos sobrenadantes das culturas na presença de ZIKV. A expressão gênica de IL-1 beta e TNF- α foi estatisticamente maior após 18h de cultura na presença de ZIKV no grupo de indivíduos infectados pelo HTLV-1 com diagnóstico de HAM/TSP. Em relação a carga proviral do HTLV-1, houve um aumento significativo nos níveis na presença do ZIKV. **CONCLUSÃO:** A infecção *in vitro* pelo ZIKV induziu a aumento da ativação celular com maior produção de citocinas inflamatórias e aumento da carga proviral.

Palavras chaves: Vírus Zika, HTLV-1, coinfeção, ativação celular.

CARVALHO, Monique Lírio Cantharino de. Evaluation of cell activation after *in vitro* infection by the Zika virus in individuals infected with HTLV-1. 2020. 60 f. Dissertação (Mestrado e Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2020.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Spontaneous lymphoproliferation, increased proviral load and production of proinflammatory cytokines are immunological markers associated with cell activation in individuals infected with HTLV-1. Such changes are associated with dysfunction of the immune system and associated with the development of various inflammatory and infectious diseases. Zika virus (ZIKV) was identified in Brazil in 2015 and has become a public health problem due to its association with neurological complications. Little is known about the immune response to ZIKV, especially in individuals with chronic viral co-infections. It is possible that acute ZIKV infection increases cell activation in individuals infected with HTLV-1, which may influence the clinical outcome and progression to diseases associated with both viruses. **OBJECTIVE:** The present study evaluated the effects of *in vitro* ZIKV infection on cell activation in patients infected with HTLV-1. **METHODS:** Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients infected with HTLV-1 and healthy controls were infected with ZIKV. The infection was confirmed by RT-PCR and Triplex Real Time RT-PCR. Lymphoproliferation and cell phenotype were evaluated by flow cytometry, cytokine production was determined by ELISA and RT-PCR and HTLV-1 proviral load was quantified by RT-PCR. **RESULTS:** Twenty individuals infected with HTLV-1 were included, 10 asymptomatic and 10 with HAM / TSP. Six uninfected individuals were included as controls. The presence of ZIKV in the culture supernatant was detected in 8 of the 12 individuals with HTLV-1 and in all control subjects. There was no increase in the production of inflammatory cytokines or IL-10 in culture supernatants in the presence of ZIKV. Gene expression of IL-1 beta and TNF- α was statistically higher after 18h of culture in the presence of ZIKV in the group of individuals infected with HTLV-1 diagnosed with HAM / TSP. Regarding the HTLV-1 proviral load, there was a significant increase in levels in the presence of ZIKV. **CONCLUSION:** *In vitro* ZIKV infection induced an increase in cell activation with greater production of inflammatory cytokines and increased proviral load.

Keywords: Zika virus, HTLV-1, co-infection, cell activation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Disseminação global do Zika vírus a partir de 2007.....	23
Figura 2 - Mortalidade em PBMC, linfócitos e monócitos infectados por ZIKV.....	30
Figura 3 – Avaliação da susceptibilidade de monócitos e linfócitos T à infecção por ZIKV.....	32
Figura 4 – Sequência para avaliação por citometria de fluxo para cálculo da proliferação espontânea de linfócitos pelo CFSE em pacientes com HTLV-1.....	34
Figura 5 - Demonstração da infecção por ZIKV	43
Figura 6 – Caracterização das subpopulações de linfócitos T em resposta à infecção por ZIKV em indivíduos saudáveis e com HTLV.....	44
Figura 7 – Caracterização das subpopulações de monócitos em resposta à infecção por ZIKV em indivíduos saudáveis e com HTLV	44
Figura 8 – Produção de citocinas no sobrenadante das culturas em resposta à infecção por ZIKV	46
Figura 9 - Expressão gênica de citocinas em resposta à infecção por ZIKV após 18h.....	48
Figura 10 – Avaliação da carga proviral do HTLV-1 em resposta à infecção por ZIKV.....	49

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Características Clínicas e Demográficas dos Indivíduos do Estudo..... 41
- Tabela 2** – Mortalidade em Células Mononucleares do Sangue Periférico infectados por ZIKV em diferentes tempos e multiplicidade de infecção.....42
- Tabela 3** – Proliferação Espontânea de Linfócitos pelo CFSE em Pacientes com HTLV-145

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	Aloficocianina
APC-Cy7	Aloficocianina-Cy7
BSA	Albumina sérica bovina
CBA	<i>Cytometric bead array</i> (ensaio com esfera de citometria)
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CEDAP	Centro Estadual Especializado Assistência, Diagnóstico e Pesquisa do estado da Bahia
CHTLV	Centro de HTLV
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HTLV	Vírus T-linfotrópico Humano
IFN- γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
mL	mililitros
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell (Células mononucleares do sangue periférico)
PBS	Tampão fosfato salino
PE	Ficoeritrina
PE-Cy7	Ficoeritrina-Cy7

PI	Iodeto de Propídio
SFB	Soro fetal bovino
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
Th1	Linfócitos T CD4 ⁺ <i>helper</i> (auxiliar) do tipo 1
Th2	Linfócitos T CD4 ⁺ <i>helper</i> (auxiliar) do tipo 2
TLR	Receptores semelhantes ao <i>Toll</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
μL	microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	155
2	REVISÃO DA LITERATURA	177
2.1	ESTRUTURA E EPIDEMIOLOGIA DO HTLV-1.....	177
2.2	ALTERAÇÕES IMUNOLÓGICAS INDUZIDAS PELA INFECÇÃO PELO HTLV-1	188
2.3	DOENÇAS ASSOCIADAS AO HTLV-1	199
2.4	EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO POR ZIKA VÍRUS.....	24
2.5	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E COMPLICAÇÕES DA INFECÇÃO POR ZIKA VÍRUS	233
2.6	PATOGÊNESE E RESPOSTA IMUNE.....	244
2.7	ASSOCIAÇÃO ENTRE HTLV-1 E O VÍRUS ZIKA.....	Error! Bookmark not defined. 4
3	OBJETIVOS	267
3.1	OBJETIVOS GERAIS.....	27
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
4	CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS:	277
4.1	DESENHO DO ESTUDO	277
4.2	ÁREA E POPULAÇÃO DO ESTUDO	278
4.3	CULTURA E EXPANSÃO DO ZIKV	288
4.4	TITULAÇÃO DO ZIKV	288
4.5	OBTENÇÃO DE PMBC.....	298
4.6	INFECÇÃO IN VITRO PELO ZIKV	29
4.7	AVALIAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS E MONÓCITOS EM RESPOSTA AO ZIKV	30
4.8	ENSAIO DE LINFOPROLIFERAÇÃO.....	33
4.9	EXTRAÇÃO DE RNA	344

4.10	EXTRAÇÃO DE DNA	3554
4.11	PCR CONVENCIONAL.....	366
4.12	PCR EM TEMPO REAL	377
4.13	ELISA	399
4.14	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	40
4.15	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	40
5	RESULTADOS	411
5.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	41
5.2	DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE TEMPO E MULTIPLICIDADE ÓTIMA DE INFECÇÃO (TOI E MOI) EM PBMC	41
5.3	INFECÇÃO DAS PBMC POR ZIKV	42
5.4	CARACTERIZAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T E MONÓCITOS EM RESPOSTA À INFECÇÃO POR ZIKV	43
5.5	AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS T.....	45
5.6	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS NO SOBRENADANTE DAS CULTURAS EM RESPOSTA À INFECÇÃO POR ZIKV	45
5.7	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE CITOCINAS EM RESPOSTA À INFECÇÃO POR ZIKV.....	475
5.8	AVALIAÇÃO DA CARGA PROVIRAL DO HTLV-1 EM RESPOSTA À INFECÇÃO POR ZIKV	48
6	DISCUSSÃO	50
7	CONCLUSÕES.....	Error! Bookmark not defined.4
8	PERSPECTIVAS.....	54
	REFERÊNCIAS.....	55

1. INTRODUÇÃO

A infecção pelo Vírus Linfotrófico de Célula T Humana do tipo 1 (HTLV-1) está associada a diversas patologias. O HTLV-1 foi inicialmente descrito agente etiológico da leucemia/linfoma de células T do adulto (ATL) (HINUMA et al., 1981) e da mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP) (GESSAIN, A. et al., 1985a; OSAME et al., 1986). Além destas duas patologias classicamente descritas, um número crescente de trabalhos tem evidenciado que o HTLV-1 também se encontra associado com a patogênese de doenças infecciosas e parasitárias, além de processos inflamatórias como uveíte (YAKOVA et al., 2005), síndrome de Sjögren (QUARESMA et al., 2015), alveolite linfocítica (CASKEY et al., 2007) e artrite (GUERIN et al., 1995; YAKOVA et al., 2005).

Por seu caráter sistêmico, alguns autores propõem o conceito de síndrome para as manifestações resultantes da infecção pelo HTLV-1, que tem como mecanismo fisiopatológico a ativação celular crônica, caracterizada por linfoproliferação espontânea (ASQUITH et al., 2007), produção de citocinas pró-inflamatórias (CARVALHO, et al., 2001) e aumento da carga proviral (GESSAIN, et al., 1990; OLINDO et al., 2005). Tal estado de ativação pode induzir um grau de imunossupressão. Mesmo na ausência de proliferação linfocitária espontânea pode ser encontrada uma disfunção imune, mostrada pela redução significativa de resposta específica aos antígenos de memória, como PPD, candidina, toxoide tetânico e citomegalovírus (MASCARENHAS et al., 2006).

Uma maior morbidade e mortalidade associadas doenças infecciosas como tuberculose (DE LOURDES BASTOS et al., 2009; GRASSI et al., 2016; MARINHO et al., 2005; PEDRAL-SAMPAIO et al., 1997; VERDONCK et al., 2007), hanseníase (BRITES et al., 2002), dermatite infectiva (BLATTNER et al., 1990) e infecções por *Strongyloides stercoralis* (CARVALHO, e DA FONSECA PORTO, 2004; HIRATA et al., 2006) já foram descritas. Dessa forma, são importantes estudos que avaliem co-infecções associadas ao HTLV-1.

O vírus Zika (ZIKV) é um Flavivírus, que foi identificado no Brasil em 2015 (CAMPOS, et al., 2015). O ZIKV tornou-se um problema significativo de saúde pública devido a sua associação com complicações neurológicas, incluindo microcefalia (BRASIL et al., 2016) e a Síndrome de Guillain-Barré (ARAUJO et al., 2016; CAO-LORMEAU et al., 2016). Não há

nenhum tratamento ou vacina atualmente disponíveis específicos para o ZIKV e muito pouco se sabe sobre a resposta imune ou como a imunidade se desenvolve. Estudos recentes sobre a resposta imune na infecção pelo ZIKV evidenciam elevações significativas das concentrações de IL-1 β , IL-2, IL-6, IFN- γ , entre outras, em indivíduos saudáveis (TAPPE et al., 2016).

É necessário caracterizar a infecção aguda pelo ZIKV em indivíduos coinfectados HTLV-1, uma vez que se trata de uma população cujo sistema imune é cronicamente ativado, com um grau de imunossupressão e predisposição ao desenvolvimento e/ou formas mais graves de diversas doenças infecciosas, além de serem duas doenças sexualmente transmissíveis. Nossa hipótese é que a infecção aguda pelo ZIKV pode aumentar ativação celular em células infectadas pelo HTLV-1, com maior produção de citocinas pro-inflamatórias e aumento da carga proviral. A linfoproliferação, por envolver células de memória, pode não sofrer alterações na fase aguda, entretanto, é um marcador importante de progressão de doença.

Neste estudo piloto, células monocucleares do sangue periférico (PBMC) de indivíduos com e sem infecção pelo HTLV-1 foram avaliados os efeitos da infecção *in vitro* pelo ZIKV na produção de citocinas pró-inflamatórias e regulatórias, no fenótipo celular de linfócitos e monócitos, proliferação de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ e carga proviral.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ESTRUTURA E EPIDEMIOLOGIA DO HTLV-1

O Vírus Linfotrópico de Célula T Humana do tipo 1 (HTLV-1) é um retrovírus envelopado incluído na família *Retroviridae*, sub-família *Oncovirinae*, gênero Delta-vírus e foi o primeiro retrovírus identificado (POIESZ et al., 1980). Seu genoma possui duas fitas de RNA simples envolvidas por um envelope viral e sua estrutura genética consiste em três genes estruturais clássicos similares à dos demais retrovírus, sendo estes: *gag* (grupo antígeno específico do core), *pol* (polimerase) e *env* (envelope) (KOHTZ et al., 1988). O HTLV-1 apresenta também uma região pX - que codifica proteínas acessórias e regulatórias. As proteínas regulatórias são Tax, Rex e HBZ (KOHTZ et al., 1988).

Como outros retrovírus, o genoma proviral do HTLV-1 possui genes estruturais, *gag*, *pol* e *env* flanqueados por repetições terminais longas em ambas as extremidades. O genoma do HTLV-1 também contém uma região codificada por vários genes acessórios, incluindo o fator básico de zíper de leucina (HBZ) (MATSUOKA e JEANG, 2007). Além disso, o HTLV-1 expressa uma proteína transativadora da transcrição, Tax, que induz a expressão de vários genes celulares.

O HTLV-1 infecta cerca de 5 a 10 milhões de pessoas no mundo (GESSAIN e CASSAR, 2012) com maior prevalência nas ilhas do Sudeste do Japão (cerca de 20% da população está infectada), na África Equatorial, América Central e América do Sul (MUELLER, 1991).

No Brasil, estudos prévios evidenciaram que as prevalências variavam de acordo com a região estudada, de 0,08% no Sul do País até 1,76% em Salvador-Bahia (DOURADO et al., 2003). Recentemente, um estudo (PEREIRA et al., 2019) avaliou a prevalência da infecção pelo HTLV-1 na Bahia e encontrou uma prevalência de casos de 14,4 por 100.000 habitantes. Três microrregiões apresentaram taxas maiores que 20 casos positivos para HTLV / 100.000 habitantes: Barreiras (24,83 casos por 100.000 habitantes), Salvador (22,90 casos por 100.000 habitantes) e Ilhéus-Itabuna (22,60 casos por 100.000 habitantes) (PEREIRA et al., 2019).

2.2 ALTERAÇÕES IMUNOLÓGICAS INDUZIDAS PELA INFECÇÃO PELO HTLV-1

O HTLV-1 infecta preferencialmente linfócitos T CD4+, resultando em uma infecção crônica com um longo período de latência clínica que cursa com elevada proliferação linfocitária espontânea. Estima-se que indivíduos infectados por este vírus produzam, a cada ano, 10^{12} linfócitos a mais que indivíduos sadios não infectados (ASQUITH et al., 2007). Esta alteração representa um dos principais mecanismos para a manutenção da infecção, uma vez que novas células infectadas originam-se principalmente da divisão mitótica de células infectadas, embora exista a sinapse virológica que propicia a disseminação da infecção através da transferência de partículas virais no contato célula-célula (MAJOROVITS et al., 2008).

Expressões aumentadas de mediadores imunológicos críticos contribuem diretamente para a ativação e proliferação celular observada em pacientes com HAM / TSP, sugerindo que as respostas imunes ativadas cronicamente fundamentam a patogênese desse distúrbio (MATSUURA et al., 2010).

As proteínas virais Tax e HBZ tem sido envolvidas na patogênese da infecção pelo HTLV-1. O aumento da expressão da Tax induz a expressão de vários genes celulares, como IL-2 e IL-15, o que contribui diretamente para a ativação e imunopatogênese de linfócitos em pacientes com HAM / TSP. O mecanismo molecular e celular da HBZ no desenvolvimento de HAM / TSP é menos conhecido, mas tem sido relatado que a expressão de mRNA de HBZ foi detectada em pacientes com HAM / TSP em maior proporção do que em portadores assintomáticos e correlacionada com carga proviral e gravidade da doença. Ao contrário da Tax, a HBZ escapa das respostas imunes antivirais eficazes e, portanto, essas reatividades são difíceis de detectar (ENOSE-AKAHATA et al., 2017).

As células infectadas pelo HTLV-1 sofrem desregulação do ciclo celular, resistência a apoptose e indução autócrina e parácrina da secreção de IL-2 e seu receptor IL-2R, bem como aumento na secreção de outras citocinas. Estas alterações são mediadas primariamente pela ação transativadora da proteína TAX, que ativa um grande número de genes virais e do hospedeiro. Com sua ação transativadora, a TAX modula a transcrição do genoma viral e de diversos genes celulares do HTLV, incluindo as sequências para IL-2, IL-13, IL-15, IL-2R, fator estimulador de colônia de granulócitos e monócitos (GM-CSF), fator de necrose tumoral (TNF-alfa), entre

outros, além de induzir a proliferação espontânea dos linfócitos T (AZRAN et al., 2004). causando HBZ contribui para a transformação e proliferação celular, modulando a expressão de genes virais e do hospedeiro. HBZ suprime a expressão de Tax e a expressão de seu RNA mensageiro aumenta a expressão de genes incentivando assim a proliferação de células T (MESNARD et al., 2006).

Um dos efeitos da permanência do HTLV-1 nas células é a ativação do sistema imune. Ocorre um aumento da expressão de marcadores de ativação nas populações de linfócitos T CD4+ e T CD8+ (BRITO-MELO et al., 2002). Os linfócitos T apresentam uma maior expressão de moléculas de ativação como CD25 e HLA-DR e alterações na expressão de moléculas co-estimulatórias, como CD28. Além disso, observam-se altas concentrações de citocinas pró-inflamatórias, ou que induzem a proliferação de linfócitos, como IL-2, TNF- α , IFN γ , IL-6, IL-1 e IL-15, tanto em pacientes com HAM/TSP, quanto em indivíduos assintomáticos (CARVALHO, et al., 2001). A resposta imune protetora dirigida contra o vírus é mediada pelos linfócitos T citotóxicos que eliminam parte das células infectadas mantendo estável a carga proviral do HTLV-1 (vírus integrado ao genoma) (BANGHAM e OSAME, 2005). O distúrbio imunológico secundário à infecção pelo HTLV-1 também interfere na resposta imune contra outros agentes infecciosos. Por exemplo, a grande produção de IFN- γ observada na infecção pelo HTLV-1 pode modular negativamente a resposta Th2 a outros antígenos (HIRATA et al., 2006). Já foi evidenciado que indivíduos infectados pelo HTLV-1 apresentam, *in vitro*, uma menor resposta aos antígenos de memória em comparação a controles sadios (MASCARENHAS et al., 2006).

2.3 DOENÇAS ASSOCIADAS AO HTLV-1

O HTLV-1 causa um amplo espectro de doença abrangendo desde portadores assintomáticos (cerca de 45%) a indivíduos com doenças inflamatórias, oncológicas e infecciosas, com diferentes prevalências (GESSAIN e CASSAR, 2012). Dentre as patologias classicamente associadas, estão a leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL) (SEIKI et al., 1984), a mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP) (GESSAIN, et al., 1985b) e uveíte associada ao HTLV (MOCHIZUKI et al., 1992). Entretanto, apenas 5-10% dos indivíduos infectados desenvolverão estas patologias (HOLLSBERG et al., 1993; UCHIYAMA et al., 1977). Além disso, encontra-se associado com a patogênese de outras

doenças, como artrites (GUERIN et al., 1995; YAKOVA et al., 2005), dermatite infectiva (LAGRENADE et al., 1990), pneumonite linfocítica (SETOGUCHI et al., 1991) e outros processos imunomediados como a Síndrome de Sjögren ou síndrome seca (HAJJAR et al., 1995).

A primeira doença de progressão rápida associada ao HTLV-1 foi a leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL) (HINUMA et al., 1981). A probabilidade de um indivíduo infectado desenvolver ATL é de 1-5% e sua maior incidência acontece a partir da terceira década de vida, entre os 40-70 anos (MURPHY et al., 1989).

A paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV (HAM/TSP), uma mieloneuropatia progressiva é caracterizada por lesão inflamatória e desmielinizante dos neurônios motores longos da medula e os sintomas desta doença aparecem entre a quarta e a quinta década de vida (GESSAIN et al., 1985b; OSAME et al., 1986).

Além disso, a infecção pelo HTLV-1 está associada a uma variedade de manifestações neurológicas e articulares, que podem ocorrer em pacientes que não desenvolveram mielopatia, como parestesias em mão ou pé, artralgia, noctúria e disfunção erétil (CASKEY et al., 2007; VERDONCK e GOTUZZO, 2012). A infecção pelo HTLV-1 pode ainda estar associada a condições inflamatórias como uveíte (MOCHIZUKI et al., 1992), síndrome de Sjögren (QUARESMA et al., 2015), alveolite linfocítica (CASKEY et al., 2007) e artrite (GUERIN et al., 1995; YAKOVA et al., 2005).

Um número crescente de evidências tem sugerido que a infecção pelo HTLV-1 pode causar algum grau de imunossupressão, ocorrendo nos indivíduos infectados uma maior frequência diversas doenças infecciosas, além de apresentações mais graves de algumas delas. Infecções de pele de caráter recidivante como dermatofitoses (GONÇALVES et al., 2003) e dermatite infectiva (BLATTNER et al., 1990), um quadro de eczema crônico associado a infecções por *Staphylococcus aureus* e/ou *Streptococcus β -hemolítico*, tem sido associada ao HTLV-1. A escabiose, parasitose causada pelo ácaro *Sarcoptes scabiei*, também apresenta maior frequência nos portadores de HTLV-1 e há descrição de maior incidência da sua forma disseminada, a Sarna Norueguesa (BRITES et al., 2002; GONÇALVES et al., 2003).

É bem descrita, a associação entre HTLV-I e infecções por *Strongyloides stercoralis* (CARVALHO e DA FONSECA PORTO, 2004; HIRATA et al., 2006), com maior frequência

desta helmintíase e a evolução para forma disseminada e de difícil tratamento desta doença (DE SOUZA et al., 2018). Além disso, alguns estudos demonstraram um risco maior para o desenvolvimento de tuberculose em indivíduos infectados pelo HTLV-1 (DE LOURDES BASTOS et al., 2009; GRASSI et al., 2016; MARINHO et al., 2005). Observou-se também uma maior mortalidade por esta patologia na co-infecção HTLV-1/*Mycobacterium tuberculosis* (33%), quando comparada à tuberculose isolada (13%) (PEDRAL-SAMPAIO et al., 1997). Estudos experimentais evidenciaram uma menor resposta linfoproliferativa (MASCARENHAS et al., 2006) e produção de TNF- α , IL-1 β , e IL-17 (CARVALHO et al., 2015) após estimulação de células mononucleares do sangue periférico com antígenos micobacterianos em indivíduos infectados com HTLV-1. Além disso, outro estudo mostrou que a Tuberculose pode influenciar o desenvolvimento de HAM / TSP, e os pacientes com essas duas doenças apresentam comprometimento na modulação da resposta imune celular (SOUZA et al., 2017).

Pouco se sabe a respeito da co-infecção entre o HTLV-1 e outros vírus. Dentre estes, a co-infecção mais estudada é a pelo HIV / HTLV-1 que está associada à progressão acelerada para a AIDS e a piores resultados de infecções oportunistas relacionadas ao HIV (GUDO et al., 2009). Além disso, em comparação com indivíduos infectados apenas com HIV, indivíduos co-infectados com HIV / HTLV-1 apresentam maior produção de citocinas pró-inflamatórias, principalmente IL-2 e INF- γ , sugerindo que complicações cardiovasculares e metabólicas mediadas pela ativação imune crônica podem ser mais pronunciadas entre indivíduos co-infectados (ABRAHÃO et al., 2012).

Desfechos clínicos contraditórios no curso da co-infecção com HTLV / HCV foram relatados no Brasil e no Japão. Um melhor prognóstico foi descrito em indivíduos brasileiros co-infectados que apresentaram níveis mais elevados de citocinas do tipo Th1 e linfócitos T CD4 +, bem como menos fibrose hepática (ABAD-FERNÁNDEZ et al., 2015; SILVA et al., 2016). Por outro lado, um estudo japonês envolvendo indivíduos co-infectados descreveu cargas virais mais altas, uma progressão mais rápida para carcinoma hepatocelular e diminuição da resposta ao tratamento com interferon (AXLEY et al., 2018; STUVER et al., 1996).

Nas últimas décadas, tem crescido o número de surtos por doenças infecciosas, principalmente virais, em todo o país. Pouco se sabe a respeito da resposta imune e diferenças nos desfechos clínicos destas doenças em indivíduos com HTLV-1. Devido a esta predisposição a

doenças infecciosas, associada a uma resposta imune cronicamente ativada, são importantes estudos que avaliem a associação entre HTLV-1 e doenças infecciosas endêmicas ou emergentes, sobretudo em locais em que haja alta prevalência de HTLV-1.

Recentemente, o ZIKV tornou-se um problema significativo de saúde pública devido a sua associação com complicações neurológicas, incluindo microcefalia (BRASIL et al., 2016) e a Síndrome de Guillain-Barré (ARAUJO et al., 2016; CAO-LORMEAU et al., 2016). A associação entre HTLV-1 e a infecção pelo ZIKV não foi relatada em estudos prévios.

2.4 EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO POR ZIKA VÍRUS

O Zika vírus (ZIKV) é um vírus de RNA de cadeia simples da família *Flaviviridae*, que inclui vários outros vírus transmitidos por mosquitos de importância clínica, a exemplo do vírus da Dengue e da febre amarela. O primeiro relato de infecção pelo ZIKV foi descrito em 1947 a partir de um macaco rhesus febril na Floresta Zika localizada em Uganda e posteriormente identificado em mosquitos *Aedes africanus* da mesma floresta (DICK, 1952). Historicamente, infecções pelo ZIKV sintomáticas eram limitadas a casos esporádicos. Esse padrão mudou em 2007, quando o primeiro grande surto ocorreu em Yap (Micronésia) (DUFFY et al., 2009). Desde então, a infecção pelo vírus Zika espalhou-se rapidamente, com ocorrência de surtos na Polinésia Francesa (ROTH et al., 2014), Ilhas Cook (ROTH et al., 2014), Ilha de Páscoa (TOGNARELLI et al., 2016) e Nova Caledônia (DUPONT-ROUZEYROL et al., 2015).

Em Março de 2015, o Brasil relatou os primeiros casos de ZIKV (CAMPOS, Gubio S. et al., 2015), com mais de 90 mil indivíduos infectados em um ano. Desde então, a doença espalhou-se pelas Américas com registro em pelo menos 20 países (PETERSEN et al., 2016).



1. **Figura 1** - Disseminação global do Zika vírus a partir de 2007.

1.Uganda; 2. Nigéria; 3. Paquistão, Índia, Malásia e Indonésia; 4.Yap e Micronésia; 5.Polinésia Francesa; 6 – Brasil; 7 – Estados Unidos, Alemanha e Dinamarca).Fonte: Zika: the origin and spread of a mosquito-borne vírus (WHO, 2016).

Na Bahia, nos primeiros meses de 2015, Campos et al. (CAMPOS et al., 2015) identificou, pela primeira vez, a circulação do ZIKV no Brasil e na América Latina. Neste mesmo período, a presença do ZIKV (caso autóctone) na Bahia foi confirmada por centros de referência em virologia brasileira. Desde então, casos autóctones de ZIKV foram detectados em todas as regiões do Brasil (CAMPOS et al., 2016).

2.5 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E COMPLICAÇÕES DA INFECÇÃO POR ZIKA VÍRUS

O quadro clínico da infecção pelo ZIKV varia de quadros autolimitados, semelhantes a infecções por outros arbovírus, com febre, artralgia, mialgia, fadiga, cefaleia e exantema (BAUD et al., 2017) a quadros neurológicos graves como a síndrome de Guillain-Barré (SGB) e anomalias fetais e neonatais do sistema nervoso central (SNC) (ARAÚJO et al., 2016).

2.6 PATOGÊNESE E RESPOSTA IMUNE

A patogênese da infecção por ZIKV ainda é pouco compreendida. A entrada do vírus na célula humana provavelmente se assemelha ao de outros flavivírus, ocorrendo a partir da pele através de receptores celulares, com posterior migração para os gânglios linfáticos e corrente sanguínea (HAMEL et al., 2015). Os fibroblastos de pele humana, queratinócitos e células dendríticas imaturas também permitem a entrada dos ZIKV (HAMEL et al., 2015).

Já em relação ao tropismo celular, o ZIKV é capaz de infectar diversos tipos, incluindo, células da placenta, trofoblastos, endotélio, células neuronais, células progenitoras neurais e neurônios maduros, o que o difere de outros flavivírus (MINER e DIAMOND, 2017). Em neurônios maduros, o mimetismo molecular entre os glicolipídeos e moléculas de superfície de agentes infecciosos podem justificar a maioria dos casos de síndrome de Guillain-Barre precedidas por infecção (CAO-LORMEAU et al., 2016), enquanto a toxicidade direta do ZIKV em células neurais imaturas tem sido levantada como o principal mecanismo pelo qual ZIKV induz microcefalia (CALVET et al., 2016). Em um estudo utilizando linhagem neuronal progenitora, o vírus foi capaz de induzir apoptose e autofagia (SOUZA et al., 2016).

Pouco ainda é conhecido a respeito da resposta imune e influência do status imunológico do hospedeiro. Sabe-se que as células mononucleares do sangue periférico (PBMC) desempenham um papel fundamental nas respostas imunes do hospedeiro no início de infecções por arbovírus. Embora não sejam células alvo, estes leucócitos infectados podem funcionar como "cavalos de Tróia" e transportar os vírus para espaços protegidos pelo sistema imunológico, incluindo a placenta, os testículos e o cérebro (MICHLMAYR et al., 2017).

Já foi evidenciado que os monócitos podem desempenhar um papel patogênico na infecção por flavivírus e outros vírus, contribuindo para a propagação da infecção direta ou indiretamente. Em modelos animais de infecção pelo HIV e Vírus do Oeste do Nilo, ocorre transmissão para o SNC através da infiltração de monócitos infectados através da barreira hematoencefálica (GARCIA-TAPIA et al., 2006). Além disso, monócitos infectados pelo HIV e células T também podem disseminar a infecção através da barreira sangue-testículo, resultando em transmissão sexual do HIV através do esperma infectado (MICHLMAYR et al., 2017). Uma vez que o ZIKV também é transmitido sexualmente, os leucócitos infectados poderiam ser o

veículo para transportar vírus através da barreira hemato-testicular. Na infecção pelo ZIKV, os monócitos são um dos primeiros alvos infectados no sangue periférico e desempenham um papel fundamental durante a fase aguda, como destacado pelos altos níveis de GM-CSF, CCL2 e IL-8, produzidos logo após a infecção (MAUCOURANT et al, 2019).

Os linfócitos também parecem desempenhar um papel importante, com ativação polifuncional de células T (resposta Th1, Th2, Th9 e Th17) durante a fase aguda caracterizada por aumentos nos respectivos níveis de citocinas como IL - 1 β , IL-6, IL-13, IL-17, seguidos por uma diminuição na fase convalescentem (TAPPE et al., 2016).

Até o momento, não há nenhum tratamento ou vacina específicos para o ZIKV e muito pouco se sabe sobre a resposta imune ou como a imunidade se desenvolve. Estudos recentes sobre a resposta imune na infecção pelo ZIKV, em indivíduos saudáveis, evidenciam elevações significativas da concentração de citocinas pro-inflamatórias como de IL-1 β , IL-2, IL-6, e IFN- γ (TAPPE et al., 2016).

Por se tratar de um vírus recentemente identificado no Brasil, os efeitos na resposta imune durante a coinfeção ZIKV e HTLV-1 não são conhecidos. Em pessoas vivendo com HIV em uso de terapia antirretroviral, com controle imunológico e virológico, as manifestações clínicas e laboratoriais da infecção por ZIKV são similares às aquelas observadas em indivíduos com a mesma doença, mas com sorologia negativa para HIV (CALVET et al., 2018). O impacto clínico em pessoas vivendo com HTLV-1, vírus para o qual não há terapia antirretroviral, as consequências da infecção pelo ZIKV podem ser distintas. É possível que indivíduos coinfectados HTLV-1, cujo sistema imune é cronicamente ativado, com um grau de imunossupressão apresentem resposta imune ao ZIKV diferente de indivíduos saudáveis, com maior produção de citocinas pró-inflamatórias. É importante ainda conhecer as subpopulações celulares envolvidas na resposta imune e os efeitos e marcadores de progressão de doença nos indivíduos com HTLV-1 como carga proviral e proliferação celular.

O presente estudo avaliou os efeitos da infecção *in vitro* pelo ZIKV em células mononucleares do sangue periférico. Especificamente, foram avaliados os efeitos da infecção na produção de citocinas pró-inflamatórias e regulatórias, carga proviral, subpopulações de linfócitos T e monócitos e proliferação de linfócitos.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da infecção *in vitro* pelo ZIKV na ativação celular em indivíduos infectados pelo HTLV-1.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar a frequência das subpopulações linfócitos e monócitos na presença do ZIKV;
- 2) Avaliar a proliferação de linfócitos T na presença do ZIKV;
- 3) Determinar o perfil de produção de citocinas, em resposta à infecção pelo ZIKV;
- 4) Quantificar a carga pro-viral do HTLV-1 em resposta à presença do ZIKV.

4. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo piloto, experimental, para avaliar os efeitos da infecção *in vitro* pelo ZIKV na ativação celular em PMBC de indivíduos infectados pelo HTLV-1.

Foram avaliados os seguintes grupos:

- Grupo 1: Pacientes infectados pelo HTLV-1 assintomáticos para HAM/TSP;
- Grupo 2: Pacientes infectados pelo HTLV-1 com HAM/TSP;
- Grupo 3: Controles não infectados por HIV e HTLV-1, saudáveis

4.2 ÁREA E POPULAÇÃO DO ESTUDO

Trata-se de uma amostra não probabilística em que os participantes foram sequencialmente selecionados no ambulatório de HTLV (CHTLV) da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP), em Salvador, Bahia. Os critérios de inclusão foram: pacientes infectados pelo HTLV-1 (confirmados por ELISA e Western Blot), sem história prévia de infecção por ZIKV. O diagnóstico de HAM/TSP foi definido segundo os critérios de Castro-Costa (DE CASTRO-COSTA et al., 2006). Foram excluídos do estudo indivíduos com infecções oportunistas em atividade e em uso de corticoide. Foram incluídos como controles doadores de sangue saudáveis provenientes da Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia (HEMOBA). O estudo experimental foi realizado no Laboratório Avançado de Saúde Pública (LASP), da Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia.

4.3 CULTURA E EXPANSÃO DO ZIKV

A cultura do ZIKV (GenKBanK KU940228), isolado a partir do soro de um paciente portador do vírus no estado da Bahia, Brasil (CAMPOS, Gubio S. et al., 2015), foi mantida em células de linhagem C6/36 originadas do mosquito *Aedes Albopictus*, as quais são importantes para a replicação de espécies do gênero Flavivírus. Estas células foram cultivadas a 28°C e 0% CO₂ em meio Leibovitz L15 (ThermoFisherScientific), suplementado com 5% de soro bovino fetal (ThermoFisherScientific) e 10% de caldo fosfato triptose (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

4.4 TITULAÇÃO DO ZIKV

Células VERO foram distribuídas em placas de 96 poços na densidade de 1×10^4 células/poço, 24h antes da infecção com o vírus. Após a formação de monocamada celular, os vírus foram descongelados e uma diluição seriada (10^{-1} a 10^{-8}) foi realizada em 10 replicatas para cada diluição.

Foram colocados 50 µl de cada diluição nos respectivos poços e as células foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ para promover a adsorção e penetração viral no tempo 60-90 minutos. Após este período, foram adicionados 50 µl de meio DMEM a 2% SFB em cada poço, e novamente as células foram incubadas por 5 dias para observação de efeitos citopáticos,

os quais foram quantificados para determinação de título viral de acordo com o método de Reed e Muench (REED e MUENCH, 1938). A titulação de vírus infecciosos obtida a partir da cultura de células VERO produziu um valor de 10^6 TCID₅₀/mL. Esta etapa foi realizada em colaboração com o Laboratório de Virologia do ICS-UFBA.

4.5 OBTENÇÃO DE PMBC

Para obtenção de PMBC dos indivíduos com HTLV-1, coletou-se a amostra sanguínea por punção venosa em um tubo contendo heparina em etapa única. PMBC dos controles não infectados foram obtidas a partir de bolsas *Buffy Coat*. As células foram separadas por gradiente de densidade, utilizando-se o reagente Ficoll-Hypaque (densidade 1,077g/mL) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri - EUA).

Inicialmente realizou-se a separação e remoção do plasma. A fração celular do sangue foi diluída 1:3 (v/v) em tampão fosfato pH 7,5 (PBS, 1X). Foram adicionados 1/3 do volume de Ficoll-Hypaque em tubos de polipropileno de 15 mL. O sangue diluído em PBS 1X foi adicionado delicadamente sobre o Ficoll. Realizou-se uma centrifugação a temperatura ambiente e com desaceleração nula, a 1800 rpm durante 28 minutos. Após esse processo, foi coletado, utilizando-se uma pipeta pasteur, o anel de PMBC formado entre o Ficoll e o PBS. O anel foi então transferido para outro tubo de polipropileno, e submetido a três lavagens com cerca de 10 mL de PBS (1X), e centrifugação a 1500 rpm por 10 minutos. O pellet de PMBC formado durante a centrifugação foi ressuspenso em 1 mL de meio RPMI. Por fim, realizou-se a contagem e avaliação da viabilidade celular em câmara de Neubauer com o corante azul de Tripán.

4.6 INFECÇÃO *IN VITRO* PELO ZIKV

Inicialmente, para determinação das melhores condições de cultivo, PMBC indivíduos sadios na concentração de 10^6 /mL foram cultivados em meio RPMI completo suplementado com SFB 5% na presença de diluições seriadas do ZIKV (TCID₅₀ 10^6 /ml) com multiplicidade de infecção (MOI) variando de 0,01 a 1. Após inoculação do ZIKV, as células eram incubadas por 1 hora em estufa de CO₂ a 37°C com meio RPMI sem SFB e a seguir era realizada uma lavagem

com 1 mL de PBS (1X) para retirar o vírus que não se adsorveu. A seguir, as células eram ressuspendidas em meio RPMI completo suplementado com SFB 5% e mantidas em estufa de CO₂ a 37°C. As células foram incubadas por 24h, 48h e 7 dias (tempo de infecção, TOI). Para avaliação de viabilidade celular, as células foram marcadas com iodeto de propídio e adquiridas no FACSFortessa (Figura 2).

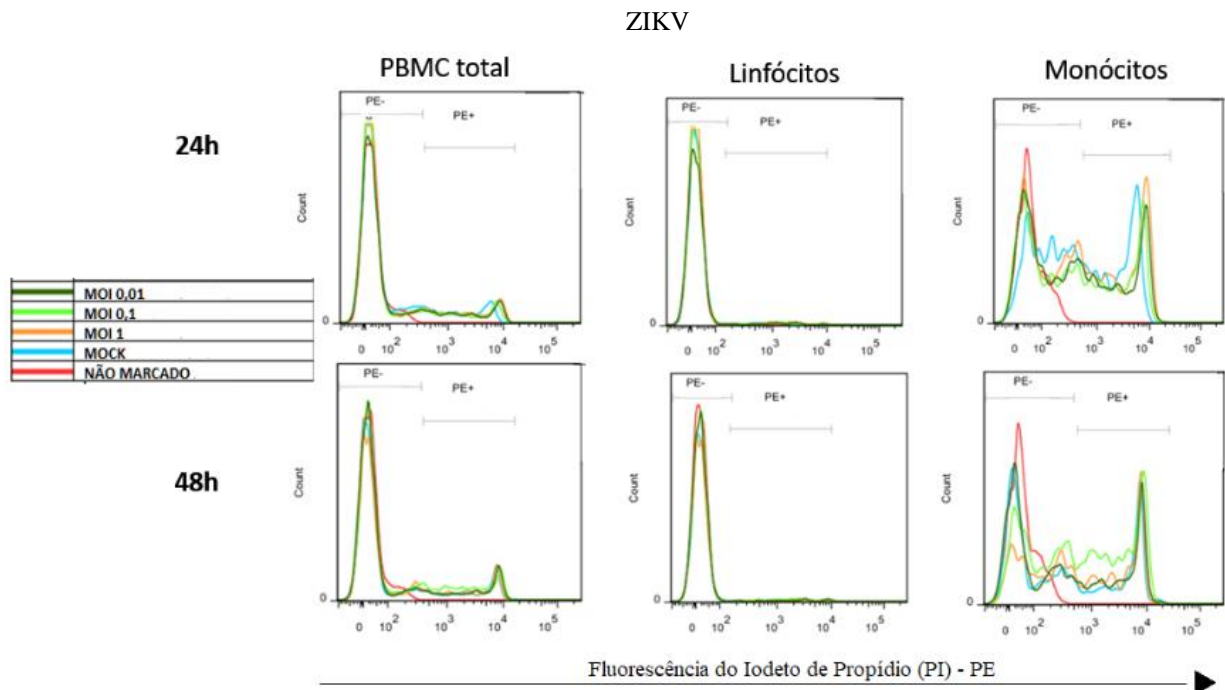
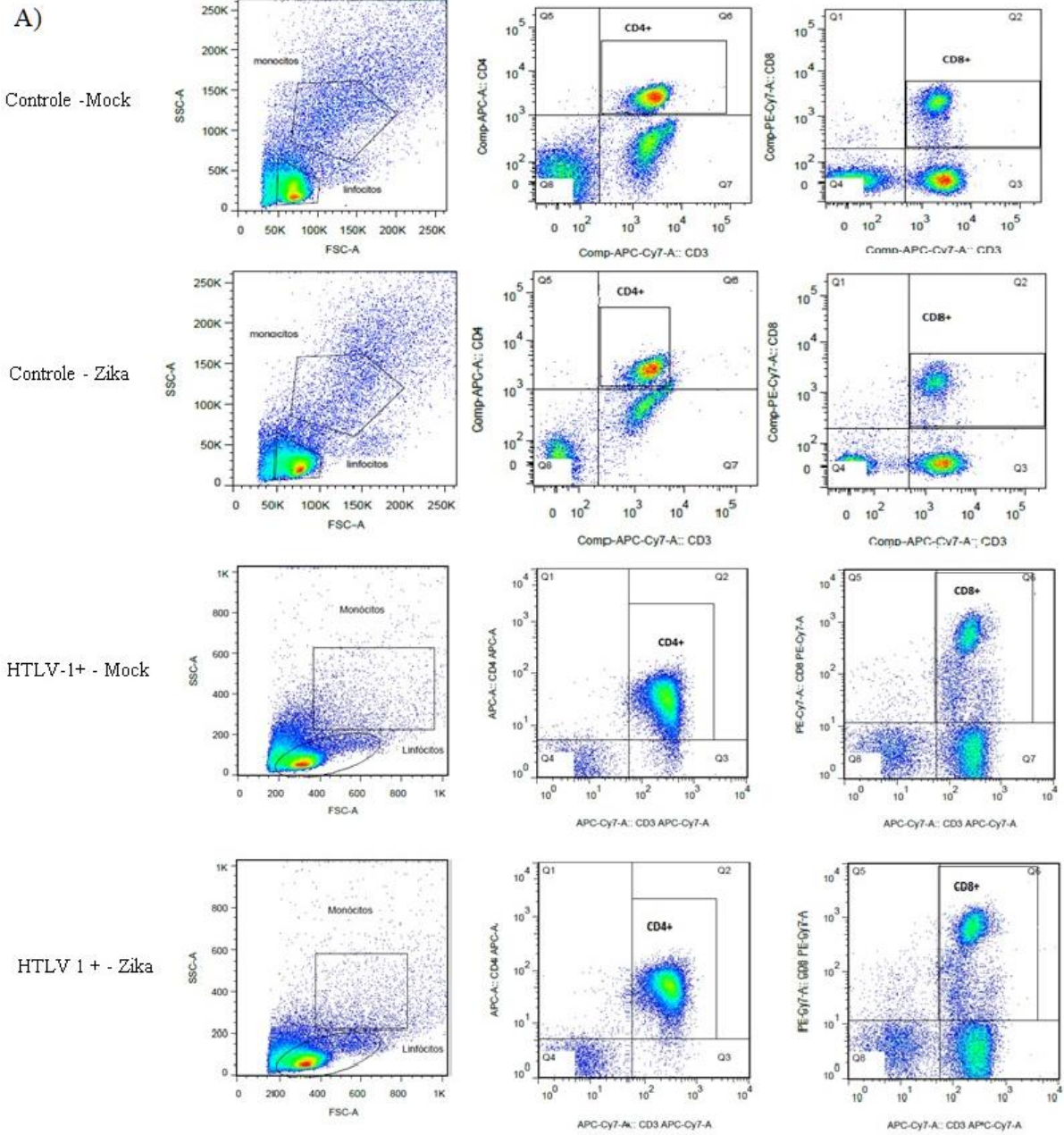


Figura 2 – Mortalidade em PBMC, Linfócitos e Monócitos Infectados por ZIKV

Mortalidade, avaliada por iodeto de propídio (PI), das células mononucleares do sangue periférico (PBMC), linfócitos e monócitos infectados *in vitro* por ZIKV em diferentes valores de multiplicidade de infecção (MOI 0,01, MOI 0,1 e MOI 1) e tempo de infecção (TOI 24h e TOI 48h). Os gráficos apresentam a sobreposição dos histogramas da frequência de células marcadas com PI (mortas) nos diferentes MOI e TOI.

4.7 AVALIAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS E MONÓCITOS EM RESPOSTA AO ZIKV

Após a cultura, as PBMC foram lavadas e marcadas com anticorpos monoclonais anti-CD4-APC, anti-CD8-PE-Cy7, anti-CD3-APC-Cy7, anti-CD14-FITC, anti-CD16-Alexa 700. As PBMC foram adquiridas no FACSFortessa e avaliadas com o software FlowJo™ (Figura 5).



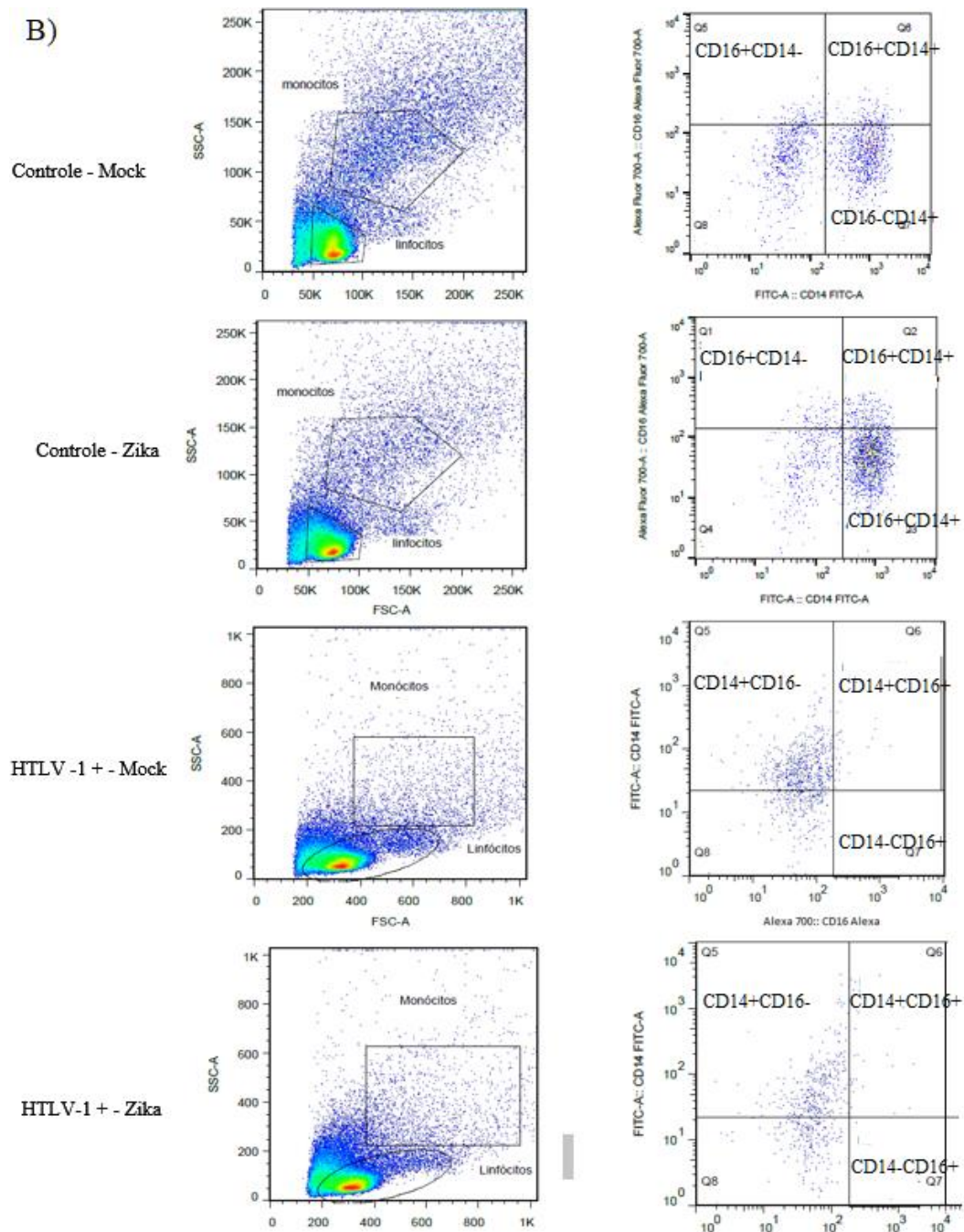


Figura 3 – Sequência para avaliação por citometria das subpopulações de linfócitos T (A) e monócitos (B).

Linfócitos e monócitos selecionados por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), com o software FlowJo™. A) Linfócitos subdivididos de acordo com a presença de com anticorpos monoclonais anti-CD4 e anti-CD8. B) Monócitos subdivididos de acordo com a presença de com anticorpos monoclonais anti-CD14 e anti-CD16.

4.8 ENSAIO DE LINFOPROLIFERAÇÃO

Para avaliar a proliferação de PBMC dos indivíduos infectados pelo HTLV-1, as células foram marcadas antes da cultura com CarboxyFluorescein diacetate Succinimidyl Ester (CFSE) - (Invitrogen, CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit C34554), de acordo com as instruções do fabricante. A carboxifluoresceína diacetate succinimidyl ester (CFSE) é um reagente incolor não fluorescente, que possui grupos acetatos que ao serem clivados intracelularmente formam grupos éster altamente fluorescentes. O grupo succinimidyl ester reage com as aminas intracelulares, formando conjugados fluorescentes que são bem conservados. O excesso de reagentes não conjugados e subprodutos são difundidos de forma passiva para o meio extracelular, onde podem ser lavados. A fluorescência que se forma nas células marcadas é mantida durante o desenvolvimento celular e meiose e podem ser usados para detecção. A marcação é herdada pelas células-filhas após uma divisão celular e não é transferida para células adjacentes em uma população.

As células foram mantidas em cultura por 5 dias. Para avaliar a proliferação das subpopulações de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺, foram adicionados anticorpos anti-CD3-APC-Cy7, anti-CD4APC e anti-CD8PE-Cy7. As células foram fixadas em 300 µL de solução de PBS/BSA 0,2%/Formaldeído 1% por 20 min em temperatura ambiente ao abrigo da luz e mantidas à 4°C até à leitura no FACSFortesa. Os resultados foram analisados com o FACSFortesa e avaliadas com o software FlowJo™ (Figura 4). O programa FlowJo fornece os índices utilizados para avaliação da proliferação espontânea das células marcadas com CFSE, sendo o índice de divisão celular, o parâmetro utilizado neste estudo. O índice de divisão celular é a média do número de divisões celulares que as células sofreram, ignorando as células que permanecem na geração zero, ou seja, não dividiram. O *cut off* adotado para definição de proliferação celular foi de índice de divisão > 0,05 (PINTO et al., 2011).

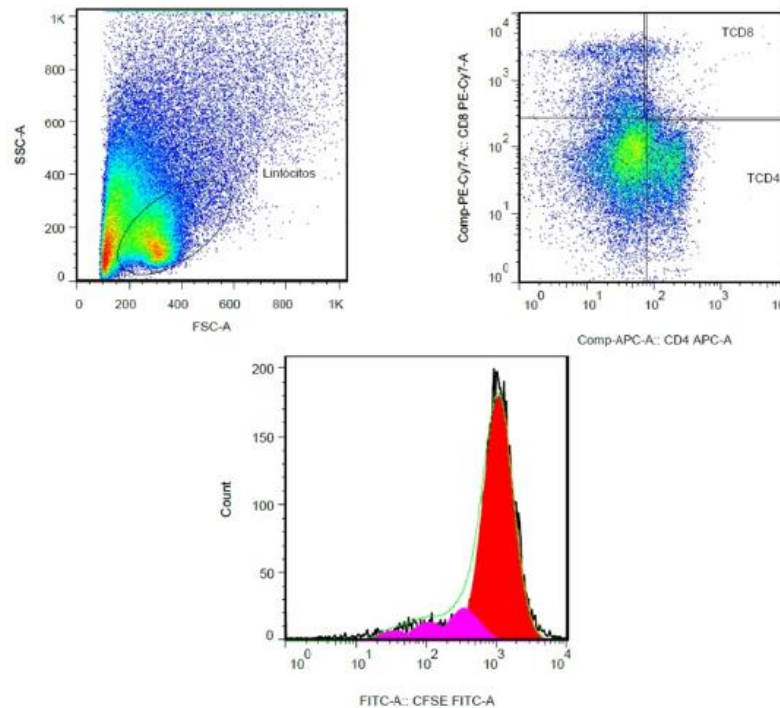


Figura 4 – Sequência para avaliação por citometria de fluxo para cálculo da proliferação espontânea de linfócitos pelo CFSE em pacientes com HTLV-1.

Células marcadas com CFSE e analisadas pelo programa FlowJo™. Acima: População de linfócitos selecionados para análise, por tamanho (FSC) e granulocidade (SSC) e subdivididos de acordo com a presença de com anticorpos monoclonais anti-CD4 e anti-CD8. Abaixo: Pico ou geração zero representando células que não proliferaram (em vermelho) e gerações de células (em rosa). Cada geração representa uma divisão celular.

4.9 EXTRAÇÃO DE RNA

Para confirmação da infecção em monócitos/macrófagos após 7 dias de cultivo, a extração do RNA viral (RNA_v) foi realizada utilizando o kit de extração QIAamp Viral RNA mini kit (QIAGEN, Alemanha), seguindo-se as instruções do fabricante.

Para detecção do ZIKV no sobrenadante das culturas após 48h de cultivo, o RNA total foi isolado usando o Kit de Purificação de RNA Total Maxwell® 16 (Promega), configurado com o hardware de baixo volume de eluição, conforme instruções do fabricante. O Maxwell® 16 Instrument é fornecido com procedimentos de purificação pré-programados e utiliza cartuchos de reagentes pré-filtrados. O kit contém todos os reagentes necessários em um formato conveniente de cartucho pré-carregado. O protocolo simples envolve três etapas principais. Primeiro, o

tampão de lise e a proteinase K são misturados para preparar uma solução de lise. Em segundo lugar, a solução de lise é misturada com a amostra. Em terceiro lugar, o lisado é adicionado aos cartuchos. Ácidos nucleicos virais purificados estão prontos para análise em aproximadamente 45 minutos.

Para avaliação da expressão gênica de citocinas após 12h e 18h de cultivo do PBMC infectado por ZIKV, o RNA total foi isolado a partir de PBMC usando o kit RNeasy Mini Kit – QIAGEN® de acordo com as instruções do fabricante. As concentrações de RNA foram medidas por Espectrofotometria NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, Wilmington, DE) e integridade do RNA foi avaliada usando um sistema Agilent 2200 TapeStation com RNA ScreenTape (Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

4.10 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA a partir de células PBMC infectadas por ZIKV foi realizada pelo kit Purification and Extraction DNA GFX Column (Amersham Pharmacia) após 48h de cultivo, seguindo as instruções do fabricante. Às alíquotas contendo 10^6 células, foram adicionados 500 μ L de solução de extração, misturada por vórtex e incubada por 5 minutos à temperatura ambiente. A mistura foi transferida para a coluna GFX e centrifugada a 5.000 rpm por 1 minuto à temperatura ambiente. A solução foi desprezada, e a coluna, recolocada no tubo. Mais uma vez, adicionaram-se 500 μ L de solução de extração à coluna GFX e centrifugou-se por 1 minuto a 5.000 rpm à temperatura ambiente. Descartou-se a solução esvaziando o tubo de coleta e colocou-se a coluna no tubo de coleta novamente. Adicionaram-se 500 μ L de solução de lavagem e centrifugou-se por 3 minutos a velocidade total. O tubo de coleta foi descartado, e a coluna GFX, transferida para um novo tubo de estéril. Acrescentaram-se 200 μ L de água bidestilada e autoclavada à coluna GFX, incubou-se a temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugou-se por 1 minuto a 5.000 rpm à temperatura ambiente. A coluna GFX foi descartada, e o tubo contendo o DNA extraído, armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.11 PCR CONVENCIONAL

Para confirmação da infecção de monócitos por ZIKV, a reação de transcriptase reversa (RT) foi utilizado o RNA_v extraído (8µl) e uma reação contendo: 10mM Tris-HCl, pH 8.3; 50mM KCl; 1.5mM MgCl₂, 5mM ditioneitol; 10mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP) e 2.5 U da enzima Super Script II (Super Script II Transcriptase Reversa – Invitrogen, EUA), seguindo protocolo do fabricante. O experimento foi realizado em cultura de macrófagos obtidos por adesão após 7 dias da infecção *in vitro*. O produto cDNA foi submetido a RT-PCR como descrito por Balm et al 2012 (BALM et al., 2012) utilizando os iniciadores ZIKVF 9027 e ZIKV 9197 que codificam para a região genômica de NS5 obtendo um fragmento de 192 pares de bases. A presença deste fragmento foi considerada como indicativo da presença de ZIKV. Os produtos do PCR foram analisados em gel de agarose a 2% submetido em brometo de etídio (10 µg/ml) por 20 minutos, e a visualização dos fragmentos amplificados ocorreu sob luz ultravioleta.

DNA extraído para avaliação da carga proviral do HTLV-1 inicialmente foi submetido à PCR qualitativa, realizada em duas etapas de amplificação. Para o HTLV-1, na primeira amplificação, os seguintes primers foram utilizados: SK110-pol: 5' – CCC TAC AAT CCA ACC AGC TCA G – 3' e SK44-tax: 5' – GAG CCG ATA ACG CGT CCA TCG – 3' e na segunda amplificação: SK248-env: 5' – CTA GTC GAC GCT CCA GGA TAT GAC C – 3' e SK249-env: 5' – CAG ACC GCC ACC GGT ACC GCT CGG C – 3'. A mistura da reação de amplificação para o HTLV-1 com volume final de 20 µl continha Tris-HCl 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, 5 pmol de cada primer, 0,2 mM de dNTP (concentração final de 200 µmols para cada dnucleotídeo), 0,5 U de Taq DNA Polimerase e 2 µl do DNA extraído do indivíduo.

A primeira amplificação teve um protocolo de ciclagem: 95°C por 7 minutos (desnaturação), 95°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos e 55°C por 1,5 minutos e, por fim, uma extensão de 10 minutos a 72°C. Já na segunda amplificação, foi utilizada a mesma mistura de reação, trocando-se apenas os primers a serem usados e acrescentando-se os 2 µL do amplicon da primeira amplificação, diluído na proporção 1:100, seguindo-se uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C, 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos e 58°C por 1 minuto, seguido de uma extensão de 10 minutos a 72°C (LEE et al., 2004). O produto esperado era de 466 pb. A quantificação foi realizada a seguir por PCR em tempo real.

4.12 PCR EM TEMPO REAL

A detecção do ZIKV foi realizada no sobrenadante das culturas celulares após 48h de cultivo utilizando-se o kit qRT-PCR Trioplex Real-time RT-PCR Assay CDC com SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase. Este ensaio destina-se à detecção e diferenciação qualitativa de RNA do vírus Zika, vírus da dengue e Chikungunya e segue PCR em tempo real convencional (SANTIAGO et al., 2018). O DNA complementar (cDNA) é transcrito reversamente do RNA viral presente na amostra e amplificado por PCR. As sondas de hidrólise marcadas com fluoróforos ligam-se ao fragmento alvo de DNA amplificado e a intensidade do sinal fluorescente é capturado por um instrumento de PCR em tempo real: (ABI 7500 fast Dx (ThermoFisher). A amplificação do alvo é interpretada a partir do aumento exponencial na fluorescência por ciclo de amplificação em contrato para sinal de fundo.

O conjunto de primers específicos para o ZIKV foi projetado para atingir o gene do envelope do genótipo asiático (LANCIOTTI et al., 2008), e a sonda é rotulada com Cal fluor red 610 (Texas Red) na extremidade 5' e extinto pelo BHQ-2 no final 3'. O RT-PCR multiplex em tempo real a reação é montado misturando 10 µl de RNA da amostra com 12,5 µl de PCR master mix buffer de reação (SuperScript III ou qScript), primers específicos para o vírus a uma concentração de 1 µM, até uma concentração final de 0,15 µM, e água livre de nuclease até volume de reação de 25 µL em uma placa de PCR óptica de 96 poços. Da mesma forma, o singleplex reação de RT-PCR em tempo real é montado com os mesmos componentes mencionados acima nas mesmas concentrações, mas compensando com água sem nucleasse atingir o volume final de reação de 25 µl.

Os protocolos de termocilagem foram como segue: transcrição reversa (RT) a 55 ° C por 30 min, inativação de RT a 95 ° C por 2 min (SuperScript III), a detecção de fluorescência a 95 ° C por 15 s, e anelamento a 60 ° C por 1 min. Este ensaio também inclui um controle interno reação que tem como alvo a ribonuclease endógena humana P (RP), que é usada para certificar-se de que a amostra de teste extraída contém RNA amplificável. A reação RP ocorre separadamente em formato simples com o mesmo RNA da amostra e com oligonucleotídeos que foram publicados anteriormente (SANTIAGO et al., 2013). Curvas de amplificação foram avaliadas

com a linha limite foi colocada acima sinal de fundo aberto na fase inicial da fase exponencial da curva. A posição da linha de limite é colocada individualmente para cada vírus alvo e o ponto (ciclo) em que a curva de amplificação interseca a linha limite é referida como o valor threshold cycle (CT).

Os dados do ensaio Trioplex foram interpretados para uma amostra com o vírus alvo da seguinte forma:

CT <38 e CT de reação RP < 38 é considerada positiva

CT ≥ 38 e CT com reação RP < 38 é considerada negativa

CT <38 e CT com reação RP ≥ 38 é considerada positiva

CT ≥ 38 e CT com reação RP ≥ 38 é considerada inválida.

Já para a avaliação da expressão gênica de citocinas após 12h e 18h de cultivo do PBMC com ZIKV, o qPCR foi executado em um sistema de PCR em tempo real StepOnePlus™ (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) usando TaqMan Master Mix Universal para PCR e TaqMan Gene Expression Assays para IL-1β, IFN-γ, TNF-α, TGF-β e IL -10. As condições de amplificação foram as seguintes: 2 min a 50°C e 10 min a 95°C no holding state, e depois 40 ciclos de 15 seg a 95 °C e 1 min a 60 °C. A expressão gênica nas amostras foi representada como as razões entre os níveis de amplificação dos genes e os níveis do gene de controle endógeno GAPDH, usado como uma normalização fator (Hs02758991_g1 para GAPDH, Applied Biosystems). Esta razão foi então normalizada para a relação obtida nas amostras de controle (nível de expressão relativa), que foi calculada usando a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$, usando GAPDH como controle endógeno para normalizar o carregamento da amostra, conforme descrito em literatura (PFAFFL, 2001). Cada amostra normal foi utilizada como referência para sua contraparte infectada. Resumidamente, a média dos valores de Ct cycle threshold) das repetições foram calculados e normalizados, subtraindo o valor Ct do gene de controle endógeno co-amplificado para produzir um valor ΔCt . O ΔCt número de amostras de controle (1X amostra) foi subtraído do ΔCt das amostras infectadas para produzir um valor $\Delta\Delta Ct$. A quantidade de gene alvo, normalizado a um controle endógeno e relativo a uma referência foi convertida em quantificação

relativa pela fórmula: $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Para comparação entre os grupos, foi calculada a média do ΔCt dos controles em cada grupo e a partir desta, calculados o $\Delta\Delta Ct$ e $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

A quantificação da carga proviral do HTLV-1 foi realizada por PCR em tempo real, inicialmente foi estabelecida uma curva-padrão. O plasmídeo para construção da curva-padrão utilizada no experimento é um clone com dupla inserção, contendo uma porção do íntron 12 do gene da albumina e a região pol do genoma do HTLV-1, contida entre as posições 4.708 e 4.953 (DEHÉE et al., 2002). Para quantificação do HTLV-1, todas as amostras foram amplificadas em duplicata, utilizando-se os seguintes primers (DEHEE et al., 2002): SK110-pol: 5′- CCC TAC AAT CCA ACC AGC TCA G – 3′ SK111-pol: 5′- GTG GTG AAG CTG CCA TCG GGT TTT – 3′ e para quantificação do gene da albumina nas amostras, também todas as amostras foram amplificadas em duplicata, utilizando-se os seguintes primers (DEHÉE et al., 2002): Alb-S: 5′- GCT GTC ATC TCT TGT GGG CTG T – 3′ Alb-AS: 5′- AAA CTC ATG GGA GCT GCT GGT T – 3′.

A mistura da reação usada nas duas reações utilizou 2 μ L do DNA, 10 μ M de cada primer e SYBR® Green Master Mix, em um total de 25 μ L de reação. Tanto o HTLV-1 quanto a albumina seguiram o seguinte protocolo de amplificação: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C; 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 65°C (45 ciclos) e foram amplificados paralelamente no Rotor Gene 3000 (Corbett Life Science). A quantificação da carga proviral de HTLV-1 foi calculada segundo a seguinte fórmula: (média do número de cópias de HTLV-1/10⁶ células PBMC da albumina) x 2 x 10⁶ e expressa em número de cópias/10⁶ células PBMC.

4.13 ELISA

A quantificação de citocinas produzidas e secretadas (IFN γ , IL-1- β , IL-10, TNF- α , TGF- β) durante 48h de cultivo foi realizada no sobrenadante da cultura pelo método imunoenzimático (ELISA) utilizando-se “kit” comercial (BD Biosciences, San Diego, CA) seguindo as recomendações do fabricante. Resumidamente, as placas 96 poços Nunc Maxisorp (Nunc/Apogent, USA) foram sensibilizadas com um anticorpo monoclonal de captura específico para cada citocina e incubadas *overnight* em temperatura ambiente. Após incubação, as placas

foram bloqueadas com Reagente Diluente (1% BSA em PBS pH 7.4) em temperatura ambiente por 1 hora. Após o bloqueio, os sobrenadantes (50ul/poço) foram adicionados à placa e incubados em temperatura ambiente por duas horas. Após esse período, as placas foram incubadas com anticorpo de detecção por duas horas em temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se Streptavidina por 20 minutos em temperatura ambiente. Entre cada etapa foram realizadas três lavagens com tampão de lavagem (Tween 0,05% em PBS pH 7.4). A reação foi revelada com uma solução de substrato enzimático (TMB) e interrompida com uma solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄). A placa foi lida a 450 nm, utilizando um espectofotômetro, e os resultados foram expressos em pg/ml.

4.14 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Análises estatísticas, gráficos e tabelas foram realizados mediante uso do software Graph Pad Prism, versão 5.0. Os dados coletados foram expressos em medidas de tendência central (média, mediana, proporções) e de dispersão (desvio padrão). Para comparar proporções (variáveis categóricas) utilizamos o teste qui-quadrado ou o teste exato de Fisher. Para comparar médias (variáveis quantitativas) usamos o teste t de Student, se distribuição normal ou, caso a distribuição não fosse normal, for utilizado o Wilcoxon ou Mann-Whitney, testes não paramétricos. Foi considerado estatisticamente significativo um p-valor < 0,05.

4.15 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM/FIOCRUZ - CAAE 62438216.9.0000.0040) e foram assinadas cartas de anuência das instituições onde estão sendo coletadas as amostras. Todos os indivíduos envolvidos no estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Foram incluídos vinte indivíduos no estudo, sendo dez indivíduos assintomáticos para HAM/TSP e dez com HAM/TSP. As características clínicas e demográficas são mostradas na Tabela 1.

Tabela 1 – Características clínicas e demográficas dos indivíduos do estudo

Grupos	Idade (anos)		Sexo (%)		n	Carga proviral (cópias/10 ⁶ PBMC)
	n		F	M		
Assintomáticos	6	59, 2 ± 12,4	83,3%	16,7%	4	43.844±16.011
HAM-TSP	6	53,2 ± 7,9	33,3%	66,7%	3	175.175±94.432

PBMC= Células Mononucleares do Sangue Periférico. Os controles foram seis doadores de sangue saudáveis provenientes da Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia (dados demográficos não disponíveis).

5.2 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE TEMPO E MULTIPLICIDADE ÓTIMA DE INFECÇÃO (TOI E MOI) EM PBMC

Em relação aos MOI e TOI avaliados, não foram observadas diferenças na taxa de mortalidade nas diferentes concentrações de vírus e tempo avaliados. Os demais experimentos foram realizados com MOI 1. A mortalidade em monócitos (44,6% nos controles) foi maior que em linfócitos (4,1%) e no PBMC total (13,2%).

Tabela 2 – Mortalidade em Células Mononucleares do Sangue Periférico infectados por ZIKV em diferentes tempos e multiplicidade de infecção

MOI/TOI	24h			48h		
	(% média ±DP)			(% média ±DP)		
	PBMC	Linfócitos	Monócitos	PBMC	Linfócitos	Monócitos
Mock	15,7±2,9	4,4±2,7	44±14,8	13,2±3,3	4,1±2,6	44,6±10,3
MOI 1	14,1±3,9	4,4±2,4	41,2±16,3	12,9±6,3	4±2,3	46,2±15,1
MOI 0,1	15,9±9,2	5,7±3,1	45±13,9	14,2±6,1	4,9±1,2	53,3±12,1
MOI 0,01	14,3±3,9	4,4±2,1	41,9±13,2	11,2±4,2	3,5±1,8	46,1±13

Mortalidade avaliada por citometria de fluxo (Iodeto de Propídio). MOI = Multiplicidade de infecção; TOI = Tempo de Infecção; PBMC = Células Mononucleares do Sangue Periférico; DP = Desvio-padrão; Mock=controle.

5.3 INFECÇÃO DAS PBMC POR ZIKV

A presença de ZIKV no sobrenadante da cultura de PMBC foi positiva em 8 dos 12 indivíduos com HTLV -1e em todos os indivíduos controles (n = 3). A RT-PCR nos monócitos obtidos de indivíduos sadios foi positiva para ZIKV. Não houve replicação viral nos poços controles. Os resultados são mostrados nas Figura 5.

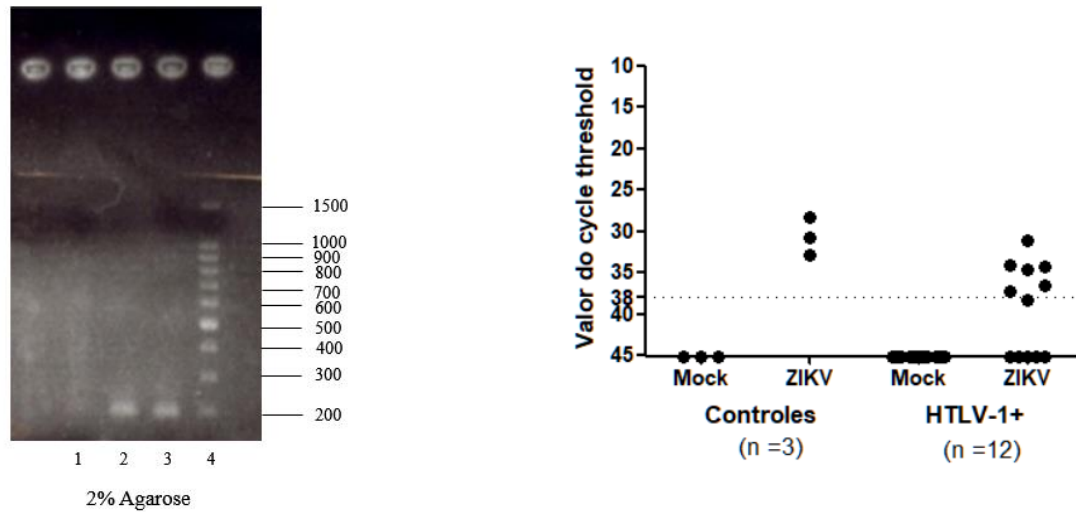


Figura 5 – Demonstração da infecção por ZIKV

À esquerda, resultado de RT-PCR para ZIKV em monócitos infectados. Imagem representativa de um indivíduo. 1 = controle negativo; 2 = controle positivo; 3 = amostra de monócito/macrófago (observa-se no gel fragmento de 192 pares de bases correspondente a região genômica de NS5 do ZIKV); 4 = marcador de peso molecular (100 bp dna Step Ladder (promega)); À direita, gráfico representativo de resultados de PCR em tempo real para Zika vírus no sobrenadante das culturas após infecção *in vitro* em PBMC. Amostras positivas para Valor do cycle threshold < 38.

Indivíduos controles (n=3); Indivíduos com HTLV – 1 (n=12); Mock= condição sem ZIKV;

5.4 CARACTERIZAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T E MONÓCITOS EM RESPOSTA À INFECÇÃO POR ZIKV

As frequências de linfócitos T CD4+ e linfócitos T CD8+ foram semelhantes entre os indivíduos saudáveis e indivíduos infectados por HTLV-1 independente da infecção *in vitro* pelo ZIKV (Figura 6).

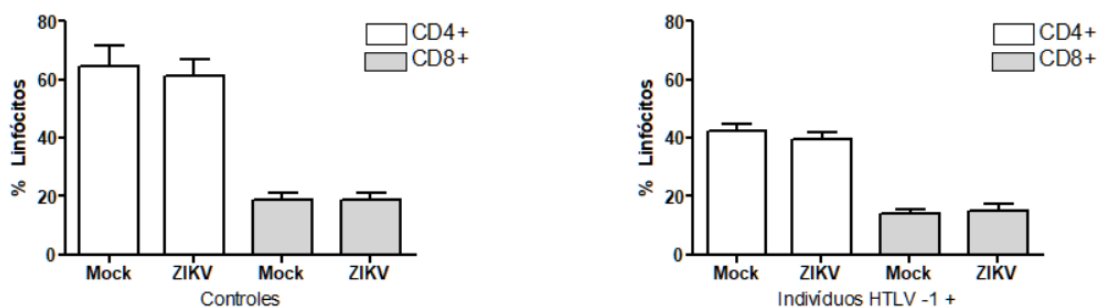


Figura 6 - Caracterização das subpopulações de linfócitos T em resposta à infecção por ZIKV em indivíduos saudáveis e com HTLV.

À esquerda, indivíduos saudáveis (n=6); À direita, indivíduos com HTLV (n=10). PBMC marcadas com anticorpos monoclonais anti-CD4-APC, anti-PE-Cy7, anti-CD3-APC-Cy7; Mock= condição sem ZIKV.

Em relação aos monócitos (Figura 7), não houve alterações significativas na frequência das subpopulações antes e após infecção por ZIKV em ambos os grupos. Observou-se predomínio de monócitos clássicos (CD14+CD16-), com 58,5% e 56,4% nos indivíduos com HTLV-1, antes e após infecção por ZIKV, respectivamente, e nos controles, 54% e 50,6%.

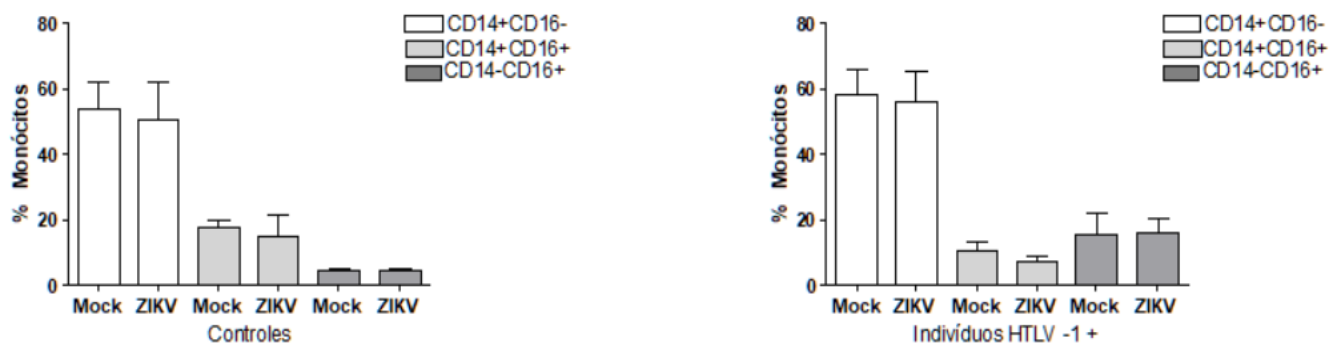


Figura 7 - Caracterização das subpopulações de monócitos em resposta à infecção por ZIKV em indivíduos saudáveis e com HTLV

À esquerda, indivíduos saudáveis (n=6); À direita, indivíduos com HTLV (n=12). PBMC marcadas com anticorpos monoclonais anti-CD14-FITC, anti-CD16-Alexa-700; Mock=condição sem ZIKV.

5.5 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS T

Proliferação de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ (Índice de Divisão celular > 0,05) foi observada nos pacientes infectados pelo HTLV-1, sendo três com HAM/TSP e três assintomáticos. Não houve aumento do índice de proliferação em resposta ao ZIKV (Tabela 3).

Tabela 3 - Proliferação das subpopulações T CD4 e CD8 em presença da infecção pelo ZIKV em indivíduos infectados com HTLV-1

Condições	CD4+		(p)	CD8		(p)
	Mock	ZIKV		Mock	ZIKV	
Assintomáticos (n=3)	0,3±0,3	0,2±0,2	1	0,3±0,2	0,3±0,2	1
HAM/TSP (n=3)	0,6±0,5	0,5±0,5	1	0,6±0,3	0,4±0,1	0,5

Dados representam média do índice de proliferação celular ± Desvio padrão. Mock = controle. *p* = *p* valor (Mann Whitney test).

5.6 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS NO SOBRENADANTE DAS CULTURAS EM RESPOSTA À INFECÇÃO POR ZIKV

Observou-se que nos indivíduos com HTLV-1, houve maior produção de todas as citocinas pro-inflamatórias (IL1- β , TNF- α , IL-6 e IFN- γ) comparados aos indivíduos saudáveis, na presença e ausência do ZIKV, mas sem significância estatística.

Quando analisados os subgrupos (Figura 8), os indivíduos com HAM/TSP produziram mais TNF- α (de 783,8 pg/mL para 1049 pg/mL) e IFN- γ (de 57,2 pg/mL para 94 pg/mL) que pacientes com HTLV-1 assintomáticos e controles saudáveis. Além disso, a produção de IFN- γ nos indivíduos com HAM/TSP foi superior à dos assintomáticos em resposta ao ZIKV (94 pg/mL x 43,5 pg/mL). Entretanto estes resultados não alcançaram significância estatística. Nos subgrupos de indivíduos com HTLV-1 assintomáticos e nos controles, a produção foi semelhante, em relação à infecção.

A produção de IL-10 foi diminuída após infecção pelo ZIKV nos indivíduos com o HTLV, de 832,7pg/mL para 510 pg/mL nos assintomáticos e de 608,2 pg/mL para 338,4 pg/mL no grupo com HAM/TSP. Já nos controles saudáveis, houve aumento da produção de IL-10 de 69,8

pg/mL para 806,4 pg/mL. Estas diferenças não foram estatisticamente significantes. Os níveis de IL-6 e IL-1 β foram semelhantes antes e após infecção pelo ZIKV em todos os subgrupos.

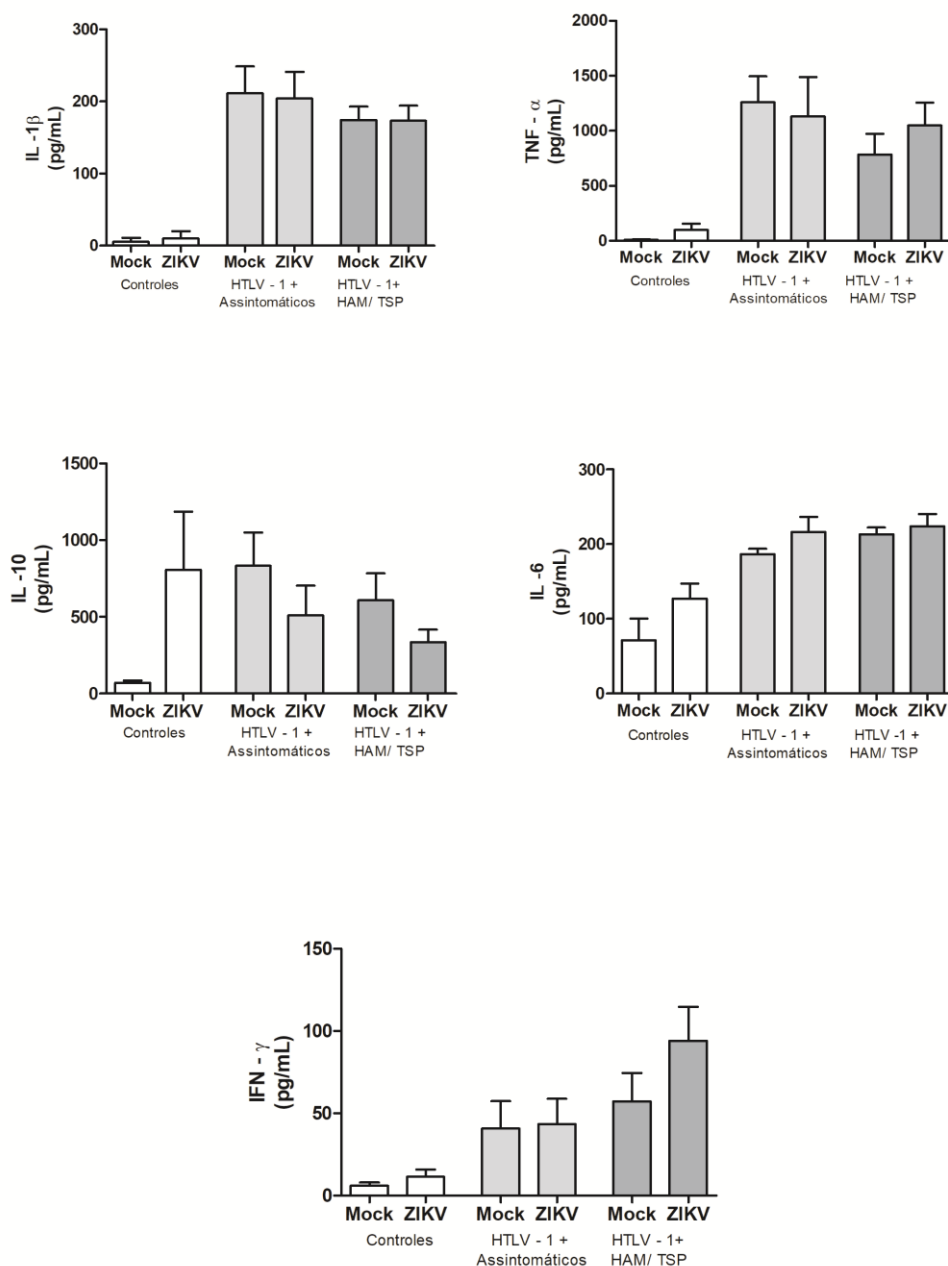


Figura 8 - Produção de citocinas no sobrenadante das culturas em resposta à infecção por ZIKV

Indivíduos saudáveis (n=6); Indivíduos com HTLV -1+ assintomáticos (n=6). Indivíduos com HTLV -1+ com HAM/TSP (n=6). Mock = condição sem Zika.

5.7 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE CITOCINAS EM RESPOSTA À INFECÇÃO POR ZIKV

Não foram evidenciadas diferenças significativas na expressão gênica das citocinas após 12h da infecção por ZIKV. Após 18h da infecção, houve aumento da produção média de IL-1 β de 15,9 2^{ddcT} para 30 2^{ddcT} nos indivíduos com HTLV-1 ($p=0,01$) e no subgrupo com HAM/TSP (6,5 2^{ddcT} para 23,3 2^{ddcT}) ($p = 0,03$) e de TNF- α nos indivíduos com HTLV-1 com média de 10,6 2^{ddcT} para 19,3 2^{ddcT} ($p = 0,03$), mantendo aumento significativo grupo de indivíduos com HAM/TSP 10,2 2^{ddcT} para 15,6 2^{ddcT} ($p = 0,03$). Já a expressão de IFN- γ aumentou após a infecção apenas no grupo com HAM/TSP, sem alcançar diferença significativa, mas com uma tendência após 18h da infecção (477,4^{ddcT} para 1997^{ddcT}, $p = 0,09$). Em relação às citocinas regulatórias (IL-10 e TGF- β) não houve diferenças significativas antes e após a infecção com ZIKV tanto no grupo assintomático quanto no com HAM/TSP. Nos indivíduos saudáveis, a expressão gênica das citocinas avaliadas foi baixa e semelhante na presença e ausência do ZIKV. Os resultados são mostrados na Figura 9.

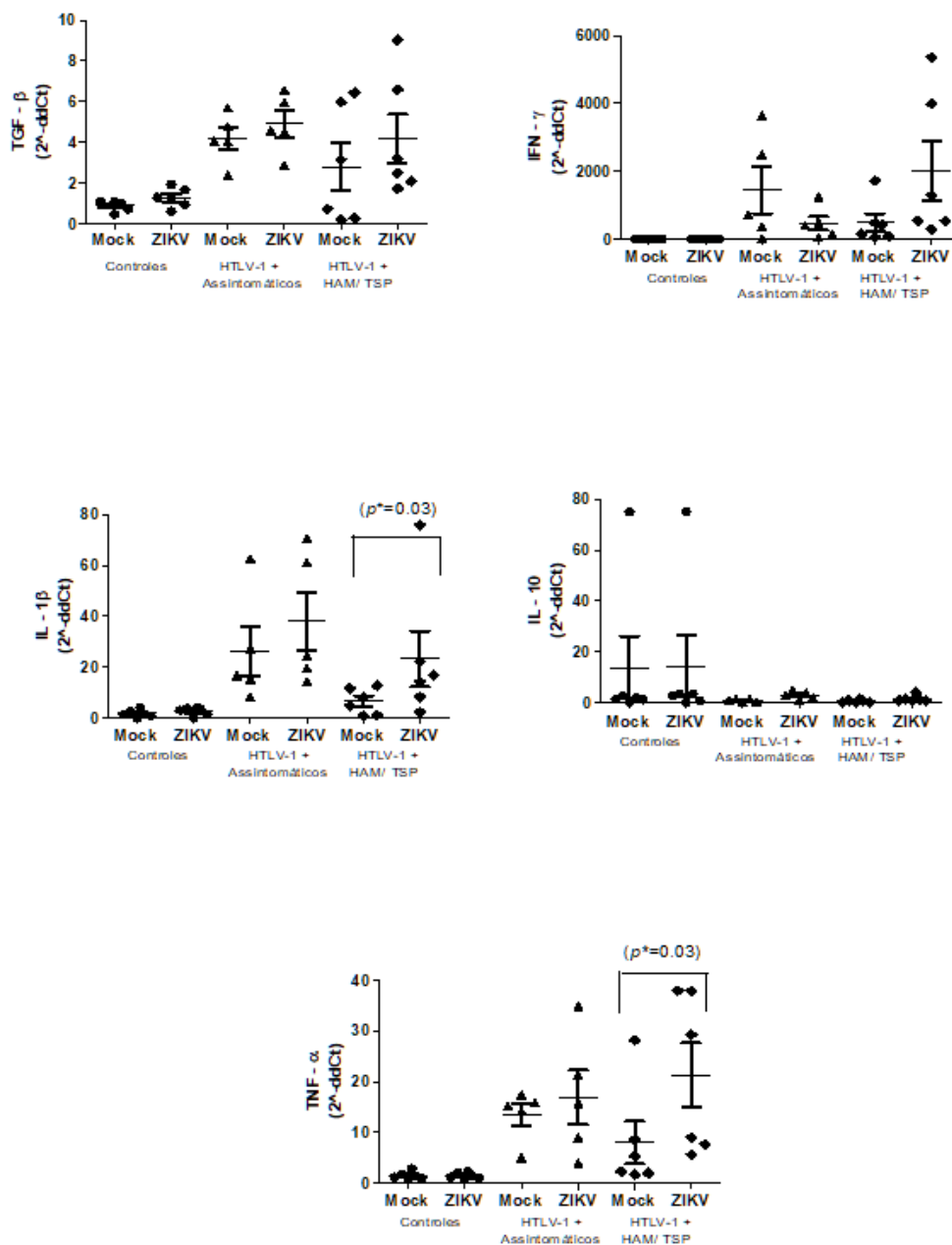


Figura 9 - Expressão gênica de citocinas em resposta à infecção por ZIKV após 18h

Indivíduos saudáveis (n=6); Indivíduos com HTLV -1+ assintomáticos (n=5). Indivíduos com HTLV -1+ com HAM/TSP (n=6). Mock = condição sem Zika; * p = p-valor (Wilcoxon test)

5.8 AVALIAÇÃO DA CARGA PROVIRAL DO HTLV-1 EM RESPOSTA À INFECÇÃO POR ZIKV

Avaliou-se a carga proviral do HTLV-1 na ausência e após infecção pelo ZIKV em oito indivíduos com HTLV-1 (quatro assintomáticos e quatro com HAM/TSP). Houve aumento significativo da carga proviral do HTLV-1 ($p = 0,008$) após infecção do PBMC pelo ZIKV. Nas análises de indivíduos com HAM/TSP e assintomáticos, não houve significância estatística, embora tenha ocorrido aumento da média da carga proviral em ambos os grupos (Figura 10).

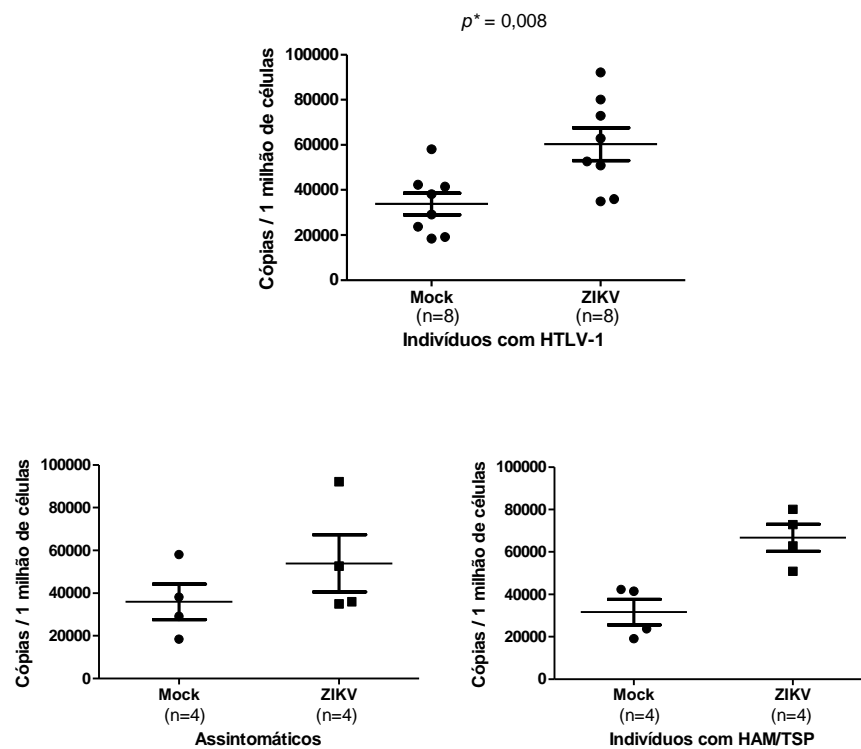


Figura 10 – Avaliação da carga proviral do HTLV-1 em resposta à infecção por ZIKV

Todos os indivíduos com HTLV-1 (n=8); Indivíduos com HTLV-1 assintomáticos (n=4); Indivíduos com HTLV-1 com HAM/TSP (n=4). * p = p-valor (Wilcoxon test).

6. DISCUSSÃO

Este estudo avaliou pela primeira vez os efeitos da infecção pelo vírus Zika na ativação celular em indivíduos com HTLV-1. Os resultados mostraram que em presença do ZIKV, ocorre aumento de citocinas pro-inflamatórias, especificamente IL- β e TNF- α e da carga proviral do HTLV-1.

Nossos resultados chamam atenção para ação de citocinas pró-inflamatórias que já foram associadas ao desenvolvimento de doenças tanto na infecção pelo ZIKV quanto pelo HTLV-1. Evidenciamos uma maior expressão gênica de IL-1 β e TNF- α na presença do ZIKV em indivíduos com HTLV-1, com maiores diferenças no grupo de pacientes com HAM/TSP. Sabe-se que a resposta imunológica em pacientes infectados com HTLV-1 é caracterizada por uma acentuada ativação de células T, com proliferação espontânea de células T e secreção de citocinas pro-inflamatórias. Estudos prévios em indivíduos com HTLV-1 demonstraram que a progressão para HAM / TSP está associada a um aumento de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-1 e IL-6, levando a dano do tecido neural (ESPÍNDOLA et al., 2015; QUARESMA et al., 2015; STARLING et al., 2015). Já foi também foi previamente demonstrado que IL-1 β e TNF- α induzem danos à vasculatura e neurônios em diversas patologias (FRIEDL et al., 2002; LU et al., 2005; PUHLMANN et al., 2005; TAKEUCHI et al., 2006) e mais recentemente foi evidenciado que ambas as citocinas também estão aumentadas em células progenitoras neurais após exposição ao vírus Zika.

O ZIKV causa distúrbios nas células progenitoras neurais e leva à microcefalia embrionária, além de, morte neuronal maciça e extensa ativação microglial, que são acompanhados por intensa atividade inflamatória, incluindo expressão aumentada de IL-1 β e TNF- α . Outros dois estudos sugerem que o TNF- α possa funcionar como biomarcador para risco aumentado de complicações neurológicas na infecção por ZIKV. Kam et al (KAM et al., 2017) avaliaram o perfil de citocinas entre as gestantes infectadas pelo ZIKV durante a fase aguda e fases convalescentes da doença e evidenciaram que a gestante portadora de feto com anomalias neurológicas apresentavam níveis muito altos de 12 mediadores: IL-8, IL-18, IL-4, IL-22, 23 e 27, MCP-1, TNF- α , IP-10, fator de crescimento epidérmico, eotaxina, e FGF-2 comparado com as outras mulheres grávidas com fetos normais. Em outro trabalho, foi demonstrada a presença de

altos níveis de TNF- α em células cerebrais fetais humanas infectadas por ZIKV, implicando ainda mais seu papel na neuroinflamação (LUM et al., 2017).

A carga proviral do HTLV-1 é descrita como um marcador biológico do desenvolvimento de doenças associadas, especialmente HAM / TSP. Uma carga proviral de HTLV-1 mais alta é observada em pacientes com HAM / TSP em comparação com portadores assintomáticos (NILLA OLAVARRIA et al., 2012). Além disso, uma carga proviral aumentada também está presente em pacientes com outras doenças associadas ao HTLV-1, como dermatite infecciosa (PRIMO et al., 2009), Linfoma/leucemia de células T (OKAYAMA et al., 2004), ceratoconjuntivite (CASTRO-LIMA et al., 2011) e artrite reumatóide ou outras doenças do tecido conjuntivo (YAKOVA et al., 2005).

Diferentemente do outro retrovírus humano, o HIV, cujas implicações das variações da carga viral são mais conhecidas, a associação entre alterações da carga proviral de HTLV-1 e o desenvolvimento de imunossupressão e doenças infecciosas oportunistas ainda permanece incerto. É sabido que pacientes com HIV, em terapia anti-retroviral podem apresentar escapes transitórios de viremia plasmática (blip), que se normalizam após cerca de 4 semanas se mantido em uso de terapia ao passo que na ausência de tratamento, ocorre aumento progressivo da carga viral, queda no número de linfócitos T CD4+, que leva a imunossupressão (SÖRSTEDT et al., 2016).

Devido à introdução recente do ZIKV no nosso meio, são poucos estudos que avaliaram as consequências da infecção em portadores de HIV e HTLV-1. Um estudo pioneiro avaliou uma coorte de pessoas vivendo com HIV mostrou que as manifestações clínicas e laboratoriais da infecção por ZIKV nessa população são similares às aquelas observadas em indivíduos com a mesma doença, mas com sorologia negativa para HIV (CALVET et al., 2018). Os resultados do estudo ressaltam que em pacientes com controle imunológico e virológico, a contagem de linfócitos T CD4+ e a carga viral não sofrem alterações meses após a infecção por ZIKV. Ainda segundo o estudo, a quase a totalidade dos participantes do estudo fazia uso de tratamento antirretroviral e apresentava um excelente controle imunológico e virológico. O grupo da pesquisa supõe que os resultados possam ser diferentes em pessoas com HIV cuja carga viral não esteja estável. O impacto clínico e variação na carga proviral do HTLV-1, vírus para o qual não há terapia antirretroviral efetiva também pode ser distinto. Em pacientes com HTLV-1, é descrito

que a carga proviral tende a permanecer estável por até dois anos (NILLA OLAVARRIA et al., 2012), o que pode sugerir que eventos agudos a aumentem apenas de maneira transitória, sem necessariamente levar ao desenvolvimento de doenças associadas. Entretanto, o aumento súbito da carga proviral, associado a um aumento de citocinas pro-inflamatórias poderia desencadear o surgimento de doenças associadas ao HTLV-1, como HAM/TSP e ceratoconjuntivite e outros fenômenos autoimunes. São necessários estudos que avaliem a carga proviral de maneira longitudinal após infecções agudas e outros eventos que possam alterar a reposta imune em indivíduos com HTLV-1.

No presente estudo, a presença do ZIKV não aumentou a proliferação das subpopulações de linfócitos T CD4 e CD8 dos indivíduos infectados pelo HTLV-1. Entretanto, foi observada a presença de proliferação espontânea (na ausência de antígeno adicionado às culturas) nas duas subpopulações. O papel da proliferação na patogênese da infecção pelo HTLV-1 é pouco conhecido, porém alguns trabalhos indicam que sua intensidade é maior nos pacientes com HAM/TSP, além disso pode ser responsável pela manutenção da carga proviral do HTLV-1, uma vez que o vírus se replica por divisão da célula infectada e aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , e IFN- γ (ASQUITH et al., 2007; CARVALHO et al., 2001; MASCARENHAS et al., 2006; STARLING et al., 2015). Tal estado de inflamação crônica pode induzir um grau de imunossupressão. Mesmo na ausência de proliferação linfocitária espontânea pode ser encontrada uma disfunção imune, mostrada pela redução significativa de resposta específica aos antígenos de memória (MASCARENHAS et al., 2006). Dessa maneira, é possível que indivíduos com HTLV-1 apresentem resposta imune inespecífica ao ZIKV.

Na presença da infecção *in vitro* pelo ZIKV, a proliferação continuou a ser detectada, o que pode ser devido a ativação celular e indução de proliferação pelo próprio HTLV. Entretanto, não foi possível concluir se a infecção *in vitro* pelo ZIKV amplia a proliferação nos linfócitos. O pequeno número amostral e a ausência de avaliação em indivíduos saudáveis são limitações deste estudo, que podem ter contribuído para que estas diferenças não fossem evidenciadas.

Estudos anteriores (FOO et al., 2017; MICHLMAYR et al., 2017), evidenciaram que as células mononucleares do sangue periférico são susceptíveis à infecção pelo ZIKV. No nosso estudo, confirmamos a infecção em monócitos por RT-PCR com codificação da região genômica de NS5. Além disso, o RT-PCR em tempo real no sobrenadante das culturas após 48h foi positivo

em 73,3% (11/15) das amostras. RT-PCR pode detectar a presença do vírus no sangue em até 7 dias após início da fase aguda, embora maiores sensibilidades tenham sido demonstradas na saliva e urina. Um estudo prévio mostrou detecção em 9/9 casos (100%) na saliva e urina e 6/9 (67%) dos casos no sangue após 48h de início dos sintomas (BINGHAM et al., 2016). A não detecção em 4 amostras no nosso estudo pode ter ocorrido pela baixa taxa de infecção celular (cerca de 4% dos monócitos e cerca de 6% do PBMC total), previamente descritos na literatura (MICHLMAYR et al., 2017). Além disso, pode ter ocorrido morte celular após 48h. Nos nossos experimentos para avaliação das melhores condições de infecção, foi observada maior mortalidade em monócitos que em linfócitos. A maior mortalidade em monócitos pode ser considerada dentro do esperado para o tempo de cultivo. Estudos prévios com citometria de fluxo e microscopia eletrônica evidenciaram que na cultura de monócitos humanos purificados e criopreservados, ocorre uma perda de cerca de 60% após uma semana, sendo a principal perda acontece nas primeiras 24h (LUND et al., 2002). Entretanto, não houve diferenças nas taxas de mortalidade na presença do ZIKV nas diversas concentrações de vírus e tempos avaliados em comparação aos controles. A MOI 1 e TOI 48h utilizadas neste estudo já foram previamente testadas em trabalhos anteriores para infecção de PBMC e mostraram-se adequadas para avaliação de fenótipo celular e quantificação da produção de citocinas (FOO et al., 2017; MICHLMAYR et al., 2017).

Como demonstrado no estudo de Michlmayr et al (MICHLMAYR et al., 2017), os leucócitos infectados podem funcionar como 'cavalos de Troia' e transportar vírus para espaços protegidos pelo sistema imune, incluindo placenta, testículos e cérebro e que monócitos e linfócitos, em taxas mais baixas, são suscetíveis à infecção pelo ZIKV (cerca de 4% e 0,5%, respectivamente. Neste mesmo estudo, a frequência de monócitos clássicos (CD14+CD16-) diminuiu significativamente, enquanto a população de monócitos intermediários (CD14+ CD16+) foi significativamente expandida durante a infecção por ZIKV, em comparação com os controles não infectados de indivíduos saudáveis. Nos nossos resultados, a presença do ZIKV não alterou significativamente o padrão de das subpopulações de linfócitos T e monócitos nem a proliferação de linfócitos T. Uma limitação do nosso estudo é o pequeno número de indivíduos que pode ter contribuído para que estas diferenças não fossem evidenciadas.

7 CONCLUSÕES

Este estudo evidenciou pela primeira vez que, em um modelo *in vitro*, na presença do ZIKV, há aumento de citocinas pro-inflamatórias, especificamente IL- β e TNF- α , além de aumento na carga proviral do HTLV-1.

8 PERSPECTIVAS

São necessários estudos que avaliem o papel de citocinas pro-inflamatórias na patogênese da co-infecção entre o ZIKV e HTLV-1, possíveis biomarcadores de progressão de doença, bem como variações na carga proviral do HTLV-1 e evolução para doenças associadas. Estes estudos poderão contribuir para melhorar o manejo clínico e possíveis intervenções em futuros surtos de ZIKV, especialmente em indivíduos com comorbidades que alterem o sistema imune.

REFERÊNCIAS

- ABAD-FERNÁNDEZ, M. *et al.* Delayed liver fibrosis in HTLV-2-infected patients co-infected with HIV-1 and hepatitis C virus with suppressive antiretroviral therapy. **AIDS**, v. 29, n.4, p. 401-408, 2015.
- ABRAHÃO, M. H.N. *et al.* Short communication: Human lymphotropic virus type 1 coinfection modulates the synthesis of cytokines by peripheral blood mononuclear cells from HIV type 1-infected individuals. **AIDS Research and Human Retroviruses**, vol. 28, n.8, p. 806-808, 2012.
- ARAÚJO, L. M.; FERREIRA, M. L. B.; NASCIMENTO, O. J.M. Síndrome de Guillain-Barré associada ao surto de infecção por vírus Zika no Brasil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 74, n. 3, p. 253–255, 2016.
- ASQUITH, B. *et al.* In vivo T lymphocyte dynamics in humans and the impact of human T-lymphotropic virus 1 infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol.104, n. 19, p. 8035-40, 2007.
- AXLEY, P. *et al.* Hepatitis C Virus and Hepatocellular Carcinoma: A Narrative Review. **Journal of Clinical and Translational Hepatology**, v. 60, n. 4, p. 185-191, 2018.
- AZRAN, I.; SCHAVINSKY-KHRAPUNSKY, Y.; ABOUD, M. Role of tax protein in human T-cell leukemia virus type-I leukemogenicity. **Retrovirology**, vol. 20, n. 1, p. 1-24, 2004.
- BALM, M. *et al.* A diagnostic polymerase chain reaction assay for Zika virus. **Journal of Medical Virology**, v. 84, n. 9, p. 1501–1505, 2012.
- BANGHAM, C. R.M.; OSAME, M. Cellular immune response to HTLV-1. **Oncogene**, v. 24, n. 39, p. 6035–6046, 2005.
- BAUD, D. *et al.* An update on Zika virus infection. **The Lancet**, v. 90, n. 10107, p. 2099-2109, 2017.
- BINGHAM, A. M. *et al.* Comparison of test results for Zika virus RNA in urine, serum, and saliva specimens from persons with travel-associated Zika virus disease — Florida, 2016. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 18, p. 474–478, 2016.
- BLATTNER, W. *et al.* Infective dermatitis of Jamaican children: a marker for HTLV-I infection. **The Lancet**, v. 336, n. 8727, p. 1345-1347, 1990.

BRASIL, P. *et al.* Zika virus infection in pregnant women in rio de janeiro. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 1, p. 2321-2334, 2016.

BRITES, C. *et al.* Severe and Norwegian scabies are strongly associated with retroviral (HIV-1/HTLV-1) infection in Bahia, Brazil. **AIDS**, v. 16, n. 9, p. 1292–1293, 2002.

BRITO-MELO, G. E.A. *et al.* Phenotypic study of peripheral blood leucocytes in HTLV-I-infected individuals from Minas Gerais, Brazil. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 55, n. 6, p. 621–628, 2002.

CALVET, G. *et al.* Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 6, p. 653–660, 2016.

CALVET, G.A. *et al.* Zika virus infection and differential diagnosis in a cohort of HIV-infected patients. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 79, n. 2, p. 237–243, 2018.

CAMPOS, G. C. *et al.* Zika virus infection, a new public health challenge. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 20, n. 3, p. 227–228, 2016.

CAMPOS, G. S.; BANDEIRA, A. C.; SARDI, S. I. Zika virus outbreak, Bahia, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 10, p. 1885–1886, 2015.

CAO-LORMEAU, V.-M. *et al.* Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. **The Lancet**, v. 387, n. 10027, p. 1531–1539, 2016. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673616005626>.

CARVALHO, E. M.; DA FONSECA PORTO, A. Epidemiological and clinical interaction between HTLV-1 and *Strongyloides stercoralis*. **Parasite Immunology**, v. 26, n.11, p. 487-497, 2004.

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**, v. 27, n. 1, p. 1–6, 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11404513>.

CARVALHO, N. B. *et al.* HTLV-1 infection interferes with immune responses to *Mycobacterium tuberculosis* antigens. **Retrovirology**, v. 12, n. 1, p. 24, 2015.

CASKEY, M. F. *et al.* Clinical manifestations associated with HTLV type I infection: A cross

sectional study. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 23, n. 3, p. 365–371, 2007.

CASTRO-LIMA V. C. *et al.* Keratoconjunctivitis sicca of human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) infected individuals is associated with high levels of HTLV-1 proviral load. **Journal of Clinical Virology**, v. 52, n. 3, p. 177–180, 2011.

DE CASTRO-COSTA, C. M. *et al.* Proposal for diagnostic criteria of tropical spastic paraparesis/HTLV-I- associated myelopathy (TSP/HAM). **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 22, n.10, p. 931-935, 2006.

DE LOURDES BASTOS, M. *et al.* Prevalence of human T-cell lymphotropic virus type 1 infection in hospitalized patients with tuberculosis. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 13, n. 12, p.1519-1523, 2009.

DE SOUZA, J. *et al.* Case report: Strongyloides stercoralis hyperinfection in a patient with HTLV-1: An infection with filariform and rhabditiform larvae, eggs, and free-living adult females output. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 99, n. 6, p. 1583–1586, 2018.

DEHÉE, A. *et al.* Quantitation of HTLV-I proviral load by a TaqMan real-time PCR assay. **Journal of Virological Methods**, v. 102, n. 1–2, p. 37–51, 2002.

DICK, G. W.A. Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 5, p. 509–520, 1952.

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

DUFFY, M. R. *et al.* Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **The New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 24, p. 2536–2543, 2009.

DUPONT-ROUZEYROL, M. *et al.* Co-infection with zika and dengue viruses in 2 patients, New Caledonia, 2014. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, p. 381–382, 2015.

ENOSE-AKAHATA, Y.; VELLUCCI, A.; JACOBSON, S. Role of HTLV-1 Tax and HBZ in the pathogenesis of HAM/TSP. **Frontiers in Microbiology**, v .8, n. 2563, p. 1-10, 2017.

ESPÍNDOLA, O. M. *et al.* High IFN- γ /IL-10 expression ratio and increased frequency of persistent human T-cell lymphotropic virus type 1-infected clones are associated with human T-

cell lymphotropic virus type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis development. **Intervirolgy**, v. 58, n. 2, p. 106–114, 2015.

FOO, S.-S. *et al.* Asian Zika virus strains target CD14+ blood monocytes and induce M2-skewed immunosuppression during pregnancy. **Nature Microbiology**, v. 2, n. 11, p. 1558-1570, 2017.

GARCIA-TAPIA, D.; LOIACONO, C. M.; KLEIBOEKER, S. B. **Replication of West Nile virus in equine peripheral blood mononuclear cells. Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 110, n. 3–4, p. 229–244, 2006.

GESSAIN, A. *et al.* Antibodies to human t-lymphotropic virus type-i in patients with tropical spastic paraparesis. **The Lancet**, v. 326, n. 8452, p. 407–410, 1985a.

GESSAIN, A. *et al.* Antibodies to human t-lymphotropic virus type-i in patients with tropical spastic paraparesis. **The Lancet**, v. 44, n. 6, p. 605-607, 1985b.

GESSAIN, A. *et al.* High human T-cell lymphotropic virus type I proviral DNA load with polyclonal integration in peripheral blood mononuclear cells of French West Indian, Guianese, and African patients with tropical spastic paraparesis. **Blood**, v. 5, n. 2, p. 428-433, 1990.

GESSAIN, A.; CASSAR, O. Epidemiological aspects and world distribution of HTLV-1 infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. 388, p. 1-23, 2012.

GONÇALVES, D. U. *et al.* Dermatologic lesions in asymptomatic blood donors seropositive for human T cell lymphotropic virus type-1. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 68, n. 5, p. 562–5, 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1281234>>.

GRASSI, M. F. R. *et al.* Tuberculosis incidence in a cohort of individuals infected with human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) in Salvador, Brazil. **BMC Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, 2016.

GUDO, E. S. *et al.* Co-infection by human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and human T cell leukemia virus type 1 (HTLV-1): Does immune activation lead to a faster progression to AIDS? **BMC Infectious Diseases**, v. 9, n. 211, p. 1-13, 2009.

GUERIN, B. *et al.* Polyarthritits in HTLV-1-infected patients. A review of 17 cases. **Rev Rhum Engl Ed**, v. 62, n. 1, p. 21–28, 1995. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/778831>.

HAJJAR, C. *et al.* HTLV1 infection and sicca syndrome. **Journal Francais d’Ophtalmologie**, v.

18, n. 10, p. 597-602, 1995.

HAMEL, R. *et al.* Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. **Journal of Virology**, v. 89, n. 17, p. 8880–8896, 2015.

HINUMA, Y. *et al.* Adult T-cell leukemia: Antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 78, n. 10, p. 6476–6480, 1981.

HIRATA, T. *et al.* Impairment of host immune response against *strongyloides stercoralis* by human T cell lymphotropic virus type 1 infection. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, n. 2, p. 246–249, 2006.

HOLLSBERG, P. *et al.* Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston: Pathogenesis of diseases induced by human lymphotropic virus type I infection. **New England Journal of Medicine**, v. 328, n.1, p. 173-1182, 1993.

KAM, Y. W. *et al.* Specific biomarkers associated with neurological complications and congenital central nervous system abnormalities from Zika virus-infected patients in Brazil. **Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. 2, p. 172–181, 2017.

KOHTZ, D. S. *et al.* Immunological and structural homology between human T-cell leukemia virus type I envelope glycoprotein and a region of human interleukin-2 implicated in binding the β receptor. **Journal of Virology**, v. 62, n. 2, p. 659–662, 1988.

LAGRENADE, L. *et al.* Infective Dermatitis of Jamaican Children: A Marker for HTLV-1 Infection. **The Lancet**, v. 336, n. 8727, p. 1345-1347, 1990.

LANCIOTTI, R. S. *et al.* Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 8, p. 1232–1239, 2008.

LEE, T. H. *et al.* Quantitation of HTLV-I and II proviral load using real-time quantitative PCR with SYBR Green chemistry. **Journal of Clinical Virology**, v. 31, n. 4, p. 275–282, 2004.

LUM, F. M. *et al.* Zika virus infects human fetal brain microglia and induces inflammation. **Clinical Infectious Diseases**, v. 64, n. 7, p. 914–920, 2017.

LUND, P. K. *et al.* The fate of monocytes during 24 h of culture as revealed by flow cytometry and electron microscopy. **Journal of Immunological Methods**, v. 270, n. 1, p. 63–76, 2002.

MAJOROVITS, E. *et al.* Human T-Lymphotropic Virus-1 visualized at the virological synapse by electron tomography. **PLoS ONE**, v. 3, n. 5, 2008.

MARINHO, J. *et al.* Increased risk of tuberculosis with human T-lymphotropic virus-1 infection: a case-control study. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 40, n. 5, p. 625–8, 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16284541>.

MASCARENHAS, R. E. *et al.* Peripheral blood mononuclear cells from individuals infected with human T-cell lymphotropic virus type 1 have a reduced capacity to respond to recall antigens. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 13, n. 5, p. 547–552, 2006.

MATSUOKA, M.; JEANG, K. T. Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 4 p. 270-280, 2007.

MATSUURA, E.; YAMANO, Y.; JACOBSON, S. Neuroimmunity of HTLV-I infection. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**. v. 5, n. 3, p. 310-325, 2010.

MAUCOURANT, C. *et al.* Vieillard V. Zika virus in the eye of the cytokine storm. **Eur. Cytokine Netw**, v. 30, n. 3, p. 74-81, 2019.

MESNARD, J. M.; BARBEAU, B.; DEVAUX, C. HBZ, a new important player in the mystery of adult T-cell leukemia. **Blood**, v. 108, n. 13, p. 3979-82, 2006.

MICHLMAYR, D. *et al.* CD14+CD16+ monocytes are the main target of Zika virus infection in peripheral blood mononuclear cells in a paediatric study in Nicaragua. **Nature Microbiology**, v. 2, n. 11, p. 1462-1470, 2017. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/s41564-017-0035-0>.

MINER, J. J.; DIAMOND, M. S. Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism. **Cell Host & Microbe**, v. 21, n. 2, p. 134–142, 2017.

MOCHIZUKI, M. *et al.* HTLV-I Uveitis: A Distinct Clinical Entity Caused by HTLV-I. **Japanese Journal of Cancer Research**, v. 83, n. 3, p. 236–239, 1992.

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

MURPHY, E. L. *et al.* Modelling the risk of adult T-cell leukemia/lymphoma in persons infected with human T-lymphotropic virus type I. **International Journal of Cancer**, v. 43, n. 2, p. 250-253, 1989.

- NILLA OLAVARRIA, V. *et al.* Evolution of HTLV-1 proviral load in patients from Salvador, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 16, n. 4, p. 357–360, 2012.
- OKAYAMA, A. *et al.* Role of HTLV-1 proviral DNA load and clonality in the development of adult T-cell leukemia/lymphoma in asymptomatic carriers. **International Journal of Cancer**, v. 110, n. 4, p. 621-625, 2004.
- OLINDO, S. *et al.* HTLV-1 proviral load in peripheral blood mononuclear cells quantified in 100 HAM/TSP patients: A marker of disease progression. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 15, n. 237, p. 53-59, 2005.
- OSAME, M. *et al.* HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. **The Lancet**, v. 1, n. 8488, p. 1031-1032, 1986.
- PEDRAL-SAMPAIO *et al.* Co-Infection of Tuberculosis and HIV/HTLV Retroviruses: Frequency and Prognosis Among Patients Admitted in a Brazilian Hospital. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 1, n. 1, p. 31–35, 1997. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11107236>.
- PEREIRA, F. M. *et al.* Evidence of New Endemic Clusters of Human T-Cell Leukemia Virus (HTLV) Infection in Bahia, Brazil. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 1002, p. 1-10, 2019.
- PETERSEN, E. *et al.* Rapid Spread of Zika Virus in The Americas - Implications for Public Health Preparedness for Mass Gatherings at the 2016 Brazil Olympic Games. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 44, n. 1. p. 11-15, 2016.
- PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. 45e – 45, 2001.
- PINTO, L. A. *et al.* An Evaluation of the Spontaneous Proliferation of Peripheral Blood Mononuclear Cells in HTLV-1-Infected Individuals Using Flow Cytometry. **Oncology**, p. 1–6, 2011.
- 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 of the United States of America**, v. 77, n. 12, p. 7415-7419, 1980.
- PRIMO, J. *et al.* High HTLV-1 proviral load, a marker for HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis, is also detected in patients with infective dermatitis associated with HTLV-1. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, n. 8, p. 761–764, 2009.

- QUARESMA, J. A.S. *et al.* HTLV-1, immune response and autoimmunity. **Viruses**, v. 8, n, 5, p. 1-10, 2015.
- REED, L.J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. **The American Journal of Hygiene**, v. 27, n. 3, p. 493-497, 1938.
- ROTH, A. *et al.* Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and zika virus infections – An unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012–2014. **Eurosurveillance**, v. 19, n. 41, 2014.
- STUVER, S. *et al.* HCV infection and liver cancer mortality in a Japanese population with HTLV-I. **International Journal of Cancer**, v. 67, n. 1, p. 35-37, 1996.
- SANTIAGO, G. A. *et al.* Analytical and Clinical Performance of the CDC Real Time RT-PCR Assay for Detection and Typing of Dengue Virus. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 7, p. 1-15, 2013.
- SANTIAGO, G. A. *et al.* Performance of the Triplex real-time RT-PCR assay for detection of Zika, dengue, and chikungunya viruses. **Nature Communications**, v. 9, n. 1391, p. 1-10, 2018.
- SEIKI, M. *et al.* Nonspecific integration of the HTLV provirus genome into adult T-cell leukaemia cells. **Nature**, v. 309, n. 5969, p. 640–642, 1984.
- SETOGUCHI, Y. *et al.* Detection of human T-cell lymphotropic virus type I-related antibodies in patients with lymphocytic interstitial pneumonia. **American Review of Respiratory Disease**, v. 144, n. 6, p. 1361-1365, 1991.
- SILVA, M. C. *et al.* HCV/HTLV coinfection: Does HTLV-1 interfere in the natural history of HCV-related diseases? **Journal of Medical Virology**, v. 88, n.1, p. 1967–1972, 2016.
- SÖRSTEDT, E. *et al.* Viral blips during suppressive antiretroviral treatment are associated with high baseline HIV-1 RNA levels. **BMC Infectious Diseases**, v. 16, n. 305, p. 1-9, 2016.
- SOUZA, A. *et al.* Association of Tuberculosis Status with Neurologic Disease and Immune Response in HTLV-1 Infection. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 33, n. 11, p. 1126–1133, 2017.
- SOUZA, B. S. F. *et al.* Zika virus infection induces mitosis abnormalities and apoptotic cell death of human neural progenitor cells. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 39775, 2016. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/srep39775>.

SOUZA, J. N. D; TEIXEIRA, M. C. A.; SOARES, N. M. Associação entre hiperinfecção por *Strongyloides stercoralis* e HTLV-1: um relato de caso. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 13, . n. 3, p. 427-439, 2014. Disponível em:

<http://www.portalseer.ufba.br/index.php/cmbio/article/view/12950/9362>.

STARLING, A. L. B. *et al.* Immunological signature of the different clinical stages of the HTLV-1 infection: Establishing serum biomarkers for HTLV-1-associated disease. **Biomarkers**, v. 20,n. 6-7, p. 502-12, 2015. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/24192>

TAPPE, D. *et al.* Cytokine kinetics of Zika virus-infected patients from acute to convalescent phase. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 205, n. 3, p. 269–273, 2016.

TOGNARELLI, J. *et al.* A report on the outbreak of Zika virus on Easter Island, South Pacific, 2014. **Archives of Virology**, v. 161, n. 3, p. 665–668, 2016.

UCHIYAMA, T. *et al.* Adult T-cell leukemia: Clinical and hematologic features of 16 cases. **Blood**, v. 50, n. 3, p. 481–492, 1977.

VERDONCK, K. *et al.* HTLV-1 infection is frequent among out-patients with pulmonary tuberculosis in northern Lima, Peru. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 11, n. 10, p. 1066-1072, 2007.

VERDONCK, K.; GOTUZZO, E. **HTLV-1, HTLV-2, and associated diseases**. Textbook of Medicine. Oxford, 2012. Disponível em: <https://oxfordmedicine.com/view/10.1093/med/9780199204854.001.1/med-9780199204854-chapter-070525>. Acesso em: 10 Abril 2020.

YAKOVA, M. *et al.* Increased proviral load in HTLV-1-infected patients with rheumatoid arthritis or connective tissue disease. **Retrovirology**, v. 2, n. 4, p. 1-9, 2005.