



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

AVALIAÇÃO DE CÉLULAS T REGULATÓRIAS E PERFIL DE
ATIVÇÃO DE LINFÓCITOS T NA CERATOCONJUNTIVITE SECA
ASSOCIADA AO HTLV-1

REGINA SANTOS NASCIMENTO

Salvador - Bahia

2015

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

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

REGINA SANTOS NASCIMENTO

**AVALIAÇÃO DE CÉLULAS T REGULATÓRIAS E PERFIL DE
ATIVAÇÃO DE LINFÓCITOS T NA CERATOCONJUNTIVITE SECA
ASSOCIADA AO HTLV-1**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa para obtenção do título de Mestre em Ciências.

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

Salvador - Bahia

2015

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

N244a Nascimento, Regina Santos
Avaliação de células T regulatórias e perfil de ativação de linfócitos T na ceratoconjuntivite seca associada ao HTLV-1. / Regina Santos Nascimento. - 2015.
83 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Maria Fernanda Rios Grassi, Laboratório Avançado de Saúde Pública.

Dissertação (Mestrado de Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) - Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2015.

1. HTLV-1. 2. Ceratoconjuntivite seca. 3. Linfócitos T regulatórios. I.Título.

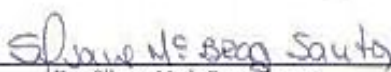
CDU 616.98

“AVALIAÇÃO DE CÉLULAS T REGULATÓRIAS E PERFIL DE ATIVAÇÃO DE
LINFÓCITOS T NA CERATOCONJUNTIVITE SECA ASSOCIADA AO HTLV-1”

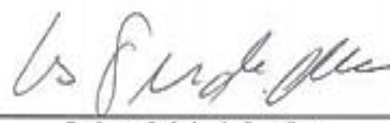
REGINA SANTOS NASCIMENTO

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Silvana Maria Braga Santos
Professora Adjunta
UEFS



Dr. Lucas Pedreira de Carvalho
Pesquisador
CPqGM/FIOCRUZ



Dra. Milena Botelho Pereira Soares
Pesquisadora
CPqGM/FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

FAPESB

FIOCRUZ

À minha avó Regina (*in memoriam*)
e aos meus pais, minha maior fonte
de amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas infinitas bênçãos concedidas em todos os momentos de da minha vida.

À minha orientadora Maria Fernanda Rios Grassi, pela oportunidade, ensinamentos, paciência e por toda a confiança.

Ao Dr. Bernardo Galvão por toda a colaboração e oportunidade de trabalhar no CHTLV.

A Dr.^a Cristina Vargens pela colaboração fundamental para a realização deste trabalho.

À querida Rita Elizabeth, pelas conversas e pelo carinho de sempre.

Aos funcionários do LASP, especialmente à Ritinha, pelo acolhimento e incansável disposição em ajudar no que fosse possível.

Aos funcionários do CHTLV, Noilson Lázaro, Sônia Gurgel e Viviana Olavarria, por todo o apoio.

Aos pacientes do CHTLV pela generosa contribuição.

Aos funcionários da Plataforma de Citometria de Fluxo, Jorge Clarêncio, Rafaela, e especialmente Liliane Cunha, pelo auxílio, dedicação e simpatia.

Aos professores e funcionários do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, pela colaboração.

Aos colegas do LASP, Raimundo Coutinho e Lorena Pinto, pelo aprendizado e acolhimento.

À querida Luana Gois, por ser sempre tão solícita, pelo carinho, atenção, aprendizado e paciência.

Aos estudantes de iniciação científica, especialmente Leonardo Pereira e Leane Rodrigues, pelo afeto, companhia e auxílio nas longas jornadas no laboratório P2.

Aos amigos da FIOCRUZ, Igor Ives, Candace Machado, Caroline da Guarda, Afrânio Evangelista, Jaqueline Goes, Tayane Fernandes e Maíra Silva, cozinhas que deixaram essa jornada mais leve e feliz.

Aos meus pais, Maria Edésia e Josemá Bispo, pelo amor imensurável, compreensão e incentivo que movem a minha trajetória.

À minha família, em especial meu irmão Elias e minhas madrinhas Domingas e Gedália, pelas orações e por todo o amor.

Ao meu querido noivo, Marcus Vinícius, pelos ensinamentos e palavras de incentivo, pelo amor e companheirismo fundamentais na realização dessa jornada.

Às minhas amigas da vida, Talita Rosa, Carolli Almeida, Danielle Malta e Beatriz Helena, por todos os risos, pela cumplicidade e amizade de sempre.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Tereza de Calcutá

NASCIMENTO, Regina Santos. Avaliação de células T regulatórias e perfil de ativação de linfócitos T na ceratoconjuntivite seca associada ao HTLV-1. 83 f. il. Dissertação (Mestrado) - Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2015.

RESUMO

O HTLV-1 é o agente etiológico da leucemia /linfoma de células T do adulto (ATLL), da paraparesia espástica tropical/ mielopatia associada ao HTLV-1 (HAM/TSP) e da uveíte. Além destas, a ceratoconjuntivite seca (CCS), doença multifatorial da lágrima e da superfície ocular, tem sido descrita com maior frequência em indivíduos infectados pelo HTLV-1. Assim como em outras doenças associadas, a CCS tem sido relacionada a uma elevada carga proviral. As células T regulatórias (T_{reg}) são importantes na manutenção da homeostase do sistema imunológico e um comprometimento da imunoregulação exercido por elas pode contribuir para o ambiente inflamatório observado na CCS. Este estudo objetivou avaliar os linfócitos Treg de pacientes com CCS associada à infecção pelo HTLV-1. Foram realizados ensaios de imunofenotipagem por citometria de fluxo para avaliar a frequência de linfócitos T ativados ($HLA-DR^+$) e de células T $CD4^+$ e $CD8^+$ regulatórias ($FOXP3^+$), bem como a produção de IL-10 e TGF- β por estas células. Foram avaliados 37 pacientes infectados pelo HTLV-1 e assintomáticos para HAM/TSP, sendo 27 com diagnóstico positivo para a manifestação ocular (CCS), 10 com diagnóstico negativo (ASS), além de 17 voluntários não infectados pelo vírus (NI). As frequências de linfócitos T $CD4^+FOXP3^+$, $CD8^+FOXP3^+$, $CD4^+HLA-DR^+$ e $CD8^+HLA-DR^+$ foram significativamente maiores nos grupos CCS e ASS, quando comparados aos indivíduos não infectados. Quanto à produção das citocinas imunossupressoras, foi observada uma maior frequência de linfócitos T $CD4^+FOXP3^+$ duplo produtores de IL-10 e TGF- β no grupo CCS quando comparado ao grupo ASS. Com relação aos linfócitos $CD8^+FOXP3^+$, o grupo CCS apresentou uma maior frequência de células mono produtoras de IL-10 quando comparado ao ASS. Nossos resultados sugerem que a menor frequência de células Treg $CD8^+$ produtoras de TGF- β em indivíduos infectados pelo HTLV-1 com CCS, pode contribuir para a intensificação da ativação celular e fisiopatologia da doença.

Palavras chave: HTLV-1, ceratoconjuntivite seca, linfócitos T regulatórias.

NASCIMENTO, Regina Santos. Regulatory T cells and evaluation of T lymphocytes activation profile in keratoconjunctivitis sicca associated with HTLV-1. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2015.

SUMMARY

HTLV-1 is the causative agent of leukemia/lymphoma adult T-cell (ATLL), tropical spastic paraparesis / myelopathy associated with HTLV-1 (HAM / TSP) and uveitis. In addition, keratoconjunctivitis sicca (KCS), a multifactorial disease of the tear and of the ocular surface, has been more frequently reported in patients infected with HTLV-1. As for other HTLV-1-associated diseases, KCS has been related to a high proviral load. Regulatory T (Treg) cells are important in maintaining the homeostasis of the immune system. An impairment in the immunoregulation function of Treg may contribute to the inflammatory environment observed in the KCS. This study aimed to evaluate the Treg cells of patients with KCS associated with HTLV-1. Frequency of activated T cells (HLA-DR⁺) and CD4⁺ and CD8⁺ Treg cells (FOXP3⁺), as well as IL-10 and TGF- β production by Treg were quantified using flow cytometry. Thirty-seven HTLV-1 individuals were included (27 asymptomatic for HAM/TSP with positive diagnosis of ocular manifestation (KCS), 10 with negative diagnosis (ASS - asymptomatic). Seventeen non-infected individuals were included as controls (NI). The frequencies of CD4⁺ FOXP3⁺ T cells, CD8⁺FOXP3⁺, CD4⁺HLA-DR⁺ and CD8⁺HLA-DR⁺ were significantly higher in KCS and ASS groups when compared to non-infected individuals. As the production of immunosuppressive cytokines, a higher frequency of CD4⁺ FOXP3⁺ double producers of IL-10 and TGF- β in the KCS group was observed when compared to group ASS. Regarding the CD8⁺FOXP3⁺ lymphocytes, the KCS group had a higher frequency of mono cells producing IL-10 when compared to the ASS. Our results suggest that the lower frequency of Treg cells CD8⁺ TGF- β -producing in individuals infected with HTLV-1 with KCS, may contribute to the intensification of cellular activation and pathophysiology of the disease.

Keywords: HTLV-1, keratoconjunctivitis sicca, regulatory T lymphocytes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura morfológica do HTLV-1.....	21
Figura 2. Estrutura genômica do HTLV-1	22
Figura 3. Sinapse viral.....	24
Figura 4. Distribuição do HTLV-1 no mundo.....	25
Figura 5. Taxa de prevalência do HTLV-1/2 em doadores de sangue no Brasil	26
Figura 6. Mecanismos básicos de supressão mediados por células Treg.....	34
Figura 7. Fluxograma da estratégia experimental.....	38
Figura 8. Fluxograma da estratégia de análise dos linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ expressando HLA-DR.....	40
Figura 9. Fluxograma da estratégia utilizada para análise da frequência de linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ expressando FOXP3	41
Figura 10. Fluxograma da estratégia utilizada para análise da frequência de linfócitos T CD4 ⁺ FOXP3 ⁺ e CD8 ⁺ FOXP3 ⁺ positivos para TGF-β e IL-10	43
Figura 11. Frequência do fenótipo de ativação HLA-DR em linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺	46
Figura 12. Frequência da expressão de FOXP3 em linfócitos T CD4 ⁺	47
Figura 13. Frequência da expressão de FOXP3 em linfócitos T CD8 ⁺	48
Figura 14. Produção de TGF-β e IL-10 em linfócitos T CD4 ⁺ com perfil regulatório.....	49
Figura 15. Produção de TGF-β e IL-10 em linfócitos T CD8 ⁺ com perfil regulatório.....	50
Figura 16. Correlação entre a frequência de células T ativadas, subpopulações de linfócitos T regulatórios e a carga proviral.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características dos indivíduos incluídos nos grupos de estudo	45
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	= Microlitros
APC	= Aloficocianina
ASS	= Portador do HTLV-1 assintomático para HAM/TSP
ATLL	= Leucemia/linfoma de células T do adulto
BSA	= Albumina sérica bovina
CCS	= Ceratoconjuntivite seca
CD	= <i>Cluster of differentiation</i>
CHTLV	= Centro de Referência de Portadores do HTLV
CMSP	= Células mononucleares de sangue periférico
CPV	= Carga provial
CTL	= Linfócitos T citotóxicos
CTLA-4	= Antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico
DNA	= Ácido desoxirribonucleico
EDTA	= Ácido etilenodiamino tetra-acético
env	= Envelope
FBDC	= Fundação Bahiana para o Desenvolvimento das Ciências
FITC	= Isotiocianato de fluoresceína
FSC	= <i>Forward scatter</i>
gag	= Grupo antigênico
GLUT-1	= Transportador de glicose-1
HAM/TSP	= Mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical
HIV	= Vírus da imunodeficiência humana
HLA-DR	= Antígeno leucocitário humano-DR
HSPGs	= Proteoglicanas de heparan sulfato
HTLV	= Vírus linfotrópico de células T humanas
IL	= Interleucina
KDa	= Kilodalton
LTR	= <i>Long terminal repeats</i>
MHC	= Complexo principal de histocompatibilidade
mL	= Mililitros
NI	= Não infectado

NK	= Células <i>natural killer</i>
NKT	= Células T <i>natural killer</i>
Nm	= Nanômetros
OMS	= Organização Mundial da Saúde
PBS	= Tampão salina fosfato
PCR	= Reação em cadeia da polimerase
PE	= Ficoeritrina
pol	= Polimerase
RNA	= Ácido ribonucleico
RNA_m	= Ácido ribonucleico mensageiro
RPM	= Rotações por minuto
SSC	= <i>Side scatter</i>
STLV	= Vírus linfotrópico de células T em Símios
TCM	= Células T de memória central
TCR	= Receptor de células T
TNF	= Fator de necrose tumoral
TGF-β	= Fator de crescimento transformante beta
Treg	= Células T regulatórias

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	HISTÓRICO DO VÍRUS LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T HUMANAS.....	20
2.2	ESTRUTURA DO HTLV-1	20
2.3	ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO HTLV-1	21
2.4	CICLO DE REPLICAÇÃO VIRAL DO HTLV-1	23
2.5	TRANSMISSÃO E EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO PELO HTLV-1.....	24
2.6	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS ASSOCIADAS À INFECÇÃO PELO HTLV-1	27
2.6.1	Ceratoconjuntivite Seca (CCS).....	29
2.7	RESPOSTA IMUNE NA INFECÇÃO PELO HTLV-1.....	31
2.7.1	Células T Regulatórias na Infecção pelo HTLV-1.....	32
3	HIPÓTESE	36
4	OBJETIVOS	37
4.1	GERAL	37
4.2	ESPECÍFICOS	37
5	MATERIAL E MÉTODOS	38
5.1	DESENHO DO ESTUDO	38
5.2	PACIENTES	38
5.3	AVALIAÇÃO DO FENÓTIPO DE ATIVAÇÃO.....	38
5.4	AVALIAÇÃO DO FENÓTIPO REGULATÓRIO	40
5.5	OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO.....	41
5.6	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE IL-10 E TGF-B EM CÉLULAS CD4 ⁺ E CD8 ⁺ ...	42
5.7	EXTRAÇÃO DE DNA E QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PROVIRAL DO HTLV-1	43
5.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
5.9	ASPECTOS ÉTICOS.....	44
6	RESULTADOS	45
6.1	CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO	45
6.2	FREQUÊNCIA DA EXPRESSÃO DE HLA-DR NOS LINFÓCITOS T CD4 ⁺ E CD8 ⁺	45

6.3	FREQUÊNCIA DA EXPRESSÃO DE FOXP3 NOS LINFÓCITOS T CD4 ⁺ E CD8 ⁺ ...	47
6.4	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO INTRACELULAR DE TGF-B E IL-10 EM LINFÓCITOS T CD4 ⁺ E CD8 ⁺ COM PERFIL REGULATÓRIO	48
6.5	CORRELAÇÃO ENTRE A CARGA PROVIRAL, FREQUÊNCIA DE CÉLULAS T ATIVADAS E SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T REGULATÓRIOS.....	50
7	DISCUSSÃO	52
8	CONCLUSÃO	56
	REFERÊNCIAS	57
	APÊNDICE	72

1. INTRODUÇÃO

O vírus linfotrófico de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1) foi o primeiro retrovírus humano descrito associado a manifestações patológicas. Sua transmissão ocorre via horizontal, vertical e parenteral. Estima-se que a infecção acomete cerca de 5 a 10 milhões de pessoas no mundo (GESSAIN; CASSAR, 2012), sendo consideradas áreas endêmicas o sudoeste do Japão, países do Caribe, África Equatorial, América do sul e áreas localizadas no Irã e Melanésia. (DE THE; BOMFORD, 1993; GESSAIN; CASSAR, 2012; MUELLER et al., 1996). No Brasil, a cidade de Salvador se destaca por apresentar uma elevada prevalência na população geral - 1,76% - de indivíduos infectados por este retrovírus (DOURADO et al., 2003).

A infecção pelo HTLV-1 está etiologicamente associada ao linfoma/leucemia de células T do adulto (ATLL), à paraparesia espástica tropical/ mielopatia associada ao HTLV-1 (HAM/TSP) e à uveíte (GESSAIN et al., 1985; MOCHIZUKI et al., 1992; POIESZ et al., 1980). Além destas, outra doença oftalmológica tem sido relacionada a esta infecção viral, a ceratoconjuntivite seca (CCS) (MERLE et al., 2002; RATHSAM-PINHEIRO et al., 2009). A doença do olho seco ou CCS é uma patologia multifatorial caracterizada por aumento da osmolaridade do filme lacrimal e inflamação da superfície ocular, com sintomas de desconforto e alteração visual, e potencial dano a superfície ocular (The definition and classification of dry eye disease: report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop, 2007)

Em indivíduos infectados pelo vírus, a prevalência de CCS é maior naqueles que têm diagnóstico de HAM/TSP, quando comparados a indivíduos sem a mielopatia (MERLE et al., 2002; RATHSAM-PINHEIRO et al., 2009). Um aumento da carga proviral é frequentemente observado em pacientes com doenças associadas à infecção, particularmente aqueles com HAM/TSP, dermatite infecciosa e uveíte (GRASSI et al., 2011; NAGAI et al., 1998; OLINDO et al., 2005; PRIMO et al., 2009). Recentemente, Vargens e colaboradores demonstraram uma associação entre a carga proviral elevada e a presença de CCS em pacientes infectados pelo HTLV-1 (CASTRO-LIMA VARGENS et al., 2011). No entanto, não existem dados sobre a imunopatogênese da CCS na infecção pelo vírus.

As células T regulatórias (T_{reg}) representam uma subpopulação de células T importantes na manutenção da homeostase do sistema imunológico. Essas células podem estar envolvidas na imunopatogênese da infecção pelo HTLV-1, uma vez que

suprimem a ativação dos linfócitos T citotóxicos, importantes na limitação da replicação do HTLV-1, suscitando a manutenção da carga proviral (HORI; NOMURA; SAKAGUCHI, 2003). Os estudos conduzidos sobre este tema revelam dados discordantes. Enquanto alguns trabalhos apontam uma menor frequência de células Treg ($CD4^+CD25^+FOXP3^+$ e $CD4^+CD25^{high}CTLA-4^+$) em indivíduos com HAM/TSP, comparados a não infectados (MICHAELSSON et al., 2008; YAMANO et al., 2005), outros mostram um maior percentual de Treg ($CD4^+FOXP3^+Tax^-$ e $CD4^+FOXP3^+$) nos indivíduos infectados pelo retrovírus (BEST et al., 2009; SATOU et al., 2012; TOULZA et al., 2008). Além disso, a frequência de células Treg foi inversamente correlacionada à taxa de lise mediada pelos CTLs (TOULZA et al., 2008), e com a carga proviral (MICHAELSSON et al., 2008). Outros estudos demonstram um efeito supressor da proteína viral Tax na expressão de FOXP3, crítico para o desenvolvimento e função das células Treg (YAMANO et al., 2005). Deste modo, o comprometimento da imunorregulação exercido pelas células T regulatórias, pode contribuir para o ambiente inflamatório observado em doenças como a HAM/TSP e a CCS.

Há poucos trabalhos que avaliam o envolvimento das células Treg no desenvolvimento da HAM/TSP e de outras doenças associadas à infecção pelo HTLV-1, como a CCS. A condução deste estudo visou auxiliar na compreensão do papel dos linfócitos T regulatórios no contexto dos mecanismos de patogênese da referida manifestação ocular em indivíduos portadores deste retrovírus. Nossa hipótese é que o comprometimento funcional das células Treg potencialize a ativação celular, contribuindo para o desenvolvimento da CCS em indivíduos infectados pelo HTLV-1.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HISTÓRICO DO VÍRUS LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T HUMANAS

Em 1977, Uchiyama e colaboradores descreveram no Japão o linfoma/leucemia de células T do adulto (ATLL), patologia causada pelo vírus da leucemia de células T do adulto (ATLV) (HINUMA et al., 1981; UCHIYAMA et al., 1977). Nessa mesma década, um grupo de pesquisadores liderado por Robert Gallo nos Estados Unidos isolou, a partir da amostra de um paciente com linfoma cutâneo de células T, um retrovírus denominado de vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV), sendo este o primeiro retrovírus humano descrito. (POIESZ et al., 1980). Após análises, foi concluído que o ATLTV e o HTLV se tratavam de um mesmo vírus, denominado posteriormente de HTLV-1 (WATANABE; SEIKI; YOSHIDA, 1984). O retrovírus foi associado à paraparesia espástica tropical (TSP) no Caribe (GESSAIN et al., 1985), e a mielopatia associada ao HTLV-1 (HAM) no Japão. Estudos posteriores revelaram que a TSP e a HAM eram a mesma patologia neurológica, sendo denominada a partir de então de paraparesia espástica tropical/ mielopatia associada ao HTLV-1 (HAM/TSP) (OSAME, 1990).

O HTLV-2 foi identificado, em 1982, em um paciente com leucemia de células pilosas (KALYANARAMAN et al., 1982). Diferente da infecção pelo HTLV-1, na qual existe clara associação com doença, nenhuma patologia foi associada ao tipo 2 apesar de relatos de casos de indivíduos infectados apresentando sintomas neurológicos (BIGLIONE et al., 2003; BISWAS et al., 2009; HJELLE et al., 1992; JACOBSON et al., 1993; SODROSKI, 1992). Mais recentemente, em 2005, foram descritos o HTLV-3 e o HTLV-4 em indivíduos do sul de Camarões. Não foram estabelecidas associações patológicas a esses dois novos tipos virais e não foi evidenciada a possibilidade de transmissão entre humanos (CALATTINI et al., 2005; WOLFE et al., 2005).

2.2 ESTRUTURA DO HTLV-1

O HTLV-1 pertence à família Retroviridae, subfamília Orthoretrovirinae e ao gênero Deltaretrovirus. Sua estrutura morfológica se assemelha a de outros retrovírus. As partículas virais são esféricas e possuem um tamanho de aproximadamente 80 a 100 nanômetros de diâmetro (FRANCHINI et al., 1995) (**Figura 1**).

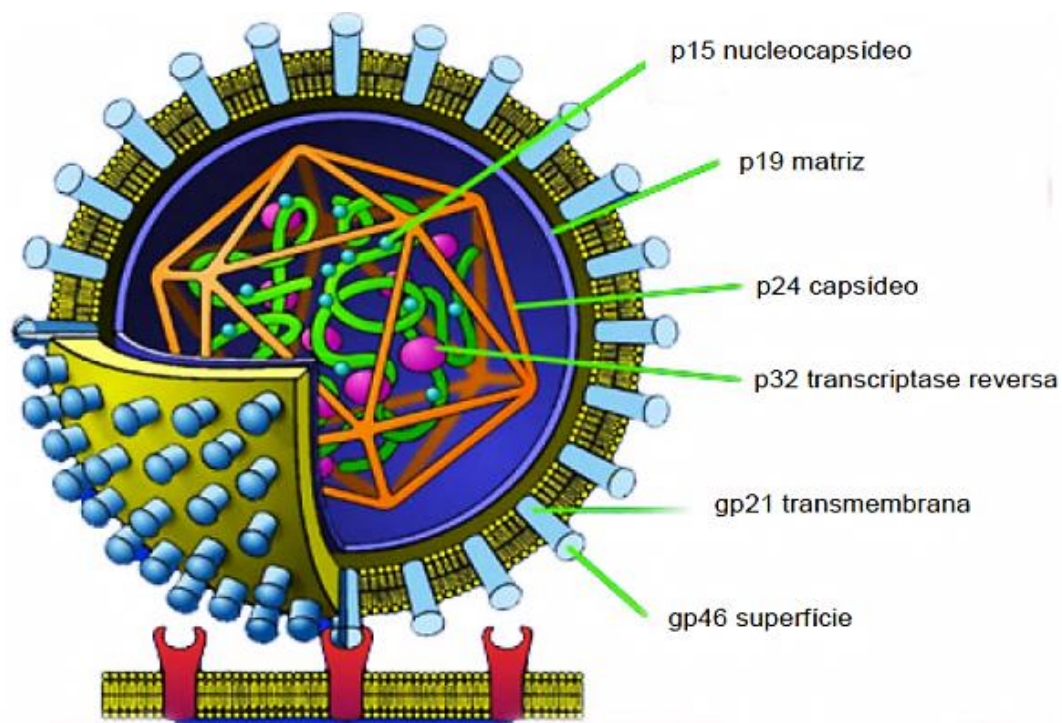


Figura 1. Estrutura morfológica do HTLV-1. (Fonte: <http://researchnews.osu.edu/archive/htlvil2pics.htm>)

O envelope viral apresenta a glicoproteína de superfície denominada gp46, e a glicoproteína transmembrana gp21, que ancora a gp46. Junto à membrana do envelope encontra-se a matriz viral composta pela proteína p19. O capsídeo, de simetria icosaédrica, é constituído pela proteína p24 que constitui o cerne da partícula viral. No interior do capsídeo localiza-se o genoma viral, constituído por duas fitas de RNA senso positivo associadas a proteínas, tais como, p15 do nucleocapsídeo, transcriptase reversa, RNase H e integrase.

2.3 ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO HTLV-1

O genoma viral apresenta 9032 pares de bases, sendo constituídos pelos genes estruturais *gag* (grupo antigênico), *pol* (polimerase) e *env* (envelope), além da região *pX*, na qual se encontram os genes regulatórios *tax* e *rex* (SEIKI et al., 1983). Esses genes são flanqueados por duas regiões repetidas localizadas nas extremidades do genoma viral e denominadas LTR (*long terminal repeats*) (**Figura 2**). As sequências nucleotídicas dessa região são fundamentais para a integração do DNA proviral ao DNA

cromossômico da célula hospedeira e para a regulação transcricional do genoma do vírus (KOHTZ et al., 1988; YOSHIDA, 2001).

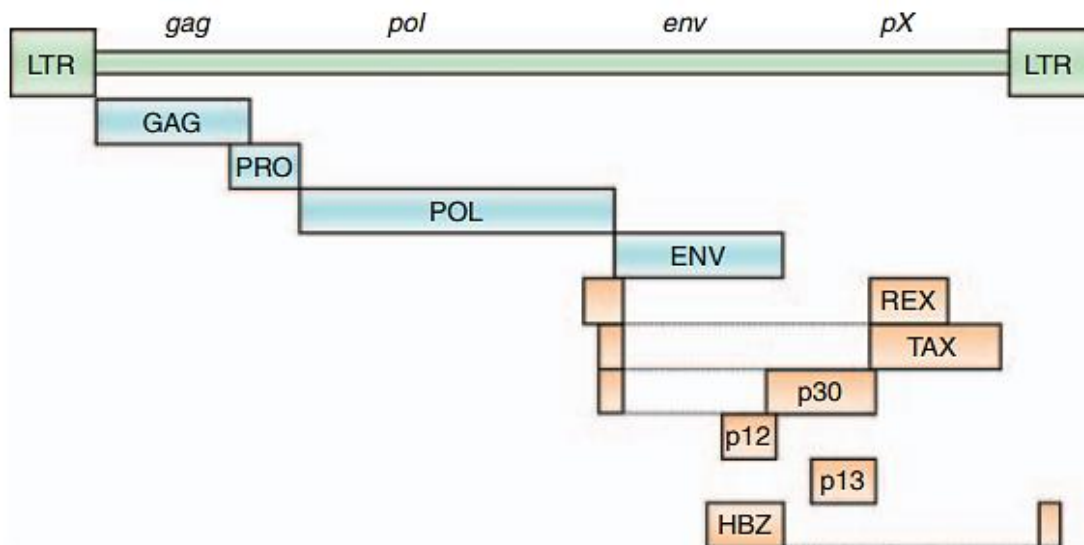


Figura 2. Estrutura genômica do HTLV-1 (BOXUS; WILLEMS, 2009).

As proteínas do envelope viral gp46 e gp21 são transcritas pelo gene *env*. O gene *gag* é responsável pela síntese das proteínas da matriz, do capsídeo e do nucleocapsídeo – p19, p24 e p15, respectivamente. O gene *pol* codifica as proteínas transcriptase reversa, integrase, RNase H e endonuclease. O gene *rex* codifica a proteína Rex (p27^{rex}), que desempenha um papel importante na regulação pós transcricional da expressão de genes virais. O gene *tax* codifica a fosfoproteína nuclear Tax (p40^{tax}), que age como um ativador transcricional, ao interagir com fatores de transcrição celular e induzir a ligação destes a sítios específicos na região LTR do genoma proviral. A transcrição de vários genes celulares é ativada ou reprimida por meio da atividade de Tax. Dentre os genes que podem sofrer um aumento de expressão via Tax, pode-se destacar a interleucina 1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-6, IL-2R α (cadeia α do receptor para IL-2 – CD25), PDGF (fator de crescimento derivado de plaqueta), PTHrP (proteína relacionada ao hormônio paratireoide), vimetina (proteína do citoesqueleto), TNF- β (fator de necrose tumoral), GM-CSF (fator estimulante de colônias de macrófago-granulócito), MHC-1 (complexo principal de histocompatibilidade classe 1), TGF- β 1 (fator transformador de crescimento), NK- κ B, (fator nuclear κ B) e os protooncogenes *c-fos*, *c-myc* e *egr-1* (FERREIRA; PLANELLES; ROSENBLATT, 1997; FRANCHINI et al., 1995).

Na região pX também são codificadas as proteínas acessórias p12, p13 e p30 que contribuem para a infectividade viral, aumento da carga proviral, ativação das células do hospedeiro e regulação da transcrição gênica (BINDHU; NAIR; LAIRMORE, 2004). Nessa mesma região também é codificada a proteína HBZ, que pode atuar na regulação da transcrição viral e aumento da proliferação de linfócitos T (MESNARD; BARBEAU; DEVAUX, 2006).

2.4 CICLO DE REPLICAÇÃO DO HTLV-1

O ciclo de replicação viral inicia-se a partir da ligação do vírus a célula hospedeira. A glicoproteína de superfície gp46 se liga a moléculas presentes na superfície da célula, tais como proteoglicanos heparan-sulfato, neutrofilina-1 e o transportador de glicose GLUT-1, que é recrutado para o local de adesão e auxilia no processo de fusão das membranas viral e celular (JIN et al., 2006; MANEL et al., 2005). No interior da célula hospedeira, a enzima transcriptase reversa promove a transcrição do genoma viral de RNA em DNA de fita dupla. Subsequentemente o RNA molde é degradado pela ação da RNase H. A integrase permite a integração do provírus ao DNA da célula hospedeira, a partir de então ocorre a síntese do RNA mensageiro e RNA genômico, levando a formação das proteínas virais traduzidas nos ribossomos celulares, sendo todo este processo mediado por enzimas do hospedeiro (SEIKI et al., 1984).

Entretanto, a replicação do HTLV-1 ocorre principalmente devido à expansão clonal, via mitose das células infectadas, em detrimento do processo via transcriptase reversa, descrita como uma enzima de altas taxas de erro (PRESTON; DOUGHERTY, 1996). Além disso, o vírus é capaz de realizar um fenômeno denominado sinapse viral, induzindo eventos de polarização nas células infectadas, com a formação de um canal proteico na junção célula-célula que permite a passagem de proteínas virais para células não infectadas (IGAKURA et al., 2003). **(Figura 3)**

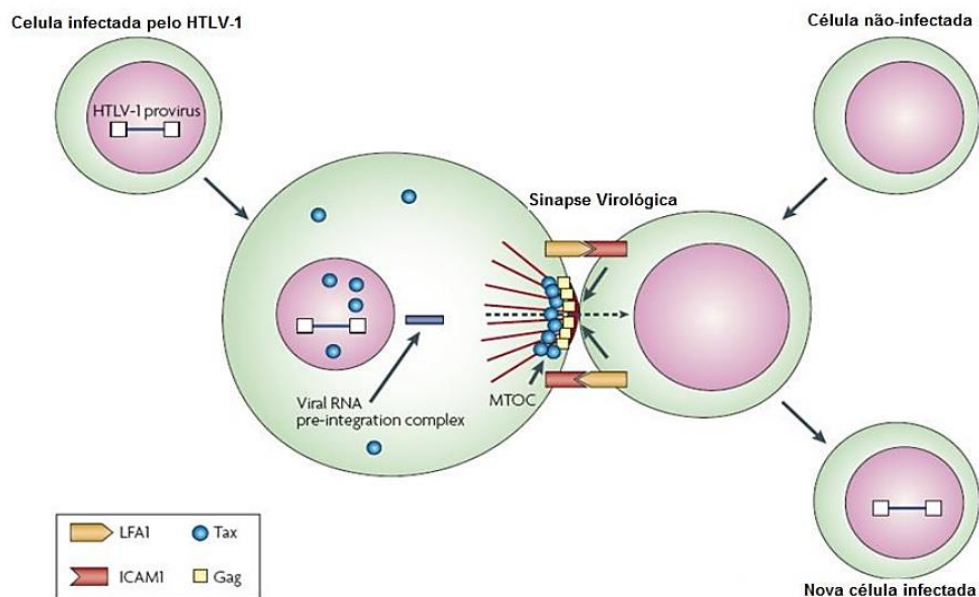


Figura 3. Sinapse Viral. Adaptado de (MATSUOKA; JEANG, 2007).

Além da replicação viral via transcriptase reversa, e da sinapse viral, estudos mais recentes identificaram aglomerados de estruturas ricas em carboidratos e partículas virais maduras, semelhantes a biofilmes na superfície de células infectadas. Esses achados sugerem uma nova via de transmissão do vírus, tendo em vista que essas estruturas facilitam o contato entre linfócitos infectados e não infectados, favorecendo a transmissão viral (PAIS-CORREIA et al., 2010).

2.5 TRANSMISSÃO E EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO PELO HTLV-1

Estudos epidemiológicos demonstram que a infecção pelo tipo 1 do HTLV é a mais amplamente disseminada mundialmente. Sua transmissão ocorre principalmente por três vias: horizontal, com uma maior eficiência da transmissão do homem para a mulher (NAKANO et al., 1984; PROIETTI et al., 2005); vertical, por transmissão transplacentária, durante o parto ou, principalmente, durante a amamentação (KINOSHITA et al., 1984; SAJI et al., 1990; TAJIMA et al., 1982); e parenteral, via fração celular sanguínea infectada (INABA et al., 1999).

As taxas de soroprevalência variam de acordo com a área geográfica, condições socioeconômicas e comportamentos de risco individuais. Estima-se que cerca de 5 a 10 milhões de pessoas em todo o mundo estejam infectadas (GESSAIN; CASSAR, 2012).

No entanto, é importante salientar que a maior parte dos dados acerca da prevalência da infecção pelo HTLV-1 é proveniente de grupos populacionais específicos, como doadores de sangue, mulheres grávidas, pacientes com patologias neurológicas ou hematológicas e usuários de drogas intravenosas, o que pode não ser considerado representativo da população geral (CATALAN-SOARES; CARNEIRO-PROIETTI; PROIETTI, 2005). Apenas um estudo, realizado em Salvador-Bahia, avaliou a prevalência da infecção pelo HTLV-1 em uma amostra de base populacional (HLELA et al., 2009).

Algumas regiões são consideradas endêmicas para esta infecção viral como o sudoeste do Japão, países do Caribe, África equatorial, áreas localizadas no Irã e Melanésia, e América do Sul (GESSAIN, 1996; GESSAIN; CASSAR, 2012; GESSAIN; MAHIEUX, 2012; MUELLER, 1991; YAMAGUCHI, 1994). (**Figura 4**)



Figura 4. Distribuição do HTLV-1 no mundo. Adaptado de (GESSAIN; CASSAR, 2012).

No Brasil, estima-se que haja cerca de 2,5 milhões de pessoas infectadas (CARNEIRO-PROIETTI et al., 2002). Entre doadores de sangue, as maiores prevalências encontradas foram nos estados do Maranhão, Bahia, Pará e Pernambuco (CATALAN-SOARES et al., 2005). Um estudo multicêntrico, realizado em doadores de sangue, revelou Salvador como a cidade brasileira com a maior prevalência da

infecção (1,35%) (GALVAO-CASTRO et al., 1997). Em 2003, um estudo de base populacional demonstrou que a prevalência geral em Salvador era de 1,76%, com uma maior soroprevalência associada ao sexo feminino, aumentando substancialmente entre os indivíduos com mais de 51 anos (DOURADO et al., 2003). (**Figura 5**)

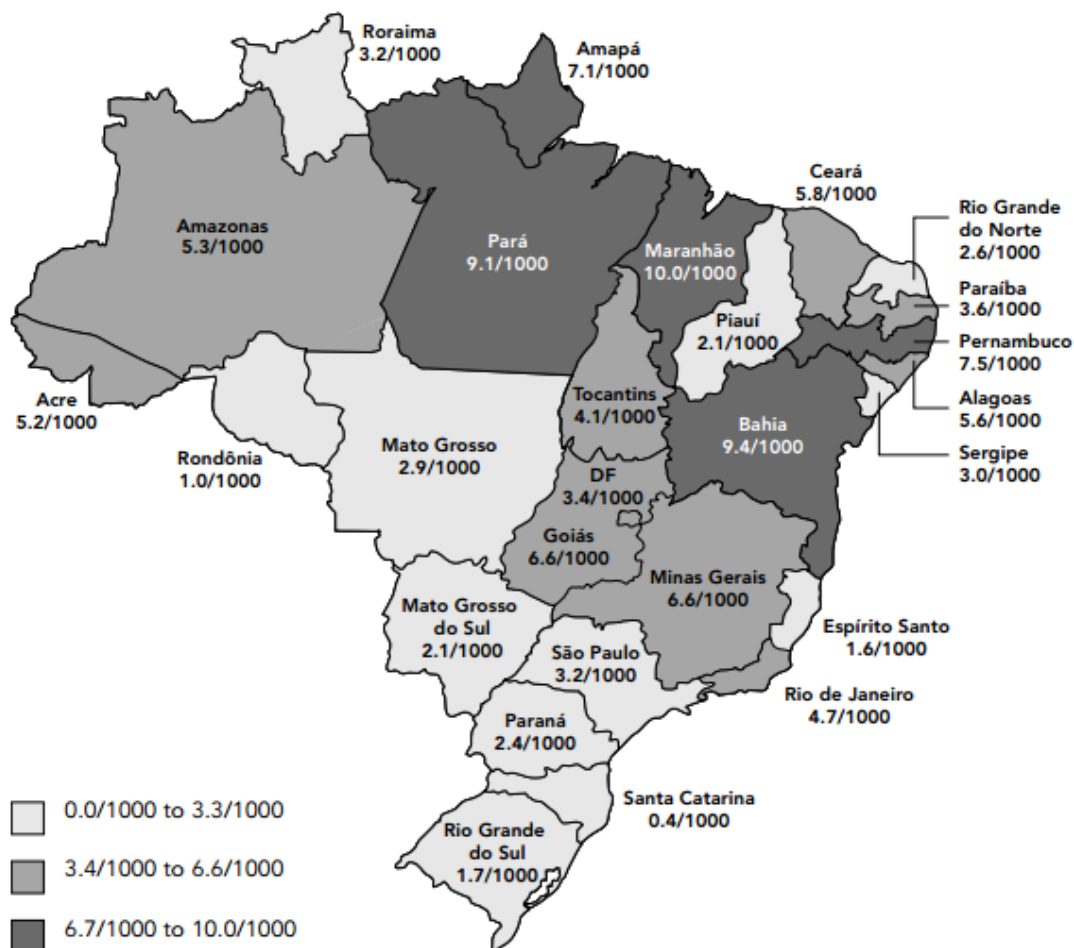


Figura 5. Taxa de prevalência do HTLV-1/2 em doadores de sangue no Brasil. (CATALAN-SOARES et al., 2005).

2.6 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS ASSOCIADAS À INFECÇÃO PELO HTLV-1

As doenças associadas a esta infecção podem ser classificadas em três categorias: doenças neoplásicas, síndromes inflamatórias e complicações infecciosas (VERDONCK et al., 2007). A leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL) e a mielopatia associada ao HTLV-1/ paraparesia espástica tropical (HAM/TSP) são as principais patologias associadas ao vírus. As taxas de incidência e prevalência de ambas apresentam significativa heterogeneidade geográfica, estando presentes em todas as

áreas endêmicas para a infecção (PROIETTI et al., 2005). Estima-se que a ATLL e a HAM/TSP ocorram em cerca de 5% dos indivíduos acometidos por este retrovírus (KAPLAN et al., 1990; MURPHY et al., 1989).

A ATLL é uma forma grave de neoplasia caracterizada pela expansão clonal e infiltração de células T CD4⁺ malignas nos linfonodos, fígado, baço, trato gastrointestinal, pulmões e pele, sendo frequente a presença de células T anormais com núcleo lobulado ou em forma de flor (*flower cells*) (MATSUOKA, 2005). O período de latência entre o início da infecção e o desencadeamento da doença pode variar de 18 a 30 anos (MURPHY et al., 1989; TAJIMA et al., 1982). A ATLL é geralmente categorizada em quatro subtipos clínicos: aguda, crônica, *smouldering* e linfomatosa (SHIMOYAMA, 1991). As formas aguda e linfomatosa são consideradas as mais agressivas, com um tempo médio de sobrevida de 6 meses para pacientes com o tipo agudo, e de 10 meses para aqueles com a forma linfomatosa. A quimioterapia não aumenta a sobrevida livre da doença e a ATLL permanece como uma patologia de tratamento insatisfatório (YAMAGUCHI; WATANABE, 2002).

A HAM/TSP é uma doença inflamatória crônica e progressiva do sistema nervoso central que leva à paraparesia dos membros inferiores. Trata-se de uma patologia caracterizada por lesão e desmielinização da medula espinhal. Em cerca de 60% dos pacientes acometidos, a fraqueza dos membros inferiores é o primeiro sintoma (ARAUJO; SILVA, 2006). Durante o curso da doença a disfunção da bexiga é muito comum, como noctúria, urgência e incontinência. Outros sintomas comumente relatados são dor lombar e em músculos de membros inferiores, parestesia, espasticidade, prisão de ventre, e impotência sexual (ARAUJO; SILVA, 2006; LEPOUTRE et al., 2009; OSAME et al., 1997). A HAM/TSP avança mais rápido em mulheres do que em homens, e entre as mulheres, a progressão é mais rápida naquelas cujo início da patologia se dá antes da menopausa. A razão para esta diferença entre ambos os sexos é desconhecida, mas é possível que os hormônios sexuais contribuam para o desenvolvimento da doença (LIMA; BICA; ARAUJO et al., 2005). O curso da patologia ocorre de maneira variável, podendo ser de forma rápida ou muito lentamente, sem possibilidade de remissão (ARAUJO; SILVA, 2006). Há casos bem documentados de desenvolvimento da HAM/TSP dentro de poucos meses após a infecção por produtos sanguíneos contaminados, o que contrasta fortemente do ATLL, que geralmente se desenvolve após décadas de incubação (BANGHAM, 2000; TAJIMA, 1990).

Outras associações têm sido descritas desde a descoberta do vírus. Estas incluem a uveíte (MOCHIZUKI et al., 1992), polimiosite, (OSAME et al., 1997), artrite (MURPHY et al., 2004; NISHIOKA; SUMIDA; HASUNUMA, 1996), dermatite infectiva (GONCALVES et al., 2003; LAGRENADE et al., 1990), ceratoconjuntivite seca (MERLE et al., 2002; RATHSAM-PINHEIRO et al., 2009), tireoidite (KAWAI et al., 1992), e pneumonia bronco-alveolar (KIMURA, 1992). No entanto, com exceção da HAM/TSP, ATLL e uveíte, existe a necessidade de mais evidências para que seja comprovada a associação etiológica entre o vírus e essas doenças.

A uveíte associada ao HTLV (HUA) pode ser encontrada em pacientes com a mielopatia (HAM/TSP), ou como manifestação isolada na infecção viral, sem estar acompanhada de outros sintomas (BUGGAGE, 2003; OHBA et al., 1989; YAMAMOTO et al., 1999). Uveíte é a inflamação parcial ou total do trato uveal, composto pela íris, coroide e corpo ciliar. A HUA é caracterizada pela infiltração celular dos tecidos oculares e por vasculite retiniana moderada. Os resultados de estudos acerca da soroprevalência da doença são controversos em diferentes partes do mundo. No Japão foi encontrada a maior prevalência de HUA, com 35,4% de soropositividade (MOCHIZUKI et al., 1992). Já na Martinica observou-se uma prevalência de 14,5% (MERLE et al., 2002). No Brasil, a prevalência de HUA é bem menor que as encontradas no Japão - 1,9% (RATHSAM-PINHEIRO et al., 2009) e 2,8% (YAMAMOTO et al., 1999). Na Martinica e no Brasil, a ceratoconjuntivite seca possui uma prevalência maior do que a HUA.

2.6.1 Ceratoconjuntivite seca

Além da uveíte, outros distúrbios oftalmológicos têm sido descritos em indivíduos infectados pelo HTLV-1, tais como infiltração tumoral do olho e órbita em pacientes com ATLL (LAUER et al., 1988), vasculite e exsudação na retina periférica (LEVY-CLARKE et al., 2002), degeneração retiniana (NAKAO et al., 1989), ceratoconjuntivite seca (MERLE et al., 2002) e lesões na córnea (BUGGAGE; LEVY-CLARKE; SMITH, 2001).

A doença do olho seco ou ceratoconjuntivite seca (CCS) consiste em uma doença multifatorial da lágrima e da superfície ocular, relacionada ao aumento da evaporação e/ou diminuição da produção de lágrimas (LEMP, 1995; SCHULTZ, 2014). A maioria dos sintomas ocorre devido a uma inflamação crônica da unidade funcional lacrimal,

constituída pela córnea, conjuntiva, glândulas lacrimais e inervação de interligação, resultando na perda da integridade e função normal do filme lacrimal. Isto leva a inadequação no volume e/ou composição lacrimal necessária à reparação de danos provocados pelas múltiplas agressões a que o olho é constantemente submetido, como a ação de microorganismos e até mesmo o simples ato de piscar (FRIDMAN et al., 2004; STERN; PFLUGFELDER, 2004).

Dentre os sintomas relatados estão o desconforto ocular (sensação de corpo estranho, prurido, hiperemia, ardência e dor), distúrbio visual e instabilidade do filme lacrimal, com potencial dano à superfície ocular (LEMP, 2008; SCHULTZ, 2014). Os sintomas costumam ser mais amenos pela manhã devido ao fechamento noturno dos olhos, o que permite que haja a recuperação do filme lacrimal, sendo à tarde e à noite os períodos nos quais os sintomas tendem a se intensificar (FARRIS, 1986). O desconforto pode piorar com o uso do computador, televisão e leitura por um tempo prolongado, e em ambientes secos, com ar condicionado, excesso de poeira e vento (FELBERG; DANTAS, 2006; KASSAN; MOUTSOPOULOS, 2004). São apontadas como condições associadas ao desenvolvimento de CCS o aumento da idade, sexo feminino (principalmente após a menopausa), alterações hormonais, o uso de lentes de contato por um longo tempo, medicações sistêmicas como alguns anti-histamínicos e antidepressivos, alcoolismo e tabagismo (GAYTON, 2009; TERRY, 2001).

A doença pode ser classificada em dois tipos: olho seco evaporativo ou olho seco por deficiência aquosa. O olho seco evaporativo está relacionado ao aumento da evaporação lacrimal e pode ser causado por várias doenças como blefarite, psoríase, rosácea, conjuntivite alérgica e distúrbios de pálpebra, como paralisia do nervo facial e doença de Graves. A principal causa de olho seco por deficiência aquosa é a Síndrome de Sjogren (SS), doença auto-imune sistêmica que afeta glândulas salivares e lacrimais. Além da SS, outras doenças podem levar a diminuição da produção do filme lacrimal, tais como o lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatoide, esclerose múltipla, diabetes, além de infecções virais, como pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e pelo vírus da hepatite C (HCV). Entretanto, estudos mostram que os dois mecanismos geralmente coexistem, e que a forma evaporativa isolada é mais comum que a deficiência aquosa isolada (FONSECA; ARRUDA; ROCHA, 2010; FOX, 1994; LEMP, 2008; VALIM et al., 2014).

A prevalência mundial da CCS é estimada em 6 a 34%, a depender da população estudada, sendo mais comum em pessoas com idade superior a 50 anos, principalmente mulheres (VALIM et al., 2014). Em indivíduos infectados pelo HTLV-1, a prevalência da CCS é maior em indivíduos com HAM/TSP, quando comparados aos indivíduos sem a mielopatia. Em um estudo realizado na Martinica, 37% dos infectados pelo vírus foram diagnosticados com CCS, sendo a frequência dessa patologia ocular duas vezes maior nos portadores da mielopatia quando comparados aos pacientes soropositivos. No grupo controle não infectado deste mesmo estudo, 5% dos indivíduos tinham CCS (MERLE et al., 2002). No Brasil, um estudo realizado em 2009 diagnosticou a CCS em 36,4% dos pacientes infectados pelo HTLV-1, sendo a prevalência desta patologia ocular maior entre os que apresentavam HAM/TSP (RATHSAM-PINHEIRO et al., 2009). Estudos apontam uma maior carga proviral em pacientes com manifestações clínicas associadas ao vírus, principalmente a HAM/TSP (GRASSI et al., 2011; NAGAI et al., 1998), dermatite infectiva (PRIMO et al., 2009) e uveíte (ONO et al., 1995), quando comparada a carga proviral de indivíduos assintomáticos. Recentemente, um estudo brasileiro realizado em Salvador demonstrou que a maior carga proviral do HTLV-1 está associada com a presença de CCS em pacientes infectados com o vírus. Neste mesmo estudo, a ceratoconjuntivite seca foi detectada em quase metade dos infectados, sendo mais frequente nos pacientes portadores da mielopatia (CASTRO-LIMA VARGENS et al., 2011).

Aspectos clínicos, laboratoriais e histopatológicos da CCS na infecção pelo HTLV-1 são semelhantes aos observados na Síndrome de Sjogren, tida como uma das principais causas desta patologia ocular. No entanto, a presença de anticorpos contra auto-antígenos, frequentes nesta doença auto-imune, não foi relatada em pacientes infectados pelo vírus e com CCS (FERRAZ-CHAQUI et al., 2010). Estudos sugerem que a CCS associada à infecção pelo HTLV-1 seja diferente da doença do olho seco relacionada à Síndrome de Sjogren, podendo ser comparada por sua vez, a CCS que pode ocorrer na infecção pelo HIV ou HCV (MERLE et al., 1999). Em ambas as infecções virais não foram encontrados auto-anticorpos, mas sim infiltrados linfocitários nas glândulas salivares (MERLE et al., 2002).

2.7 RESPOSTA IMUNE NA INFECÇÃO PELO HTLV-1

Os linfócitos T CD4⁺ são as células preferencialmente infectadas pelo HTLV-1, constituindo o principal reservatório *in vivo* deste vírus (RICHARDSON et al., 1990). Outros tipos celulares podem ser infectados, tais como as células dendríticas, macrófagos, células da glia, linfócitos T CD8⁺ (CTLs) e linfócitos B (KNIGHT et al., 1993; NATH et al., 2003; RICHARDSON et al., 1990). O tropismo do vírus pelas células T CD4⁺ pode ser explicado pela grande quantidade de proteoglicanos de heparan sulfato presente em sua superfície celular, molécula necessária para a entrada eficiente do HTLV-1 (JONES et al., 2006).

A infecção possui caráter latente, embora induza a ativação e proliferação das células alvo. Essa ativação do sistema imunológico gera altos títulos de anticorpos, além de uma frequência elevada de CTLs específicos para a proteína viral Tax (ASQUITH et al., 2005; NAGAI et al., 1998). Os linfócitos T CD8⁺ são capazes de promover a lise de células infectadas a partir da liberação de grânulos citotóxicos contra as células alvo, sendo este o principal mecanismo de citotoxicidade mediado por esta população celular (HENKART et al., 1985). Os CTLs desempenham papel importante na limitação da replicação do HTLV-1, diminuindo conseqüentemente a carga proviral, que consiste no número de células mononucleares do sangue periférico que apresentam o DNA proviral integrado ao genoma celular, e que está diretamente relacionada com o risco de desenvolvimento de doenças associadas à infecção, como a HAM/TSP (BANGHAM, 2000; CAVROIS et al., 1996). Todavia, é possível que uma resposta imune exacerbada dos CTLs contribua para o dano tecidual observado no sistema nervoso central (SNC) de indivíduos portadores da mielopatia (JACOBSON, 2002).

Os indivíduos infectados pelo HTLV-1 apresentam proliferação espontânea *in vitro* de linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e de células NK (NORRIS et al., 2010). A proliferação espontânea consiste na capacidade das células mononucleares de sangue periférico proliferarem (*ex vivo*) na ausência de antígeno ou de suplementação de citocinas, tais como a IL-2 (KRAMER et al.). A proliferação celular representa um dos principais mecanismos de manutenção da infecção, uma vez que a propagação do vírus ocorre principalmente por divisão mitótica, com a expansão clonal das células infectadas (ASQUITH; BANGHAM, 2007; WATTEL et al., 1995). Nos indivíduos infectados pelo vírus com HAM/TSP há uma maior produção, na ausência de estímulo, das

citocinas inflamatórias IFN- γ e TNF- α , quando comparados aos infectados sem a mielopatia (SANTOS et al., 2004; KUBOTA et al., 1998; NISHIURA et al., 1996). Nos pacientes com HAM/TSP a relação entre citocinas pró-inflamatórias e a citocina moduladora IL-10 é mais elevada do que em portadores do vírus, além disso, a IL-10 modula negativamente *in vitro* a síntese de IFN- γ e TNF- α nos indivíduos infectados sem a mielopatia. Isso sugere que a IL-10 possa contribuir para a manutenção do quadro clínico assintomático para a HAM/TSP, embora haja uma diminuição da capacidade do TGF- β e da IL-10 em modular negativamente a resposta imune nos pacientes com a mielopatia (BASTOS et al., 2012; BRITO-MELO et al., 2007; SANTOS et al., 2006).

2.7.1 Células T Regulatórias na Infecção pelo HTLV-1

Sakaguchi e colaboradores constataram que a transferência de suspensões de células T CD4⁺ depletadas de células CD25⁺ induziu o desenvolvimento de doenças autoimunes em camundongos atímicos. Por outro lado, a transferência de células CD4⁺CD25⁺, foi capaz de prevenir essas doenças nos camundongos. Esses resultados indicaram que as células CD4⁺CD25⁺ contribuíram para a manutenção da auto-tolerância (SAKAGUCHI et al., 1995). Em 2001, as células T regulatórias foram, pela primeira vez, caracterizadas em humanos como apresentando o fenótipo CD4⁺CD25^{high}, o que compreende 1 a 2% das células T CD4⁺ circulantes (BAECHER-ALLAN et al., 2001).

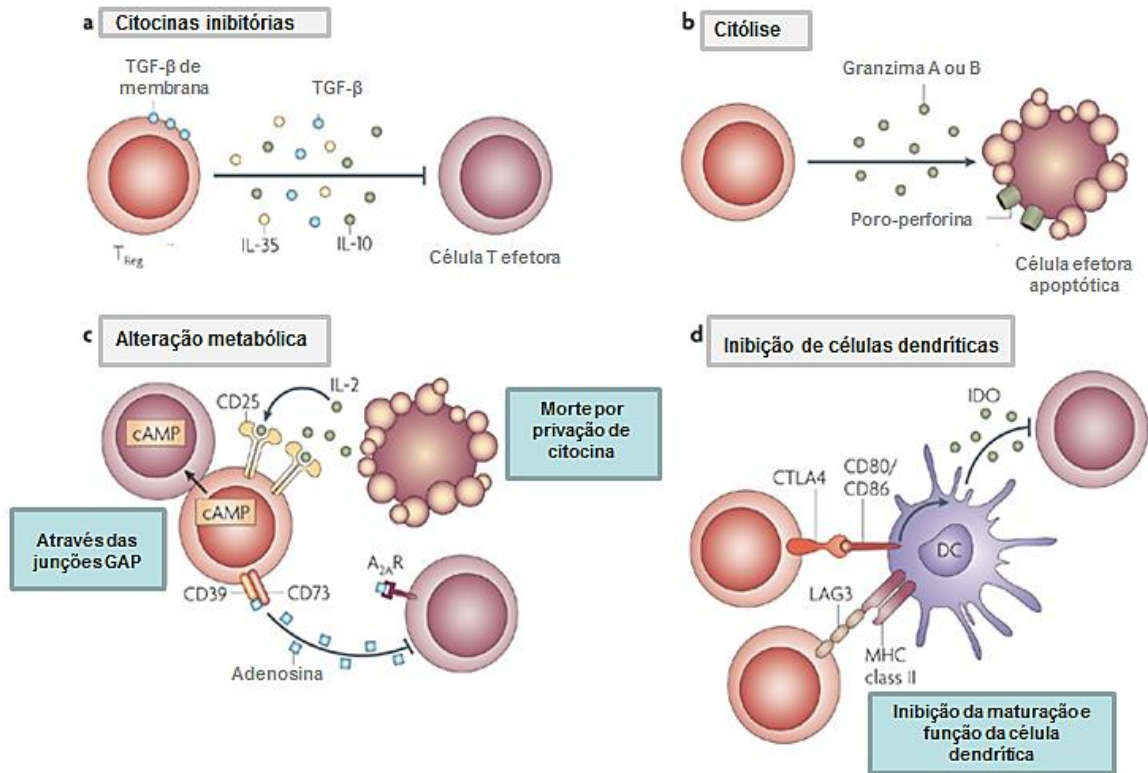
Em indivíduos saudáveis, as células regulatórias desempenham um papel importante na manutenção da homeostase do sistema imune, sendo capazes de suprimir a ativação, proliferação e funções efetoras como a produção de citocinas, de células T CD4⁺, T CD8⁺, natural Killer (NK), NKT, células B e células apresentadoras de antígenos (APCs) *in vitro* e *in vivo* (SAKAGUCHI et al., 2010; SAKAGUCHI et al., 2008)

O fator de transcrição FOXP3 é crítico para o desenvolvimento e função das células T regulatórias (Treg), sendo expresso nas Treg tímicas e periféricas (HORI et al., 2003). Uma redução significativa desta proteína tem sido observada em pacientes com vários tipos de doenças autoimunes, sugerindo que defeitos na expressão de FOXP3 e/ou o funcionamento das Treg podem causar alterações importantes na tolerância imunológica (ARAYA et al., 2011; SAKAGUCHI et al., 2008).

Além do receptor de IL-2 cadeia α (CD25) e de FOXP3, outras moléculas são utilizadas na caracterização do fenótipo regulador, tais como, CTLA-4, GITR, CD62L, CD127 e CD45RO. No entanto, nenhum desses marcadores é tido como específico para células T reguladoras. (BAECHER-ALLAN et al., 2001; CHATILA, 2005; SHIMIZU et al., 2002).

Existem diversas subclasses de células T regulatórias, podendo ser classificadas em duas populações principais, células Treg de ocorrência natural (nTreg) e células Treg induzidas (iTreg). As primeiras desenvolvem-se no timo, expressam constitutivamente CTLA-4, GITR e CD25^{high}, e estão naturalmente presentes no organismo. As iTregs são geradas na periferia após estímulos antigênicos ou exposição a citocinas regulatórias, tais como IL-10 e TGF- β (BACCHETTA; GAMBINERI; RONCAROLO, 2007; GUPTA; SHANG; SUN, 2008). Dentre as células T regulatórias induzidas destacam-se as células T_{RI} que regulam mediante produção de IL-10, suprimindo o desenvolvimento de algumas respostas de células T *in vivo* (APOSTOLOU et al., 2002; PAPIERNIK et al., 1997); e as células TH3, capazes de suprimir mediante a produção de TGF- β (BACH, 1995; PEARSON; MCDEVITT, 1999). Várias subclasses de linfócitos Treg CD8⁺ têm sido identificadas, sendo o fenótipo de algumas dessas células semelhante à de Treg CD4⁺ (MILLS, 2004). Além de linfócitos Treg CD4⁺ e CD8⁺, outras células com função regulatória já foram identificadas, como células NKT (SHARIF, 2002), células $\gamma\delta$ (HAYDAY; TIGELAAR, 2003), linfócitos T duplo-negativos (CD4⁻CD8⁻), e linfócitos B CD1⁺ (MIZOGUCHI et al., 2002).

Múltiplos mecanismos podem ser desencadeados na supressão mediada pelos diversos subtipos de células Treg. Várias moléculas podem ser secretadas ou expressas na superfície dessas células, contribuindo diretamente para sua função supressora. É possível que haja um único mecanismo supressor central que seja partilhado por todas as Treg, e vários complementares. Alternativamente, um mecanismo particular pode desempenhar um papel preponderante em uma determinada circunstância, e vários outros podem operar em situações diferentes. Outra possibilidade é que variados mecanismos supressores operem simultaneamente e sinergicamente, de forma que a disfunção de um deles não seja suficiente para prejudicar gravemente a regulação do sistema (SAKAGUCHI et al., 2009). Apesar de não estarem completamente elucidados, têm-se como principais mecanismos supressores das células Treg a produção de



Nature Reviews | Immunology

citocinas inibitórias, a lise de células efetoras, alterações metabólicas e inibição das células dendríticas. **(Figura 6)**

Figura 6. Mecanismos básicos de supressão mediados por células Treg: a) Produção de citocinas inibitórias: TGF- β , IL-10 e IL-35. b) Citólise induzida por perforina e granzimas. c) Apoptose induzida por privação de IL-2; inibição mediada por cAMP (AMP cíclico); e imunossupressão mediada pela adenosina, gerada pela clivagem do ATP por CD39 e CD73. d) Inibição da maturação da célula dendrítica pela ligação da molécula LAG3 ao MHC II; indução de IDO (indoleamina 2,3-dioxigenase) na célula dendrítica pela interação entre o CTLA-4 e CD80/CD86. Adaptado de (VIGNALI; COLLISON; WORKMAN, 2008).

Estudos demonstraram que a frequência de células Treg ($CD4^+CD25^+FOXP3^+$ e $CD4^+CD25^{high}CTLA-4^+$) é menor em indivíduos com HAM/TSP, do que em indivíduos não infectados (MICHAELSSON et al., 2008; YAMANO et al., 2005). Diferentemente, outros estudos indicaram uma porcentagem de células Treg ($CD4^+FOXP3^+Tax^-$ e $CD4^+FOXP3^+$) maior nos pacientes HAM/TSP (BEST et al., 2009; TOULZA et al., 2008), comparados a não infectados. Essa aparente contradição pode ser explicada pelo uso do marcador CD25 que, de acordo com Toulza e colaboradores, é inapropriado como marcador de linfócitos Treg na infecção pelo

HTLV-1. Uma maior frequência de células T CD4⁺ dos indivíduos infectados pelo vírus expressa o marcador CD25, aumentando assim o denominador da fração FOXP3⁺/CD4⁺CD25⁺ (TOULZA et al., 2008).

A frequência de células Treg foi inversamente correlacionada à atividade citolítica dos CTLs e com a carga proviral (MICHAELSSON et al., 2008; TOULZA et al., 2008). Considerando-se a natureza inflamatória da CCS e sua associação com a carga proviral, o comprometimento da imunorregulação exercido pelas células T regulatórias, pode potencializar a ativação celular, contribuindo para o desenvolvimento dessa doença.

3. HIPÓTESE

O comprometimento funcional das células T regulatórias mantém a ativação celular podendo contribuir para o desenvolvimento da ceratoconjuntivite seca em indivíduos infectados pelo HTLV-1.

4. OBJETIVOS

4.1 GERAL

Avaliar os linfócitos T regulatórios de pacientes com ceratoconjuntivite seca (CCS) associada à infecção pelo vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV-1).

4.2 ESPECÍFICOS

- ⇒ Avaliar o fenótipo de ativação (HLA-DR⁺) dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺;
- ⇒ Avaliar o fenótipo de regulação (FOXP3⁺) nos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺;
- ⇒ Avaliar a produção de IL-10 e TGF- β por células T com perfil regulatório
- ⇒ Correlacionar a carga proviral à frequência de células T ativadas e de subpopulações de linfócitos T regulatórios;

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 DESENHO DO ESTUDO

Este foi um estudo de corte transversal sobre ativação celular, fenótipo e função dos linfócitos T regulatórios de indivíduos infectados pelo HTLV-1 apresentando CCS. A estratégia utilizada nesse estudo está representada na **Figura 7**.

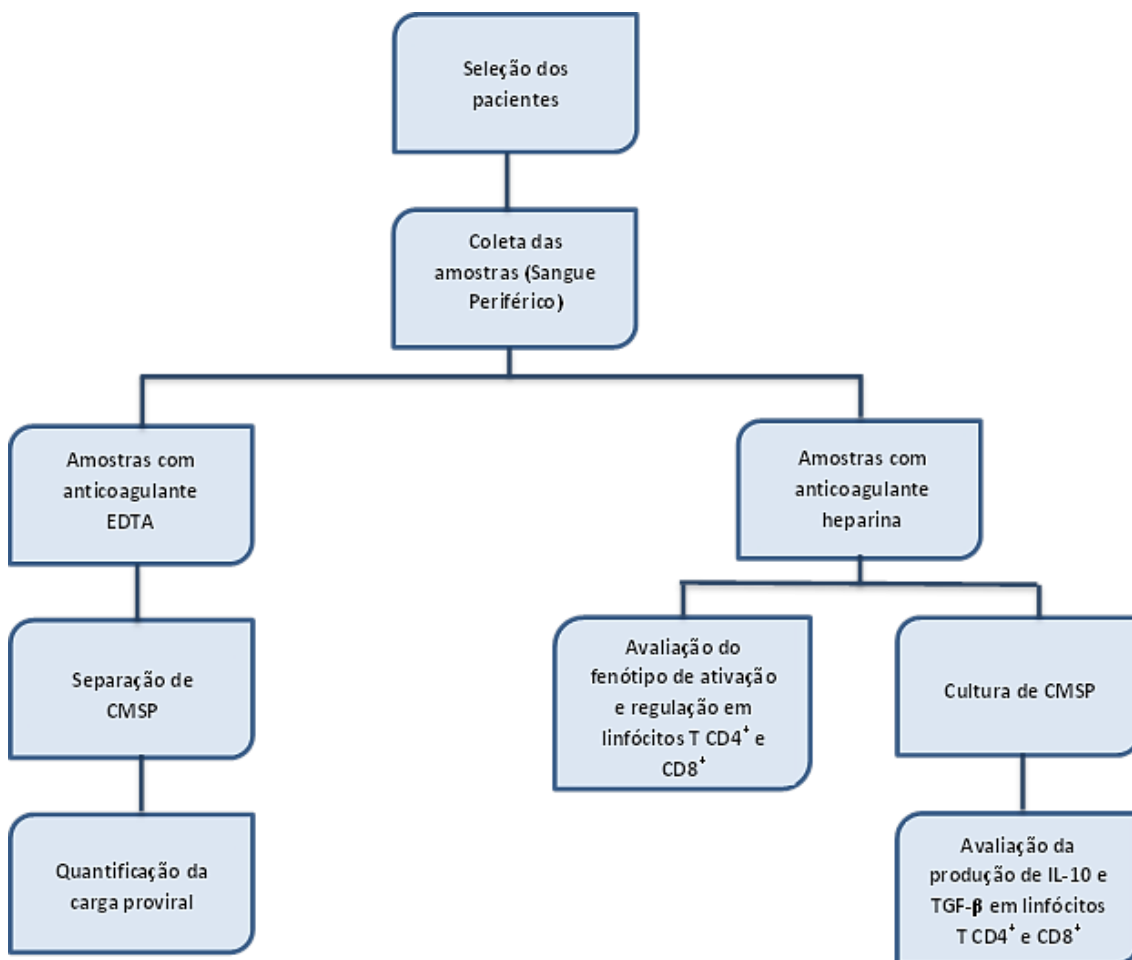


Figura 7. Fluxograma da estratégia experimental. CMSP: células mononucleares de sangue periférico.

5.2 PACIENTES

Trata-se de uma amostra de conveniência proveniente do Centro de HTLV da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP). Foram incluídos no estudo três grupos, um deles composto por voluntários não infectados e os outros por pacientes portadores do HTLV-1 assintomáticos para HAM/TSP, sendo um dos grupos com diagnóstico negativo para CCS, e o outro com diagnóstico positivo. Os pacientes

incluídos foram previamente identificados no projeto “Caracterização clínica e imunológica da ceratoconjuntivite seca (CCS) associada ao Vírus Linfotrófico de Células T Humanas tipo 1”. Foram excluídos indivíduos com diagnóstico de HAM/TSP, e aqueles que apresentavam outras infecções virais crônicas como HIV-1, e hepatites B e C. Pacientes portadores de CCS secundária a outras doenças diagnosticadas previamente, como alteração palpebral, infecções oculares crônicas, cirurgias refrativas, doenças do colágeno e uso de lentes de contato, foram igualmente excluídos. O diagnóstico de CCS foi definido de acordo com a positividade para pelo menos dois dos seguintes exames: Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal (TBUT), Teste de Schirmer e coloração com Rosa Bengala.

5.3 AVALIAÇÃO DO FENÓTIPO DE ATIVAÇÃO

Para avaliar a frequência dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ e o fenótipo de ativação (HLA-DR), foram utilizados 100 µL de sangue coletado em tubos contendo anticoagulante heparina. Para a marcação membranar, empregou-se os anticorpos monoclonais anti-CD3^{APC-CY7}, anti-CD4^{FITC}, anti-CD8^{APC} e anti-HLA-DR^{PE} (Becton Dickinson Pharmingen, San Jose, CA, EUA), assim como controles isotípicos específicos para cada fluorocromo. Após a adição dos anticorpos e controles isotípicos, seguida de incubação por 15 minutos à temperatura ambiente e sob proteção da luz, adicionou-se, de acordo com as recomendações do fabricante, 500 µL da solução FACS Lysing Solution (1X) (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA) para lise de eritrócitos. Na etapa de lavagem adicionou-se 2 mL de PBS/BSA 0,5% (solução salina tamponada com fosfato/ soro albumina bovina) seguida de centrifugação por 10 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o processo de lavagem repetido. O *pellet* celular formado foi ressuspendido e as células fixadas com 300 µL de PBS/BSA/Paraformaldeído 0,4%, sendo acondicionadas a 4°C, ao abrigo da luz, até o momento da aquisição em citômetro de fluxo (BD FACSAriaTM, San Jose CA, EUA). Foram adquiridos cerca de 100.000 eventos nos tubos com os anticorpos monoclonais, e 50.000 nos tubos controles com anticorpos isotípicos. Os eventos foram analisados pelo software FlowJo (Tree Star), conforme estratégias representadas na **figura 8**.

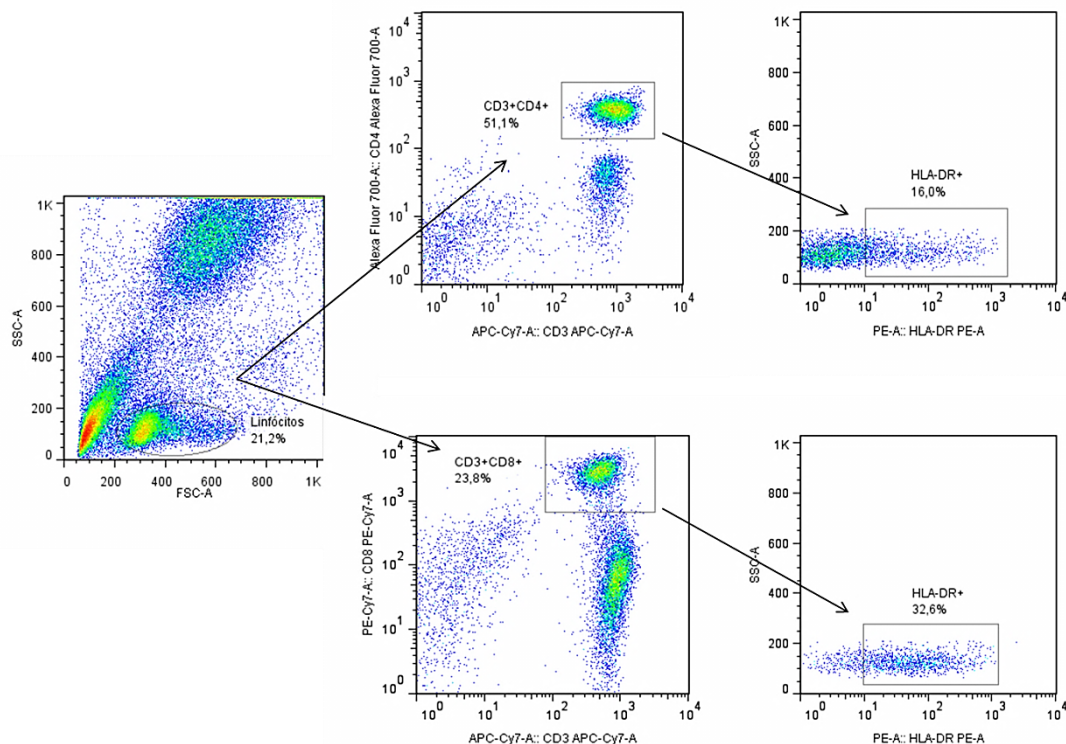


Figura 8. Fluxograma da estratégia de análise dos linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ expressando HLA-DR, baseada na utilização de controles isotípicos para cada fluorocromo empregado.

5.4 AVALIAÇÃO DO FENÓTIPO REGULATÓRIO

Para avaliar a frequência de linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$ com fenótipo regulatório (FOXP3), realizou-se marcação membranar em sangue total, conforme descrito no tópico 5.3, seguida de marcação intracelular. Após a marcação de moléculas de superfície celular com os anticorpos monoclonais anti- $CD3^{APC-CY7}$, anti- $CD4^{FITC}$ e anti- $CD8^{APC}$, iniciou-se a marcação intracelular com a incubação por 20 minutos, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, de 200 μ L da solução fixadora PBS/BSA/paraformaldeído 2%. Em seguida, para a permeabilização da membrana celular, as células foram lavadas com 1 mL de PBS/BSA/saponina 0,2%. Após o término da lavagem, as células foram incubadas com o anticorpo monoclonal anti-FOXP3^{PE} durante 30 minutos. As células foram novamente lavadas com a solução de PBS/BSA/saponina 0,2%, e o *pellet* formado foi ressuspensionado em 300 μ L de PBS/BSA 0,5%. As amostras foram acondicionadas a 4°C, ao abrigo da luz, até o momento da aquisição em citômetro de fluxo. Os critérios de aquisição das amostras foram descritos

no item 4.3. A estratégia utilizada para análise da frequência de linfócitos T com fenótipo regulatório está representada na **figura 9**.

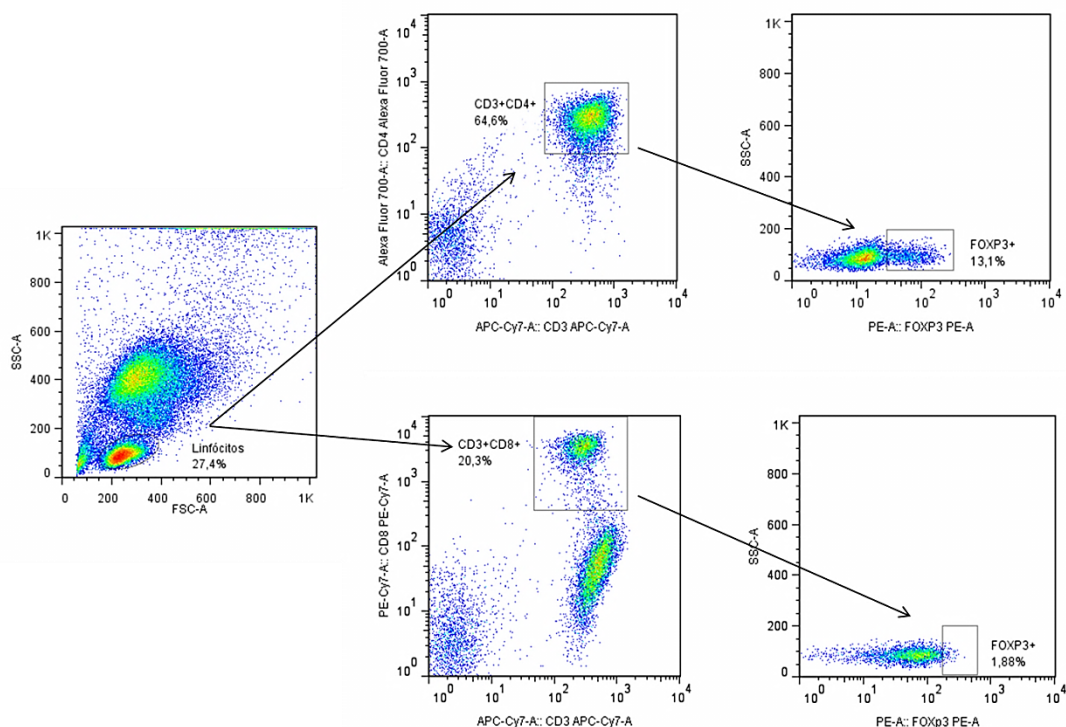


Figura 9. Fluxograma da estratégia utilizada para análise da frequência de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ expressando FOXP3, baseada na utilização de controles isotópicos para cada fluorocromo empregado.

5.5 OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO

Coletou-se a amostra sanguínea por punção venosa em um tubo contendo heparina. Foram retirados 500 μ L para realização dos ensaios de imunofenotipagem descritos nos itens 5.3 e 5.4. A outra alíquota da amostra foi destinada à separação das células mononucleares de sangue periférico (CMSPs).

As CMSPs foram obtidas 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 5 mL 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 CMSP 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 CMSP formado durante a centrifugação foi ressuspendido em 2 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.

5.6 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE IL-10 E TGF-B EM CÉLULAS CD4⁺ E CD8⁺

As CMSP foram cultivadas em meio RPMI 1640 (*Sigma-Aldrich*, Saint Louis, Missouri - EUA) suplementado com 10 % de soro fetal bovino inativado, por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂. Para cada paciente dois tubos com 1 x 10⁶ cells/mL foram cultivados, um deles na presença de fitohemaglutinina, para controle positivo, e o outro na ausência de estímulos. Monensina e brefeldina A (*Sigma-Aldrich*,) foram adicionadas às culturas 5 horas antes do término da incubação. Após o cultivo, as CMSP foram lavadas e incubadas com os anticorpos anti-CD3^{APC-CY7} e anti-CD8^{APC}. Em seguida, as células foram fixadas e permeabilizadas com um kit específico para marcação intracelular de FOXP3, (BioLegend's FOXP3 Fix/Perm Buffer Set), de acordo com a recomendações do fabricante. Em seguida as células foram marcadas com os anticorpos anti-FOXP3^{PE}, anti-IL-10^{APC} e anti-TGF-β^{FITC} (ebioscience) - conforme protocolo para marcação intracelular descrito no item 5.4 - e acondicionadas a 4°C até a aquisição em citômetro de fluxo. A estratégia utilizada para análise está representada na **Figura 10**.

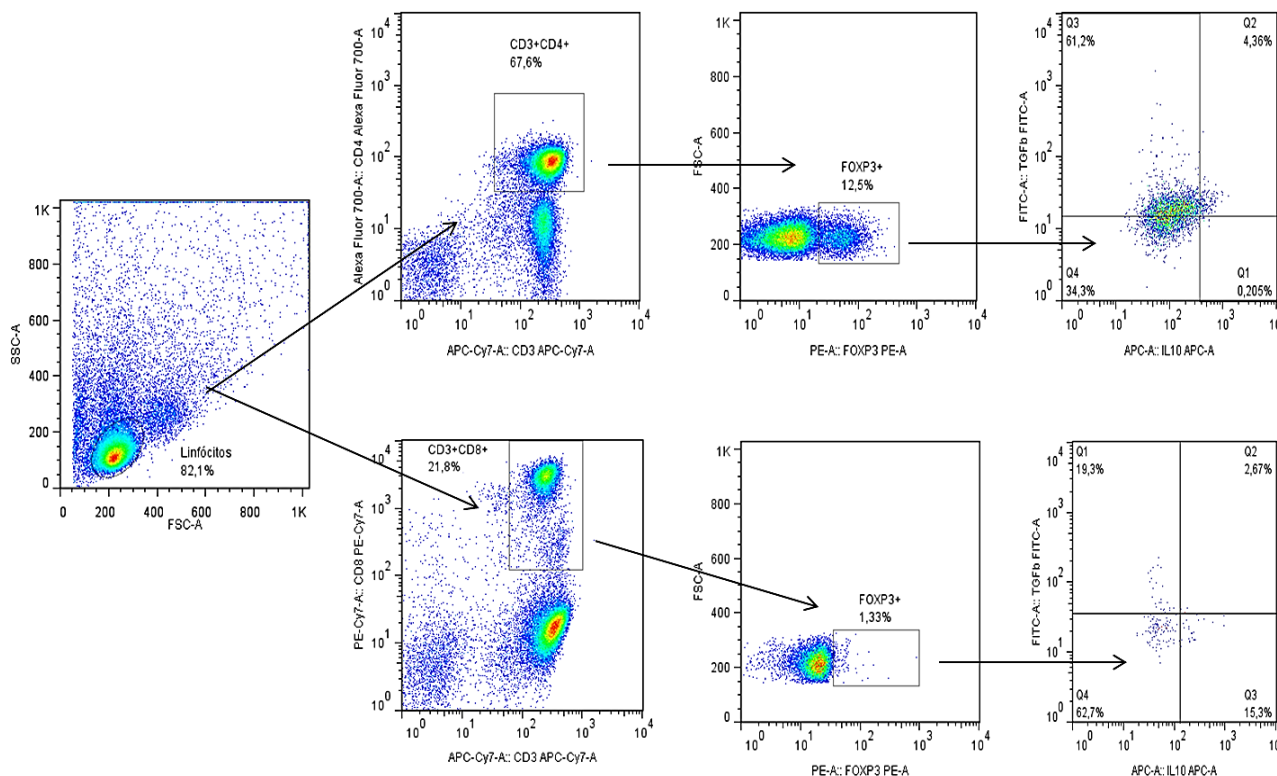


Figura 10. Fluxograma da estratégia utilizada para análise da frequência de linfócitos T CD4⁺FOXP3⁺ e CD8⁺FOXP3⁺ positivos para TGF-β e IL-10, em cultura não estimulada. Estratégia baseada na utilização de controles isotípicos para cada fluorocromo empregado.

5.7 EXTRAÇÃO DE DNA E QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PROVIRAL DO HTLV-1

A extração de DNA de 1×10^6 de CMSP foi realizada utilizando-se o QIAAMP DNA MINI KIT (QIAGEN), conforme instruções do fabricante. A carga proviral foi mensurada por PCR quantitativo em tempo real, através do sistema TaqManTM (Applied Biosystems), como descrito anteriormente por outros pesquisadores (DEHEE et al., 2002). Foram utilizados os primers *forward* SK110 e *reverse* SK111 para o amplificação de um fragmento de 186 pares de base do gene pol e a sonda TaqMan marcada com FAM (6-carboxy fluorescein) para a seqüência referência do HTLV-1 (HTLVATK), localizada no fragmento 4829-4858 pb.

Como controle interno da reação, foi quantificado em paralelo o DNA da albumina. A quantidade de provírus foi calculada através da razão entre o número de cópias do gene pol do HTLV-1 e o número de cópias de albumina, obedecendo à seguinte fórmula: $CPV = \text{número de cópias do HTLV-1 (gene pol)} \times 10^6 / \text{número de cópias da albumina} / 2$.

5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis foram testadas para distribuição Gaussiana, pelo teste de Shapiro-Wilk, e expressas em percentual, média, mediana, desvio padrão e intervalo interquartil. Foi utilizado o teste não paramétrico Mann Whitney para comparar um parâmetro entre dois grupos. Para analisar possíveis diferenças entre mais de dois grupos de pacientes foi utilizado o teste *One way anova* - Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste *Dunn's Multiple Comparison*. Foram consideradas estatisticamente significantes as diferenças com valores de $p < 0,05$. Utilizou-se o software GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Inc., San Diego, CA) para realizar a análise dos dados.

5.9 ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP) e aprovado sob o número de registro 187/2011. Todos os pacientes convidados a participar do estudo foram esclarecidos sobre os procedimentos de coleta e riscos e benefícios do estudo. Todos aqueles que aceitaram participar assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, em anexo, e foram assegurados quanto ao sigilo e a possibilidade de retirar-se do estudo a qualquer momento.

6. RESULTADOS

6.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO

Foram incluídos no estudo 54 indivíduos, dos quais 17 eram voluntários não infectados pelo vírus (NI) e 37 eram pacientes infectados pelo HTLV-1 e assintomáticos para HAM-TSP, sendo 27 com diagnóstico positivo para ceratoconjuntiva seca (CCS) e 10 com diagnóstico negativo (ASS).

Os pacientes foram analisados quanto ao sexo, idade e carga proviral. Dos cinquenta e quatro indivíduos incluídos neste estudo, trinta e sete eram do sexo feminino (68,5%) e dezessete do sexo masculino (31,5%). As idades variaram dos 18 aos 80 anos. Não houve diferença entre o percentual de homens ($p = 0,367$) e mulheres ($p = 0,367$), e a média de idade ($p = 0,190$) dos grupos estudados. A quantificação da carga proviral foi realizada em sete indivíduos ASS e dezessete CCS. A análise estatística realizada pelo teste de Mann-Whitney não revelou diferença estes grupos ($p=0,340$).

Tabela 1 – Características dos indivíduos incluídos nos grupos de estudo.

Grupos	Idade (anos) média \pm DP	Sexo - n(%)		Carga Proviral (cópias/10 ⁶ CMSP)	
		F	M	n	Mediana (IQ 25-75)
NI (n=17)	42,5 \pm 13,23	11 (65%)	6 (35%)	-	-
ASS (n=10)	49,4 \pm 13,10	9 (90%)	1 (10,0)	7	176 (0-8.908)
CCS (n=27)	50,0 \pm 14,75	17 (63%)	10 (37,0)	17	1491 (37-34.100)

F: feminino. M: masculino. IQ: intervalo interquartil. CMSP: células mononucleares de sangue periférico. NI: indivíduos não infectados. ASS: indivíduos portadores do HTLV-1, sem CCS e assintomáticos para HAM/TSP. CCS: indivíduos portadores do vírus e diagnosticados com CCS.

6.2 FREQUÊNCIA DA EXPRESSÃO DE HLA-DR NOS LINFÓCITOS T CD4⁺ E CD8⁺

Inicialmente foram analisadas as frequências de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ nos grupos avaliados. Não foram encontradas diferenças nos percentuais dessas populações ($p=0,420$ e $0,592$, respectivamente).

Para análise da ativação celular, avaliou-se a expressão da glicoproteína de superfície HLA-DR. Observou-se um aumento na frequência de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ expressando HLA-DR nos grupos ASS e CCS em relação ao grupo controle NI ($p < 0,0001$ e $p < 0,0001$, respectivamente) **figura 11**. Através da análise da intensidade de fluorescência, não foram verificadas, entre os três grupos estudados, diferenças significantes na expressão dessa molécula de ativação nos linfócitos T CD4⁺ ($p = 0,14$) e CD8⁺ ($p = 0,57$) (dados não mostrados).

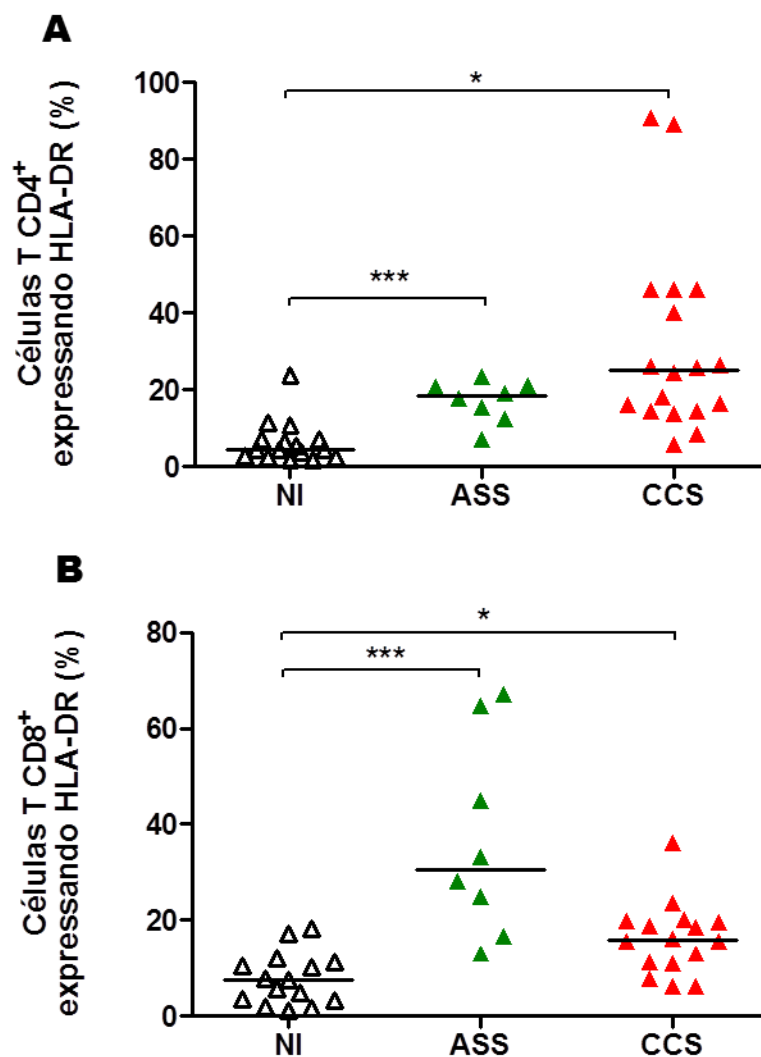


Figura 11. Frequência do fenótipo de ativação HLA-DR em linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. Análise comparativa da frequência de linfócitos CD4⁺ (A) e CD8⁺ (B) expressando HLA-DR entre os grupos NI, ASS e CCS. As linhas horizontais correspondem à mediana das frequências. Análise estatística realizada através do teste Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn. * $p < 0,05$. *** $p < 0,0005$.

6.3 FREQUÊNCIA DA EXPRESSÃO DE FOXP3 NOS LINFÓCITOS T CD4⁺ E CD8⁺

A frequência de células T CD4⁺ e CD8⁺ com perfil regulatório foi determinada pela análise da expressão do fator de transcrição FOXP3. Esta análise em CD4⁺ revelou um aumento na expressão de FOXP3 nos grupos ASS e CCS quando comparados ao grupo controle não infectado ($p=0,0001$) **figura 12**. Este aumento foi de cerca cinco vezes maior nos indivíduos infectados quando comparados aos não infectados pelo vírus ($p<0,0001$; medianas: 7,4 e 1,3 respectivamente – dados não mostrados).

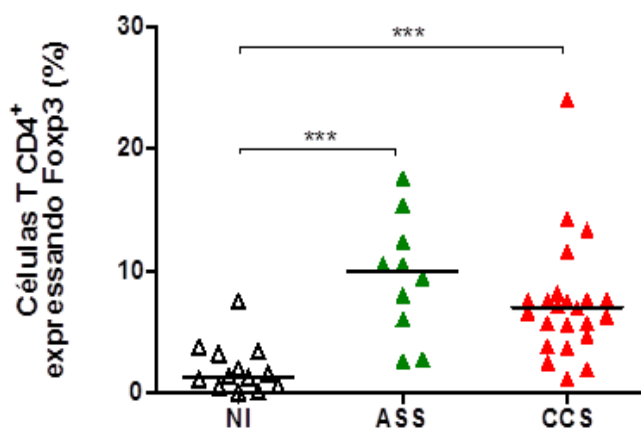


Figura 12. Frequência da expressão de FOXP3 em linfócitos T CD4⁺. Análise comparativa da frequência de linfócitos CD4⁺ expressando FOXP3 entre os grupos NI, ASS e CCS. As linhas horizontais correspondem à mediana das frequências. Análise estatística realizada através do teste Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn. *** $p<0,0005$.

Na análise da frequência da expressão de FOXP3 em CD8⁺, também verificou-se um aumento nos grupos ASS e CCS quando comparados ao grupo controle não infectado. ($p=0,0001$) **figura 13**. A frequência de FOXP3 em CD8⁺ foi duas vezes maior nos pacientes infectados pelo vírus, quando comparados aos não infectados (medianas: 5,3 e 2,4 respectivamente – dados não mostrados).

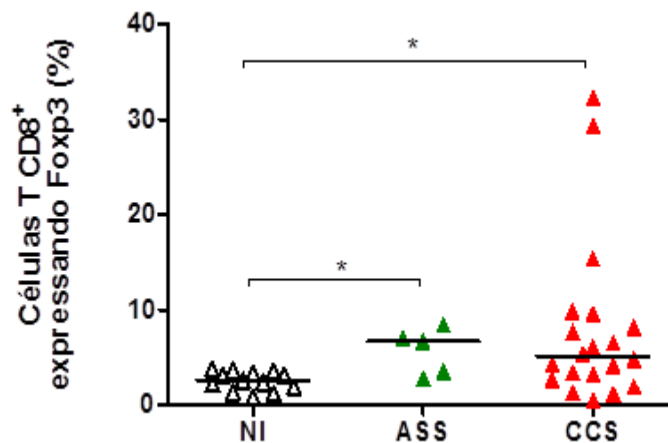


Figura 13. Frequência da expressão de FOXP3 em linfócitos T CD8⁺. (A) Análise comparativa da frequência de linfócitos CD8⁺ expressando FOXP3 entre os grupos NI, ASS e CCS. As linhas horizontais correspondem à mediana das frequências. Análise estatística realizada através do teste Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn. *p<0,05.

A avaliação da intensidade de fluorescência não revelou diferenças na expressão de FOXP3 nos linfócitos T CD4⁺ (p=0,28) e CD8⁺ (p=0,39), entre os grupos de estudo (dados não mostrados).

6.4 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO INTRACELULAR DE TGF- β E IL-10 EM LINFÓCITOS T CD4⁺ E CD8⁺ COM PERFIL REGULATÓRIO

Como observado na **figura 14**, a frequência de linfócitos T CD4⁺FOXP3⁺ produtores de TGF- β foi significativamente maior no grupo de CCS quando comparado ao grupo de indivíduos NI (p=0,008; medianas: 65,2% e 12,5%, respectivamente), enquanto a frequência de linfócitos T CD4⁺ FOXP3⁺ duplo produtores de TGF- β e IL-10 foi maior no grupo CCS quando comparado ao ASS (p=0,03; medianas: 3,96 e 0,04 respectivamente). Os indivíduos do grupo NI apresentaram por sua vez uma produção de IL-10 maior que os pacientes ASS (p=0,007).

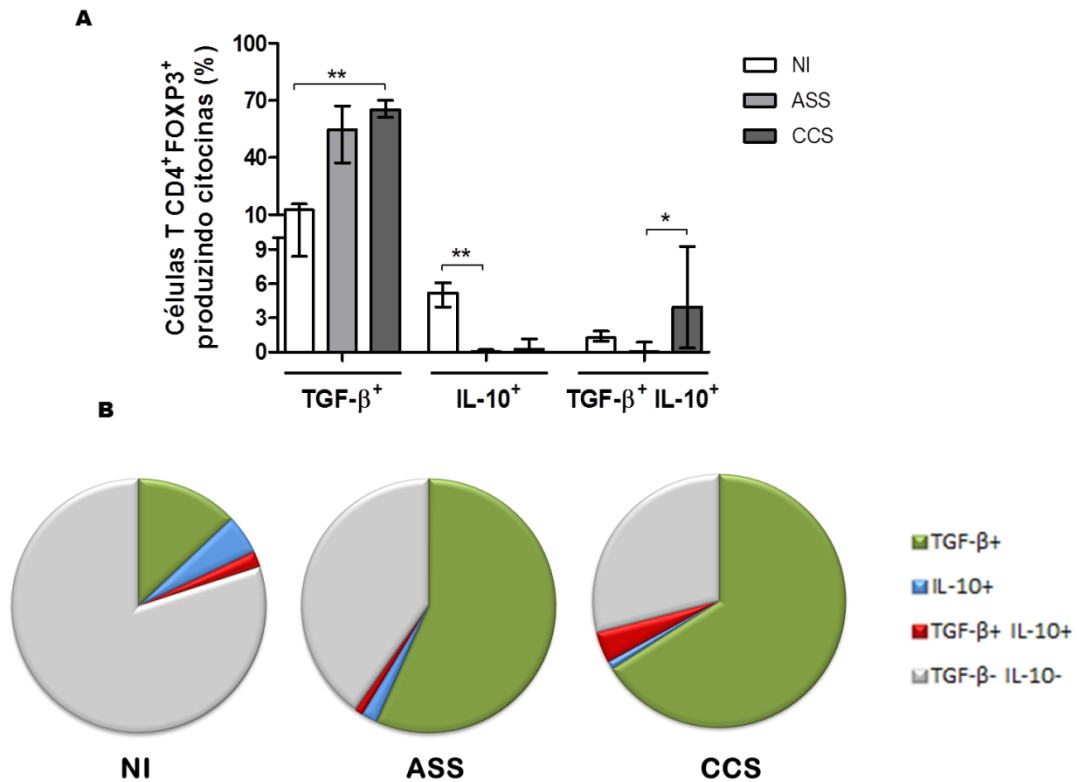


Figura 14. Produção de TGF-β e IL-10 em linfócitos T CD4⁺ com perfil regulatório. Representação da frequência (A) e distribuição (B) de linfócitos T CD4⁺FOXP3⁺ produtores TGF-β e IL-10 nos grupos NI (n=4), ASS (n=5) e CCS (n=7). As populações CD4⁺FOXP3⁺ foram analisadas dentro da população de linfócitos T (CD3⁺). As barras indicam as medianas e intervalo interquartil de cada grupo. Os setores dos gráficos circulares indicam as medianas aproximadas. Análise estatística realizada através do teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn. *p<0,05. **p<0,005.

Com relação a produção de citocinas supressoras em linfócitos T CD8⁺FOXP3⁺, verificou-se que os pacientes do grupo CCS apresentaram uma maior frequência de células produtoras de IL-10, comparados aos indivíduos ASS (p=0,012; medianas: 8,15 e 1,42, respectivamente). O grupo ASS apresentou uma maior frequência de células CD8⁺FOXP3⁺ mono produtoras de TGF-β (p=0,0014) e duplo produtoras TGF-β e IL-10 (p=0,002) quando comparado ao grupo de indivíduos NI (**figura 15**).

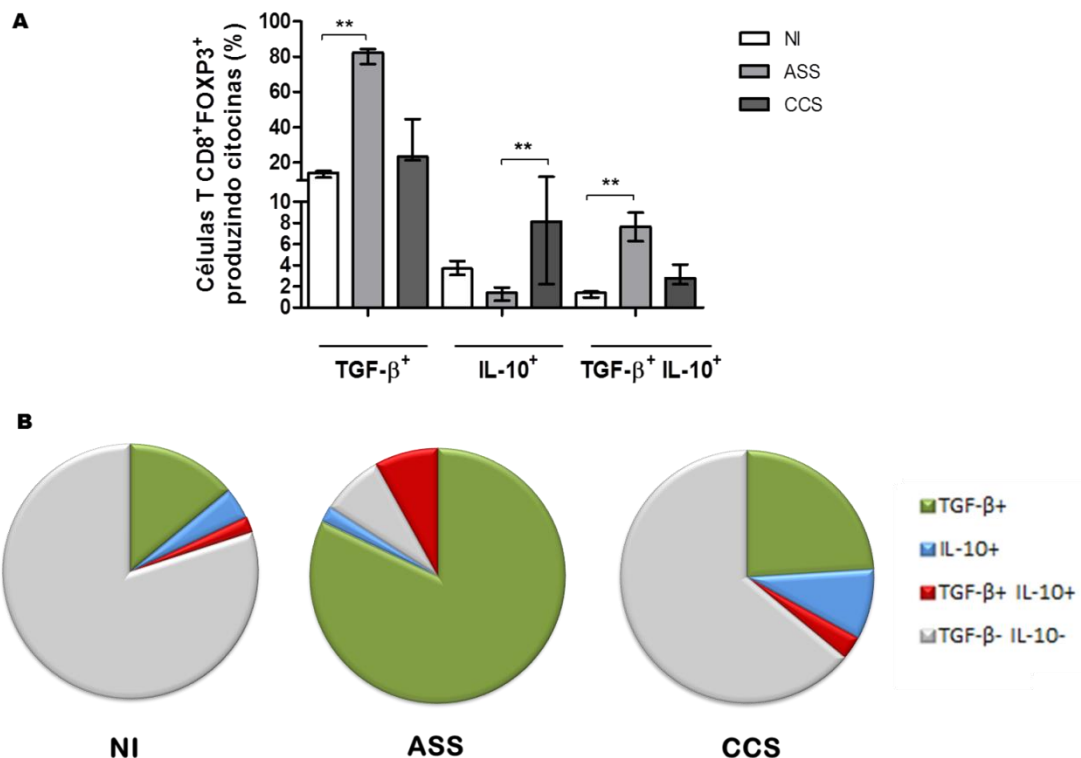


Figura 15. Produção de TGF- β e IL-10 em linfócitos T CD8⁺ com perfil regulatório. Representação da distribuição (A) e da frequência (B) de linfócitos T CD8⁺FOXP3⁺ produtores TGF- β e IL-10 nos grupos NI (n=4), ASS (n=5) e CCS (n=7). As populações CD8⁺FOXP3⁺ foram analisadas dentro da população de linfócitos T (CD3⁺). As barras indicam as medianas e intervalo interquartil de cada grupo. Os setores dos gráficos circulares indicam as medianas aproximadas. Análise estatística realizada através do teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn. *p<0,05. **p<0,005.

6.5 CORRELAÇÃO ENTRE A CARGA PROVIRAL, FREQUÊNCIA DE CÉLULAS T ATIVADAS E SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T REGULATÓRIOS

Observou-se uma forte correlação positiva entre a frequência de linfócitos T CD4⁺HLA-DR⁺ e a carga proviral no grupo CCS (r=0,8; p=0,009), não sendo observada esta correlação na população CD8⁺HLA-DR⁺ (r=0,2; p=0,58). De forma semelhante, as mesmas análises foram feitas para o grupo ASS, não sendo encontrada correlação entre a carga proviral e a frequência de T CD4⁺HLA-DR⁺ (r=0,8; p=0,2) e T CD8⁺HLA-DR⁺ (r=-0,5; p=0,32) (**figura 16 A, B, C e D**).

Quanto às frequências de linfócitos T CD4⁺FOXP3⁺ e CD8⁺FOXP3⁺, foi observada no grupo CCS uma correlação negativa entre a população CD8⁺FOXP3⁺ e a carga proviral (r=-0,6; p=0,35), porém não houve correlação entre a frequência de CD4⁺FOXP3⁺ e a carga proviral (r=-0,2; p=0,45). No grupo ASS não foi encontrada

correlação entre a carga proviral e as células T $CD4^+FOXP3^+$ ($r=-0,6$; $p=0,20$), e devido à quantidade insuficiente de dados, não foi possível avaliar a correlação entre os linfócitos T $CD8^+FOXP3^+$ e a carga proviral (figura 16 E, F e G).

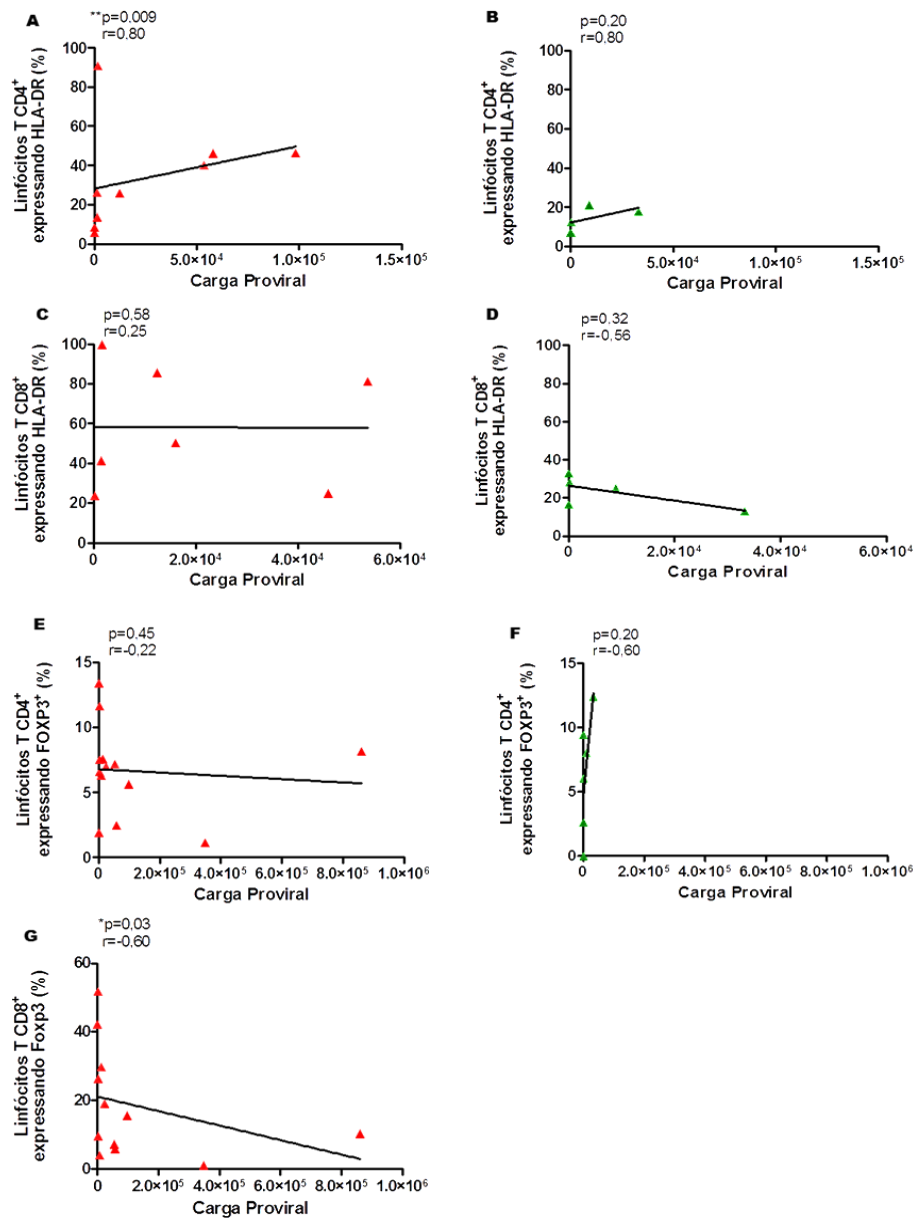


Figura 16. Correlação entre a frequência de células T ativadas e de subpopulações de linfócitos T regulatórios e a carga proviral. Correlação entre a carga proviral e: a frequência de linfócitos T $CD4^+HLA-DR^+$ no grupo CCS (n=9) (A) e ASS (n=4) (B); a frequência de linfócitos T $CD8^+HLA-DR^+$ no grupo CCS (n=7) (C) e no grupo ASS (n=5) (D); a frequência de linfócitos T $CD4^+FOXP3^+$ no grupo CCS (n=13) (E) e no grupo ASS (n=6) (F); a frequência de linfócitos T $CD8^+FOXP3^+$ no grupo CCS (n=12) (G). Análise estatística realizada através do teste de correlação de Spearman. * $p<0,05$. ** $p<0,005$.

7. DISCUSSÃO

A regulação da resposta imunológica contra diversos fatores pode ser realizada por diferentes mecanismos supressores, entretanto tais mecanismos não foram completamente elucidados. As células T regulatórias são importantes na prevenção do dano tecidual causado pela resposta imune, exercendo papel importante na manutenção da homeostase do sistema, e desempenhando função protetora durante infecções virais crônicas, bacterianas e fúngicas. (BELKAID; TARBELL, 2009; MILLS, 2004).

A importância das células Treg já foi demonstrada em vários modelos de infecções, no entanto, seu papel na infecção pelo HTLV-1 e na CCS não está claro. Este trabalho apresentou pela primeira vez dados sobre a resposta regulatória no contexto da CCS associada à infecção pelo HTLV-1. Os resultados obtidos indicam que a frequência de células T $CD4^+FOXP3^+$ e T $CD8^+FOXP3^+$ é maior no grupo com diagnóstico de CCS, do que em indivíduos não infectados pelo HTLV-1, no entanto não houve diferença quando o grupo CCS foi comparado aos indivíduos infectados assintomáticos. Além disso, foi observada uma maior frequência de células T $CD4^+FOXP3^+$ duplo produtoras de TGF- β e IL-10 e mono produtoras de TGF- β no grupo CCS, comparados aos ASS e NI, respectivamente. Nossos resultados confirmam estudos anteriores que demonstraram uma expansão de células T regulatórias ($CD4^+FOXP3^+$) em indivíduos infectados pelo vírus assintomáticos e com diagnóstico de HAM/TSP, quando comparados a doadores saudáveis (BEST e al., 2009; COUTINHO et al., 2014; TOULZA et al., 2008). No presente estudo, demonstramos pela primeira vez uma maior frequência de células T $CD8^+FOXP3^+$ em indivíduos infectados pelo HTLV-1, exemplificando a diversidade de subclasses de células regulatórias que podem estar envolvidas no desenvolvimento da resposta supressora. Além disso, uma maior frequência de células T $CD8^+FOXP3^+$ mono produtoras de IL-10 foi observada no grupo CCS, comparada ao ASS.

Diversos estudos tem sugerido que em infecções virais crônicas persistentes ocorre uma expansão de linfócitos Treg que suprimiria a resposta específica ao patógeno, impedindo o *clearance* do microorganismo, como na infecção por HIV (GARBA et al., 2002), por HCV (BILLERBECK; BLUM; THIMME, 2007) e na hanseníase (BOBOSHA et al., 2014; FERNANDES et al., 2013; MODLIN et al., 1986). No contexto da infecção pelo HTLV-1 uma expansão de células Treg foi relatada anteriormente, sobretudo em indivíduos com HAM/TSP (BEST et al., 2009;

COUTINHO et al., 2014; TOULZA et al., 2008). Uma proliferação celular espontânea de linfócitos T infectados e não infectados e elevada produção de citocinas inflamatórias como TNF- α , IFN- γ , IL-6 e de quimiocinas (CXCL-9, CXCL-10) é mais frequente em pacientes com HAM/TSP, porém tem sido descrita em cerca de um terço dos indivíduos assintomáticos (SATO et al., 2013). A intensa ativação do sistema imune induzida pelo vírus está presente mesmo em indivíduos com baixa carga proviral (<1% de células infectadas) (COUTINHO et al., 2014). No presente estudo, os indivíduos dos grupos ASS e CCS apresentaram uma maior frequência de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ ativados (HLA-DR⁺), quando comparados ao grupo NI. A molécula HLA-DR tem sido descrita como um marcador de ativação celular na infecção pelo HTLV-1 tanto em indivíduos assintomáticos como em pacientes com HAM/TSP, (BRITO-MELO et al., 2007; COUTINHO et al., 2014). Além disso, foi observada uma correlação direta entre a carga proviral e a frequência de células T CD4⁺HLA-DR⁺ no grupo CCS. No entanto, a carga proviral não estava correlacionada à frequência de células T regulatórias ou à produção de TGF- β e/ou de IL-10 por linfócitos Treg CD4⁺. Uma correlação inversa foi observada entre a frequência de linfócitos T CD8⁺FOXP3⁺ e a carga proviral. Vale ressaltar que houve um predomínio de células mono produtoras de IL-10 nesta subpopulação de células Treg. Isso pode indicar que parte da função regulatória dessa subpopulação poderia estar preservada.

É possível que a expansão das células Treg dirigidas pelo vírus não seja suficiente para conter a intensa ativação celular desencadeada pelo HTLV-1. Por outro lado, a expressão de FOXP3 em linfócitos T CD4⁺ e TCD8⁺ não ocorre apenas em células regulatórias, uma vez que a essa proteína pode ser expressa também em linfócitos T ativados (ALLAN et al., 2007; KMIĘCIAK et al., 2009). Yamano e colaboradores descreveram uma menor expressão de FOXP3 em células CD4⁺CD25⁺ correlacionada à função supressora diminuída em pacientes com HAM/TSP, comparados a indivíduos saudáveis (YAMANO et al., 2005). Este resultado difere do descrito no presente estudo, porém nós utilizamos o marcador FOXP3 e a produção de citocinas para caracterizar as células Treg. As citocinas TGF- β e IL-10, além da capacidade supressora, também estão relacionadas com a indução de células iTreg *in vivo* e *in vitro*. TGF- β pode ser expresso na superfície das células Treg, podendo mediar a supressão de outras células de forma contato-dependente (NAKAMURA; KITANI; STROBER, 2001). Além disso, a secreção de IL-10 e TGF- β pelas Treg modulam negativamente a expressão de

CD86/CD80, CD40 e IL-12 em células dendríticas, interferindo na ativação de linfócitos T (BLUESTONE; TANG, 2005).

Outros fatores podem estar relacionados a uma menor função supressora, a exemplo de alterações na via de sinalização das citocinas. De fato, um estudo conduzido por Grant e colaboradores identificou uma menor expressão do receptor TGF- β RII, resultando em uma desregulação na via de sinalização do TGF- β em indivíduos infectados pelo HTLV-1 com HAM/TSP. Este mesmo estudo demonstrou uma correlação inversa entre a carga proviral e expressão do receptor TGF- β RII, e a frequência de células T CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ (GRANT et al., 2008). Os autores sugerem que uma disfunção na via de sinalização do TGF- β pode ser um cofator na progressão da HAM/TSP. Alterações nas vias de sinalização de citocinas já foram descritas igualmente na patogênese da doença inflamatória do intestino e no desenvolvimento de Alzheimer, reafirmando a importância dessa via de sinalização na proteção contra doenças inflamatórias crônicas (GRANT et al., 2008; MONTELEONE et al., 2001; TESSEUR et al., 2006). Estudos futuros nesse contexto podem esclarecer se a menor expressão do receptor TGF- β RII estaria envolvida na CCS associada à infecção pelo HTLV-1.

A expansão de células Treg CD8⁺ tem sido relacionada igualmente a desordens inflamatórias autoimunes, tais como a espondilite anquilosante (JARVIS et al., 2005), diabetes tipo 1 (BISIKIRSKA et al., 2005), esclerose múltipla (TENNAKOON et al., 2006) e doença inflamatória do intestino (BRIMNES et al., 2005). Entretanto, essas células têm sido caracterizadas em uma proporção muito menor, quando comparadas às Treg CD4⁺, de forma que seu fenótipo e mecanismos efetores permanecem pouco conhecidos. Alguns estudos apontam como mecanismos de supressão o contato célula-célula, via expressão na superfície celular de CTLA-4 e TGF- β , outros sugerem que a citocina IL-10 está intimamente relacionada à inibição da proliferação celular, seja isoladamente, ou em combinação com TGF- β e CTLA-4 (CAI et al., 2004; COSMI et al., 2003; FILACI et al., 2007; JARVIS et al., 2005; JOOSTEN; OTTENHOFF, 2008).

Embora os mecanismos imunopatológicos da CCS associada ao HTLV-1 não estejam estabelecidos, o vírus parece ter um papel importante. Uma elevada carga proviral (acima de 10% de células infectadas) foi associada à presença de CCS

(CASTRO-LIMA VARGENS et al., 2011). Além disso, a CCS associada ao HTLV-1 difere em vários aspectos da síndrome de Sjögren autoimune primária, sendo provavelmente mais próxima à síndrome seca causada por outras infecções virais como o HIV e o vírus da hepatite C (ALVES; ANGERAMI; ROCHA, 2013; SIPSAS; GAMALETSOU; MOUTSOPOULOS, 2011). Nessas infecções, os infiltrados linfocitários estão mais localizados na área pericapilar e observa-se um menor número de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ nos infiltrados, comparado com a síndrome de Sjögren primária (VITALI; MOUTSOPOULOS; BOMBARDIERI, 1994). Além disso, nos pacientes com CCS associada ao HTLV-1 não são encontrados auto-anticorpos, como FAN, anti-SSA/ anti-SSB e FR, diferentemente do que ocorre nos casos de síndrome de Sjögren primária (FERRAZ-CHAOUI et al., 2010). O vírus poderia induzir a infiltração linfocítica no tecido glandular com uma reação inflamatória e dano funcional. Existe um tropismo de linfócitos expressando o gene *tax* para as glândulas salivares e lacrimais em camundongos (GREEN et al., 1989). É possível que a expansão de linfócitos Treg, sobretudo da subpopulação T CD8⁺ favoreça a ativação de clones de células T autoreativas ou que essas células exerçam algum grau de auto-reatividade, levando a um processo inflamatório nas glândulas lacrimais. Clones de linfócitos T CD8⁺ com perfil autoreativo já foram descritos na espondilite anquilosante (LORNA, 2005).

Uma das limitações do presente estudo é a avaliação de células Treg na corrente sanguínea e não no sítio da lesão. O efeito supressor mediado pelas células Treg ocorre pelo contato célula-célula ou via secreção de citocinas imunossupressoras, indicando uma estreita proximidade com a célula alvo, o que implica na necessidade da presença de células regulatórias no sítio da doença, a exemplo do câncer, infecções fúngicas e pelo HCV (CAVASSANI et al., 2006; FILACI et al., 2007; WARD et al., 2007).

Em conclusão, este trabalho indica que embora ocorra uma expansão das células Treg (CD4⁺ e CD8⁺) na infecção pelo HTLV-1, não ocorre um controle da ativação celular de forma eficiente. Estudos futuros necessitam ser realizados para avaliar de forma mais acurada os mecanismos regulatórios desempenhados pelos linfócitos Treg CD4⁺ e CD8⁺. A utilização de outros marcadores, bem como diferentes estratégias metodológicas para avaliar a atividade supressora dessas células, estão incluídas nas perspectivas para continuação deste trabalho.

8. CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que na CCS associada à infecção pelo HTLV-1 não ocorre um controle eficiente da ativação celular, embora, ocorra uma expansão dos linfócitos T CD4⁺FOXP3⁺ e CD8⁺FOXP3⁺. A menor frequência de células Treg CD8⁺ produtoras de TGF- β em indivíduos infectados pelo HTLV-1 com CCS, pode contribuir para a intensificação da ativação celular e fisiopatologia da doença.

REFERÊNCIAS

- ALLAN, S. E. et al. Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. **Int. Immunol.**, v. 19, n. 4, p. 345-354, 2007.
- ALVES, M.; ANGERAMI, R. N.; ROCHA, E. M. Dry eye disease caused by viral infection: review. **Arq. Bras. Oftalmol.**, v. 76, n. 2, p. 129-132, 2013.
- APOSTOLOU, I. et al. Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. **Nat. Immunol.**, v. 3, n. 8, p. 756-763, 2002.
- ARAÚJO, A. Q.; SILVA, M. T. The HTLV-1 neurological complex. **Lancet Neurol.**, v. 5, n. 12, p. 1068-1076, 2006.
- ARAYA, N. et al. Human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and regulatory T cells in HTLV-1-associated neuroinflammatory disease. **Viruses**, v. 3, n. 9, p. 1532-1548, 2011.
- ASQUITH, B.; BANGHAM, C. R. Quantifying HTLV-I dynamics. **Immunol. Cell Biol.**, v. 85, n. 4, p. 280-286, 2007.
- ASQUITH, B. et al. A functional CD8⁺ cell assay reveals individual variation in CD8⁺ cell antiviral efficacy and explains differences in human T-lymphotropic virus type 1 proviral load. **J. Gen. Virol.**, v. 86, n. Pt 5, p. 1515-1523, 2005.
- BACCHETTA, R.; GAMBINERI, E.; RONCAROLO, M. G. Role of regulatory T cells and FOXP3 in human diseases. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 120, n. 2, p. 227-235, 2007.
- BACH, J.-F. Organ-specific autoimmunity. **Immunol. today**, v. 16, n. 7, p. 353-355, 1995.
- BAECHER-ALLAN, C. et al. CD4⁺CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood. **J. Immunol.**, v. 167, n. 3, p. 1245-1253, 2001.
- BANGHAM, C. R. HTLV-1 infections. **J. Clin. Pathol.**, v. 53, n. 8, p. 581-586, 2000.
- BASTOS MDE, L. et al. Influence of HTLV-1 on the clinical, microbiologic and immunologic presentation of tuberculosis. **BMC Infect. Dis.**, v. 12, p. 199, 2012.

BEST, I. et al. IFN-gamma production in response to Tax 161-233, and frequency of CD4⁺ Foxp3⁺ and Lin HLA-DR^{high} CD123⁺ cells, discriminate HAM/TSP patients from asymptomatic HTLV-1-carriers in a Peruvian population. **Immunology**, v. 128, n. 1 Suppl, p. 1365-2567, 2009.

BIGLIONE, M. M. et al. A possible case of myelopathy/tropical spastic paraparesis in an Argentinian woman with human T lymphocyte virus type II. **Clin. Infect. Dis.**, v. 37, n. 3, p. 456-458, 2003.

BINDHU, M.; NAIR, A.; LAIRMORE, M. D. Role of accessory proteins of HTLV-1 in viral replication, T cell activation, and cellular gene expression. **Front Biosci**, v. 9, p. 2556-2576, 2004.

BISIKIRSKA, B. et al. TCR stimulation with modified anti-CD3 mAb expands CD8⁺ T cell population and induces CD8⁺CD25⁺ Tregs. **J. Clin. Invest.**, v. 115, n. 10, p. 2904-2913, 2005.

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

BRIMNES, J. et al. Defects in CD8⁺ regulatory T cells in the lamina propria of patients with inflammatory bowel disease. **J. Immunol.**, v. 174, n. 9, p. 5814-5822, 2005.

BRITO-MELO, G. E. et al. IL-10 produced by CD4⁺ and CD8⁺ T cells emerge as a putative immunoregulatory mechanism to counterbalance the monocyte-derived TNF- α and guarantee asymptomatic clinical status during chronic HTLV-I infection. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 147, n. 1, p. 35-44, 2007.

BUGGAGE, R. R. Ocular manifestations of human T-cell lymphotropic virus type 1 infection. **Curr. Opin. Ophthalmol.**, v. 14, n. 6, p. 420-425, 2003.

BUGGAGE, R. R.; LEVY-CLARKE, G. A.; SMITH, J. A. New corneal findings in human T-cell lymphotropic virus type 1 infection. **Am. J. Ophthalmol.**, v. 131, n. 3, p. 309-313, 2001.

CAI, J. et al. Minor H antigen HA-1-specific regulator and effector CD8⁺ T cells, and HA-1 microchimerism, in allograft tolerance. **J. Exp. Med.**, v. 199, n. 7, p. 1017-1023, 2004.

CALATTINI, S. et al. Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. **Retrovirology**, v. 2, n. 1, p. 30, 2005.

CARNEIRO-PROIETTI, A. B. F. et al. Infection and disease caused by the human T cell lymphotropic viruses type I and II in Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 35, n. 5, p. 499-508, 2002.

CASTRO-LIMA VARGENS, 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. **J. Clin. Virol.**, v. 52, n. 3, p. 177-180, 2011.

CATALAN-SOARES, B.; CARNEIRO-PROIETTI, A. B.; PROIETTI, F. A. Heterogeneous geographic distribution of human T-cell lymphotropic viruses I and II (HTLV-I/II): serological screening prevalence rates in blood donors from large urban areas in Brazil. **Cad. Saude Publ.**, v. 21, n. 3, p. 926-931, 2005.

CAVASSANI, K. A. et al. Systemic and local characterization of regulatory T cells in a chronic fungal infection in humans. **J. Immunol.**, v. 177, n. 9, p. 5811-5818, 2006.

CAVROIS, M. et al. Proliferation of HTLV-1 infected circulating cells in vivo in all asymptomatic carriers and patients with TSP/HAM. **Oncogene**, v. 12, n. 11, p. 2419-2423, 1996.

CHATILA, T. A. Role of regulatory T cells in human diseases. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 116, n. 5, p. 949-959, 2005.

COSMI, L. et al. Human CD8+CD25+ thymocytes share phenotypic and functional features with CD4+CD25+ regulatory thymocytes. **Blood**, v. 102, n. 12, p. 4107-4114, 2003.

COUTINHO, R., JR. et al. Human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) proviral load induces activation of T-lymphocytes in asymptomatic carriers. **BMC Infect. Dis.**, v. 14, n. 453, p. 1471-2334, 2014.

DE THE, G.; BOMFORD, R. An HTLV-I vaccine: why, how, for whom? **AIDS Res. Hum Retrov.**, v. 9, n. 5, p. 381-386, 1993.

The definition and classification of dry eye disease: report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007). **Ocul. Surf**, v. 5, n. 2, p. 75-92, 2007.

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

DOURADO, I. et al. HTLV-I in the general population of Salvador, Brazil: a city with African ethnic and sociodemographic characteristics. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.**, v. 34, n. 5, p. 527-531, 2003.

FARRIS, R. L. The dry eye: its mechanisms and therapy, with evidence that contact lens is a cause. **Claio J.**, v. 12, n. 4, p. 234-246, 1986.

FELBERG, S.; DANTAS, P. E. C. Diagnóstico e tratamento da síndrome de Sjögren. **Arq. Bras. Oftalmol.**, v. 69, p. 959-963, 2006.

FERRAZ-CHAOUI, A. K. et al. Study of autoantibodies in patients with keratoconjunctivitis sicca infected by the human T cell lymphotropic virus type 1. **Rheumatol. Int.**, v. 30, n. 6, p. 775-778, 2010.

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

FILACI, G. et al. CD8+ CD28- T regulatory lymphocytes inhibiting T cell proliferative and cytotoxic functions infiltrate human cancers. **J. Immunol.**, v. 179, n. 7, p. 4323-4334, 2007.

FONSECA, E. C.; ARRUDA, G. V.; ROCHA, E. M. Dry eye: etiopathogenesis and treatment. **Arq. Bras. Oftalmol.**, v. 73, n. 2, p. 197-203, 2010.

FOX, R. I. Systemic diseases associated with dry eye. **Int. Ophthalmol. Clin.**, v. 34, n. 1, p. 71-87, 1994.

FRANCHINI, G. et al. Highly attenuated HTLV type I env poxvirus vaccines induce protection against a cell-associated HTLV type I challenge in rabbits. **AIDS Res. Hum Retrov.**, v. 11, n. 2, p. 307-313, 1995.

FRIDMAN, D. et al. Olho seco: conceitos, história natural e classificações. **Arq. Bras. Oftalmol.**, v. 67, p. 181-185, 2004.

GALVAO-CASTRO, B. et al. Distribution of human T-lymphotropic virus type I among blood donors: a nationwide Brazilian study. **Transfusion**, v. 2, n. 37, p. 242-243, 1997.

GAYTON, J. L. Etiology, prevalence, and treatment of dry eye disease. **Clin. Ophthalmol.**, v. 3, p. 405-412, 2009.

GESSAIN, A. Virological aspects of tropical spastic paraparesis/HTLV-I associated myelopathy and HTLV-I infection. **J. Neurovirol.**, v. 2, n. 5, p. 299-306, 1996.

GESSAIN, A.; CASSAR, O. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. **Front. Microbiol.**, v. 3, 2012.

GESSAIN, A.; MAHIEUX, R. Tropical spastic paraparesis and HTLV-1 associated myelopathy: clinical, epidemiological, virological and therapeutic aspects. **Rev. Neurol.**, v. 168, n. 3, p. 257-269, 2012.

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, 1985.

GONCALVES, D. U. et al. Dermatologic lesions in asymptomatic blood donors seropositive for human T cell lymphotropic virus type-1. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 68, n. 5, p. 562-565, 2003.

GRANT, C. et al. Dysregulation of TGF-beta signaling and regulatory and effector T-cell function in virus-induced neuroinflammatory disease. **Blood**, v. 111, n. 12, p. 5601-5609, 2008.

GRASSI, M. F. et al. Human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) proviral load of HTLV-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) patients according to new diagnostic criteria of HAM/TSP. **J. Med. Virol.**, v. 83, n. 7, p. 1269-1274, 2011.

GREEN, J. E. et al. Exocrinopathy resembling Sjogren's syndrome in HTLV-1 tax transgenic mice. **Nature**, v. 341, n. 6237, p. 72-74, 1989.

GUPTA, S.; SHANG, W.; SUN, Z. Mechanisms regulating the development and function of natural regulatory T cells. **Arch. Immunol. Ther. Exp.**, v. 56, n. 2, p. 85-102, 2008.

HAYDAY, A.; TIGELAAR, R. Immunoregulation in the tissues by $\gamma\delta$ T cells. **Nature Rev. Immunol.**, v. 3, n. 3, p. 233-242, 2003.

HENKART, P. et al. The role of cytoplasmic granules in cytotoxicity by large granular lymphocytes and cytotoxic T lymphocytes. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 184, p. 121-138, 1985.

HINUMA, Y. et al. Adult T-cell leukemia: antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. **Procee. Nat. Acad. Sci.**, v. 78, n. 10, p. 6476-6480, 1981.

HJELLE, B. et al. Chronic neurodegenerative disease associated with HTLV-II infection. **The Lancet**, v. 339, n. 8794, p. 645-646, 1992.

HLELA, C. et al. The prevalence of human T-cell lymphotropic virus type 1 in the general population is unknown. **AIDS Rev.**, v. 11, n. 4, p. 205-214, 2009.

HORI, S.; NOMURA, T.; SAKAGUCHI, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. **Science**, v. 299, n. 5609, p. 1057-1061, 2003.

IGAKURA, T. et al. Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. **Science**, v. 299, n. 5613, p. 1713-1716, 2003.

INABA, S. et al. Efficacy of donor screening for HTLV-I and the natural history of transfusion-transmitted infection. **Transfusion**, v. 39, n. 10, p. 1104-1110, 1999.

JACOBSON, S. Immunopathogenesis of human T cell lymphotropic virus type I-associated neurologic disease. **J. Infect. Dis.**, v. 186 Suppl 2, p. S187-192, 2002.

JACOBSON, S. et al. Isolation of HTLV-II from a patient with chronic, progressive neurological disease clinically indistinguishable from HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Ann. Neurol.**, v. 33, n. 4, p. 392-396, 1993.

JARVIS, L. B. et al. Autoreactive human peripheral blood CD8+ T cells with a regulatory phenotype and function. **Eur. J. Immunol.**, v. 35, n. 10, p. 2896-2908, 2005.

JIN, Q. et al. Infection of CD4+ T lymphocytes by the human T cell leukemia virus type 1 is mediated by the glucose transporter GLUT-1: evidence using antibodies specific to the receptor's large extracellular domain. **Virology**, v. 349, n. 1, p. 184-196, 2006.

JONES, K. S. et al. Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 use different receptor complexes to enter T cells. **J. Virol.**, v. 80, n. 17, p. 8291-8302, 2006.

JOOSTEN, S. A.; OTTENHOFF, T. H. Human CD4 and CD8 regulatory T cells in infectious diseases and vaccination. **Hum. Immunol.**, v. 69, n. 11, p. 760-770, 2008.

KALYANARAMAN, V. et al. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. **Science**, v. 218, n. 4572, p. 571-573, 1982.

KAPLAN, J. E. et al. The risk of development of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis among persons infected with HTLV-I. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.**, v. 3, n. 11, p. 1096-1101, 1990.

KASSAN, S. S.; MOUTSOPOULOS, H. M. Clinical manifestations and early diagnosis of Sjögren syndrome. **Arch. Int. Med.**, v. 164, n. 12, p. 1275-1284, 2004.

KAWAI, H. et al. Hashimoto's thyroiditis in HTLV-I carriers. **Int. Med.**, v. 31, n. 10, p. 1213-1216, 1992.

KIMURA, I. [HABA (HTLV-I associated bronchiolo-alveolar disorder)]. **Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi**, v. 30, n. 5, p. 787-795, 1992.

KINOSHITA, K. et al. Demonstration of adult T-cell leukemia virus antigen in milk from three sero-positive mothers. **Gann**, v. 75, n. 2, p. 103-105, 1984.

KMIECIAK, M. et al. Human T cells express CD25 and Foxp3 upon activation and exhibit effector/memory phenotypes without any regulatory/suppressor function. **J. Transl. Med.**, v. 7, n. 89, p. 1479-5876, 2009.

KNIGHT, S. C. et al. Dendritic cells in HIV-1 and HTLV-1 infection. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 329, p. 545-549, 1993.

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 beta receptor. **J. Virol.**, v. 62, n. 2, p. 659-662, 1988.

KRAMER, A. et al. Spontaneous lymphocyte proliferation in symptom-free HTLV-I positive Jamaicans. **Lancet**, v. 2, n. 8668, p. 923-924, 1989,

KUBOTA, R. et al. Demonstration of human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) tax-specific CD8+ lymphocytes directly in peripheral blood of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients by intracellular cytokine detection. **J. Immunol.**, v. 161, n. 1, p. 482-488, 1998.

LAGRENADE, L. et al. Infective dermatitis of Jamaican children: a marker for HTLV-I infection. **Lancet**, v. 336, n. 8727, p. 1345-1347, 1990.

- LAUER, S. A. et al. Orbital T-cell lymphoma in human T-cell leukemia virus-I infection. **Ophthalmology**, v. 95, n. 1, p. 110-115, 1988.
- LEMP, M. A. Report of the National Eye Institute/Industry workshop on Clinical Trials in Dry Eyes. **Ciao J.**, v. 21, n. 4, p. 221-232, 1995.
- LEMP, M. A. Advances in understanding and managing dry eye disease. **Am. J. Ophthalmol.**, v. 146, n. 3, p. 350-356, 2008.
- LEPOUTRE, V. et al. Role of resident CNS cell populations in HTLV-1-associated neuroinflammatory disease. **Front. Biosci.**, v. 14, p. 1152-1168, 2009.
- LEVY-CLARKE, G. A. et al. Human T-cell lymphotropic virus type-1 associated t-cell leukemia/lymphoma masquerading as necrotizing retinal vasculitis. **Ophthalmology**, v. 109, n. 9, p. 1717-1722, 2002.
- LIMA, M. A.; BICA, R. B.; ARAUJO, A. Q. Gender influence on the progression of HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **J. Neurol. Neurosurg. Psych.**, v. 76, n. 2, p. 294-296, 2005.
- MANEL, N. et al. HTLV-1 tropism and envelope receptor. **Oncogene**, v. 24, n. 39, p. 6016-6025, 2005.
- MATSUOKA, M. Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) infection and the onset of adult T-cell leukemia (ATL). **Retrovirology**, v. 2, p. 27, 2005.
- MERLE, H. et al. Ocular lesions in 200 patients infected by the human T-cell lymphotropic virus type 1 in martinique (French West Indies). **Am. J. Ophthalmol.**, v. 134, n. 2, p. 190-195, 2002.
- MERLE, H. et al. Sicca syndrome and HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Jpn. J. Ophthalmol.**, v. 43, n. 6, p. 509-512, 1999.
- 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. 3979-3982, 2006.
- MICHAELSSON, J. et al. The frequency of CD127^{low} expressing CD4⁺CD25^{high} T regulatory cells is inversely correlated with human T lymphotropic virus type-1 (HTLV-1) proviral load in HTLV-1-infection and HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **BMC Immunol.**, v. 9, n. 41, p. 1471-2172, 2008.

MILLS, K. H. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? **Nat. Rev. Immunol.**, v. 4, n. 11, p. 841-855, 2004.

MIZOGUCHI, A. et al. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. **Immunity**, v. 16, n. 2, p. 219-230, 2002.

MOCHIZUKI, M. et al. HTLV-I uveitis: a distinct clinical entity caused by HTLV-I. **Jpn J. Cancer Res.**, v. 83, n. 3, p. 236-239, 1992.

MONTELEONE, G. et al. Blocking Smad7 restores TGF-beta1 signaling in chronic inflammatory bowel disease. **J. Clin. Invest.**, v. 108, n. 4, p. 601-609, 2001.

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

MUELLER, N. et al. Findings from the Miyazaki Cohort Study. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum Retrovirol.**, v. 13, n. 1, p. S2-7, 1996.

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

MURPHY, E. L. et al. Respiratory and urinary tract infections, arthritis, and asthma associated with HTLV-I and HTLV-II infection. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 10, n. 1, p. 109-116, 2004.

NAGAI, M. et al. Analysis of HTLV-I proviral load in 202 HAM/TSP patients and 243 asymptomatic HTLV-I carriers: high proviral load strongly predisposes to HAM/TSP. **J. Neurovirol.**, v. 4, n. 6, p. 586-593, 1998.

NAKANO, S. et al. Search for possible routes of vertical and horizontal transmission of adult T-cell leukemia virus. **Gann**, v. 75, n. 12, p. 1044-1045, 1984.

NAKAO, K. et al. Pigmentary retinal degeneration in patients with HTLV-I-associated myelopathy. **Jpn. J. Ophthalmol.**, v. 33, n. 4, p. 383-391, 1989.

NATH, M. D. et al. Regulation of the cell-surface expression of an HTLV-I binding protein in human T cells during immune activation. **Blood**, v. 101, n. 8, p. 3085-3092, 2003.

NISHIOKA, K.; SUMIDA, T.; HASUNUMA, T. Human T lymphotropic virus type I in arthropathy and autoimmune disorders. **Arthritis Rheum.**, v. 39, n. 8, p. 1410-1418, 1996.

NISHIURA, Y. et al. Increased production of inflammatory cytokines in cultured CD4+ cells from patients with HTLV-I-associated myelopathy. **Tohoku J. Exp. Med.**, v. 179, n. 4, p. 227-233, 1996.

NORRIS, P. J. et al. Human T cell leukemia virus type 1 infection drives spontaneous proliferation of natural killer cells. **Virulence**, v. 1, n. 1, p. 19-28, 2010.

OHBA, N. et al. Ocular manifestations in patients infected with human T-lymphotropic virus type I. **Jpn. J. Ophthalmol.**, v. 33, n. 1, p. 1-12, 1989.

OLINDO, S. et al. HTLV-1 proviral load in peripheral blood mononuclear cells quantified in 100 HAM/TSP patients: a marker of disease progression. **J. Neurol. Sci.**, v. 237, n. 1-2, p. 53-59, 2005.

ONO, A. et al. Increased number of circulating HTLV-1 infected cells in peripheral blood mononuclear cells of HTLV-1 uveitis patients: a quantitative polymerase chain reaction study. **Br. J. Ophthalmol.**, v. 79, n. 3, p. 270-276, 1995.

OSAME, M. Review of WHO Kagoshima meeting and diagnostic guidelines for HAM/TSP. **Human retrovirology: HTLV**, v. 1, p. 191-197, 1990.

OSAME, M. et al. Recent studies on the epidemiology, clinical features and pathogenic mechanisms of HTLV-I associated myelopathy (HAM/TSP) and other diseases associated to HTLV. **J. Neurovirol.**, v. 3 Suppl 1, p. S50-51, 1997.

PAIS-CORREIA, A. M. et al. Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses. **Nat. Med.**, v. 16, n. 1, p. 83-89, 2010.

PAPIERNIK, M. et al. T cell deletion induced by chronic infection with mouse mammary tumor virus spares a CD25-positive, IL-10-producing T cell population with infectious capacity. **J. Immunol.**, v. 158, n. 10, p. 4642-4653, 1997.

PEARSON, C.; MCDEVITT, H. Redirecting Th1 and Th2 responses in autoimmune disease. In: (Ed.). **Redirection of Th1 and Th2 Responses**, 1999. p.79-122.

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. **Procee. Nat. Acad. Sci.** v. 77, n. 12, p. 7415-7419, 1980.

PRESTON, B. D.; DOUGHERTY, J. P. Mechanisms of retroviral mutation. **Trends Microbiol.**, v. 4, n. 1, p. 16-21, 1996.

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. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 42, n. 8, p. 761-764, 2009.

PROIETTI, F. A. et al. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. **Oncogene**, v. 24, n. 39, p. 6058-6068, 2005.

RATHSAM-PINHEIRO, R. H. et al. Ocular lesions in HTLV-1 infected patients from Salvador, State of Bahia: the city with the highest prevalence of this infection in Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 42, n. 6, p. 633-637, 2009.

RICHARDSON, J. H. et al. In vivo cellular tropism of human T-cell leukemia virus type 1. **J. Virol.**, v. 64, n. 11, p. 5682-5687, 1990.

SAJI, F. et al. Perinatal infection of human T-lymphotropic virus type I, the etiologic virus of adult T-cell leukemia/lymphoma. DNA amplification of specific human T-lymphotropic virus type I sequences. **Cancer**, v. 66, n. 9, p. 1933-1937, 1990.

SAKAGUCHI, S. et al. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 10, n. 7, p. 490-500, 2010.

SAKAGUCHI, S. et al. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. **J. Immunol.**, v. 155, n. 3, p. 1151-1164, 1995.

SAKAGUCHI, S. et al. Regulatory T cells and immune tolerance. **Cell**, v. 133, n. 5, p. 775-787, 2008.

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

SANTOS, S. B. et al. Modulation of T cell responses in HTLV-1 carriers and in patients with myelopathy associated with HTLV-1. **Neuroimmunomodulation**, v. 13, n. 3, p. 145-151, 2006.

SATO, T. et al. CSF CXCL10, CXCL9, and neopterin as candidate prognostic biomarkers for HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **PLoS Negl Trop. Dis.**, v. 7, n. 10, p. e2479, 2013.

SATOU, Y. et al. HTLV-1 modulates the frequency and phenotype of FoxP3+CD4+ T cells in virus-infected individuals. **Retrovirology**, v. 9, n. 46, p. 1742-4690, 2012.

SCHULTZ, C. Safety and efficacy of cyclosporine in the treatment of chronic dry eye. **Ophthalmol. Eye Dis.**, v. 6, p. 37-42, 2014.

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.

SEIKI, M. et al. Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**, v. 80, n. 12, p. 3618-3622, 1983.

SHIMIZU, J. et al. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. **Nat. Immunol.**, v. 3, n. 2, p. 135-142, 2002.

SHIMOYAMA, M. Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukaemia-lymphoma. A report from the Lymphoma Study Group (1984-87). **Br. J. Haematol.**, v. 79, n. 3, p. 428-437, 1991.

SIPSAS, N. V.; GAMALETSSOU, M. N.; MOUTSOPOULOS, H. M. Is Sjogren's syndrome a retroviral disease? **Arthritis Res. Ther.**, v. 13, n. 2, p. 212, 2011.

SODROSKI, J. The human T-cell leukemia virus (HTLV) transactivator (Tax) protein. **Bioch. Biophys. Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1114, n. 1, p. 19-29, 1992.

STERN, M. E.; PFLUGFELDER, S. C. Inflammation in dry eye. **Ocul Surf**, v. 2, n. 2, p. 124-130, 2004.

TAJIMA, K. The 4th nation-wide study of adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) in Japan: estimates of risk of ATL and its geographical and clinical features. The T- and B-cell Malignancy Study Group. **Int. J. Cancer**, v. 45, n. 2, p. 237-243, 1990.

TAJIMA, K. et al. Epidemiological analysis of the distribution of antibody to adult T-cell leukemia-virus-associated antigen: possible horizontal transmission of adult T-cell leukemia virus. **Gann**, v. 73, n. 6, p. 893-901, 1982.

TENNAKOON, D. K. et al. Therapeutic induction of regulatory, cytotoxic CD8+ T cells in multiple sclerosis. **J. Immunol.**, v. 176, n. 11, p. 7119-7229, 2006.

TERRY, M. A. Dry eye in the elderly. **Drugs Aging**, v. 18, n. 2, p. 101-107, 2001.

TESSEUR, I. et al. Deficiency in neuronal TGF-beta signaling promotes neurodegeneration and Alzheimer's pathology. **J Clin Invest**, v. 116, n. 11, p. 3060-3069, 2006.

TOULZA, F. et al. High frequency of CD4+FoxP3+ cells in HTLV-1 infection: inverse correlation with HTLV-1-specific CTL response. **Blood**, v. 111, n. 10, p. 5047-5053, 2008.

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

VALIM, V. et al. Current Approach to Dry Eye Disease. **Clin. Rev. Allergy Immunol.**, v. 1, p. 1, 2014.

VERDONCK, K. et al. Human T-lymphotropic virus 1: recent knowledge about an ancient infection. **The Lancet Infect. Dis.** v. 7, n. 4, p. 266-281, 2007.

VIGNALI, D. A.; COLLISON, L. W.; WORKMAN, C. J. How regulatory T cells work. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 8, n. 7, p. 523-532, Jul 2008.

VITALI, C.; MOUTSOPOULOS, H. M.; BOMBARDIERI, S. The European Community Study Group on diagnostic criteria for Sjogren's syndrome. Sensitivity and specificity of tests for ocular and oral involvement in Sjogren's syndrome. **Ann. Rheum. Dis.**, v. 53, n. 10, p. 637-647, Oct 1994.

WARD, S. M. et al. Quantification and localisation of FOXP3+ T lymphocytes and relation to hepatic inflammation during chronic HCV infection. **J. Hepatol.**, v. 47, n. 3, p. 316-324, 2007.

WATANABE, T.; SEIKI, M.; YOSHIDA, M. HTLV type I (US isolate) and ATL (Japanese isolate) are the same species of human retrovirus. **Virology**, v. 133, n. 1, p. 238-241, 1984.

WATTEL, E. et al. Clonal expansion of human T-cell leukemia virus type I-infected cells in asymptomatic and symptomatic carriers without malignancy. **J. Virol.**, v. 69, n. 5, p. 2863-2868, 1995.

WOLFE, N. D. et al. Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. **Procee. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 102, n. 22, p. 7994-7999, 2005.

YAMAGUCHI, K. Human T-lymphotropic virus type I in Japan. **Lancet**, v. 343, n. 8891, p. 213-216, 1994.

YAMAGUCHI, K.; WATANABE, T. Human T lymphotropic virus type-I and adult T-cell leukemia in Japan. **Int. J. Hematol.**, v. 2, p. 240-245, 2002.

YAMAMOTO, J. H. et al. Human T-cell lymphotropic virus type 1 infection and ocular manifestations in Sao Paulo, Brazil. **Arch. Ophthalmol.**, v. 117, n. 4, p. 513-517, 1999.

YAMANO, Y. et al. Virus-induced dysfunction of CD4+CD25+ T cells in patients with HTLV-I-associated neuroimmunological disease. **J. Clin. Invest.**, v. 115, n. 5, p. 1361-1368, 2005.

YOSHIDA, M. Multiple viral strategies of HTLV-1 for dysregulation of cell growth control. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 19, p. 475-496, 2001.

APÊNDICE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa: “*Caracterização clínica e imunológica da Ceratoconjuntivite Seca (CCS) associada ao Vírus Linfotrópico de Células T humana tipo 1 (HTLV-1)*,”

Resolução CNS 196/96 do Ministério da Saúde

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

A ceratoconjuntivite seca é uma doença que leva a uma diminuição de lágrimas, ocasionando ressecamento nos olhos. Ela tem se mostrado mais comum em pacientes com HTLV. Nosso objetivo com esse estudo é determinar quais são os sintomas da ceratoconjuntivite seca nas pessoas que tem esse vírus e como o sistema imune (as células) se defende do vírus. Você será submetido a **um exame oftalmológico**, por médicos treinados para esse fim. Neste exame serão realizados 3 testes onde vamos pingar corantes chamados de “fluoresceína” e “rosa bengala” e um colírio anestésico para colocação de uma pequena faixa de papel de 05 mm de largura no canto dos olhos. **Durante esses procedimentos é comum a sensação de ardor ocular pela maioria dos pacientes.** Se for identificado qualquer alteração, você receberá tratamento e orientação adequados. Além disso, nós pedimos que você doe 25ml de sangue (mais ou menos uma colher de sopa) para estudar suas células no laboratório. **A punção venosa será realizada por profissional treinado. No entanto, pode existir um desconforto associado à punção venosa ou o aparecimento de um pequeno hematoma.**

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

Acredito ter sido suficientemente esclarecido a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo a pesquisa: **Caracterização clínica e imunológica da Ceratoconjuntivite Seca (CCS) associada ao Vírus Linfotrópico de Células T humana tipo 1 (HTLV-1)**

Assinatura do paciente ou representante legal

Assinatura da testemunha

Manuscrito em preparação**EVALUATION CD4⁺FOXP3⁺ AND CD8⁺ FOXP3⁺ T CELL IL-10 AND TGF- β PRODUCERS IN KERATOCONJUNCTIVITIS SICCA ASSOCIATED WITH HTLV-1**

Regina Santos Nascimento¹, Marcus Vinícius Alves Lima¹, Luana Leandro Gois^{1,2}, Cristina Castro-Lima Vargens², Bernardo Galvão-Castro^{1,2}, Maria Fernanda Rios Grassi^{1,2}

¹ Advanced Laboratory of Public Health/Gonçalo Moniz Research Center - Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Salvador, Bahia, Brazil.

² Bahiana School of Medicine and Public Health, Salvador, Bahia, Brazil.

³Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil.

Abstract:

HTLV-1 is the causative agent of leukemia/lymphoma adult T-cell (ATLL), tropical spastic paraparesis / myelopathy associated with HTLV-1 (HAM / TSP) and uveitis. In addition, keratoconjunctivitis sicca (KCS), a multifactorial disease of the tear and of the ocular surface, has been more frequently reported in patients infected with HTLV-1. As for other HTLV-1-associated diseases, KCS has been related to a high proviral load. Regulatory T (Treg) cells are important in maintaining the homeostasis of the immune system. An impairment in the immunoregulation function of Treg may contribute to the inflammatory environment observed in the KCS. This study aimed to evaluate the Treg cells of patients with KCS associated with HTLV-1. Frequency of activated T cells (HLA-DR⁺) and CD4⁺ and CD8⁺ Treg cells (FOXP3⁺), as well as IL-10 and TGF- β production by Treg were quantified using flow cytometry. Thirty-seven HTLV-1 individuals were included (27 asymptomatic for HAM/TSP with positive diagnosis of ocular manifestation (KCS), 10 with negative diagnosis (ASS - asymptomatic). Seventeen non-infected individuals were included as controls (NI). The frequencies of CD4⁺ FOXP3⁺ T cells, CD8⁺FOXP3⁺, CD4⁺HLA-DR⁺ and CD8⁺HLA-DR⁺ were significantly higher in KCS and ASS groups when compared to non-infected individuals. As the production of immunosuppressive cytokines, a higher frequency of CD4⁺ FOXP3⁺ double producers of IL-10 and TGF- β in the KCS group was observed when compared to group ASS. Regarding the CD8⁺FOXP3⁺ lymphocytes, the KCS group had a higher frequency of mono cells producing IL-10 when compared to the ASS. Our results suggest that the lower frequency of Treg cells CD8⁺ TGF- β -producing in individuals infected with HTLV-1 with KCS, may contribute to the intensification of cellular activation and pathophysiology of the disease.

Keywords: HTLV-1, keratoconjunctivitis sicca, regulatory T lymphocytes.

Introduction

Human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) was the first human retrovirus associated with pathological manifestations described. It is transmitted via horizontal, vertical and parenteral. It is estimated that infection affects approximately 5 to 10 million people worldwide (GESSAIN; CASSAR, 2012), being endemic areas the southwestern Japan, the Caribbean, Equatorial Africa, South America and areas located in Iran and Melanesia. (DE THE; BOMFORD, 1993; GESSAIN; CASSAR, 2012; MUELLER et al., 1996). In Brazil, the city of Salvador stands out for presenting a high prevalence in the general population - 1.76% - of individuals infected by this retrovirus (DOURADO et al., 2003).

The HTLV-1 is etiologically associated with adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL), HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) and uveitis (GESSAIN et al., 1985; MOCHIZUKI et al., 1992; POIESZ et al., 1980). Apart from these, keratoconjunctivitis sicca (KCS) has been related to viral infection (MERLE et al., 2002; RATHSAM-PINHEIRO et al., 2009). The KCS or dry eye disease is a multifactorial disease characterized by increased tear film osmolarity and ocular surface inflammation with symptoms of discomfort and visual alteration and potential damage to the ocular surface (The definition and classification of dry eye disease: report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop, 2007).

In individuals infected by the virus, the prevalence of KCS is higher in those who are diagnosed with HAM/TSP, when compared to individuals without myelopathy (MERLE et al., 2002; RATHSAM-PINHEIRO et al., 2009). An increase of proviral load is often observed in patients with diseases associated with infection, particularly those with HAM/ TSP, infectious dermatitis, and uveitis (GRASSI et al., 2011; NAGAI et al., 1998; OLINDO et al., 2005; PRIMO et al., 2009). Recently, Vargens and colleagues demonstrated an association between high proviral load and the presence of KCS in patients infected with HTLV-1 (CASTRO-LIMA VARGENS et al., 2011). However, there are no data on KCS immunopathogenesis in infection.

The regulatory T cells (Treg) are a subpopulation of T cells important in maintaining homeostasis of the immune system. These cells may be involved in the immunopathogenesis of HTLV-1, since they suppress the activation of cytotoxic T lymphocytes, which are important in limiting the replication of HTLV-1, raising the maintenance of the proviral load (HORI; NOMURA; SAKAGUCHI, 2003).

There are few studies evaluating the involvement of Treg cells in the development of HAM / TSP and other diseases associated with HTLV-1, such as KCS. The conduct of this study aimed to assist in understanding the role of regulatory T lymphocytes in the context of mechanisms of pathogenesis of said ocular manifestation in carriers of this retrovirus. Our hypothesis is that functional impairment of Treg cells potentiates cellular activation, contributing to the development of KCS in individuals infected with HTLV-1.

Materials and Methods

Patients and ethical aspects

Were included in the study three groups of individuals, one of them composed of uninfected volunteers (NI) and two of them by infected with HTLV-1, asymptomatic for myelopathy, from the HTLV Center of the Bahiana School of Medicine and Public Health (Salvador, Bahia, Brazil). One of these groups was composed of infected patients with negative diagnosis for KCS (ASS) and the other with a positive diagnosis (KCS). Patients included were previously identified in the project "Clinical and immunological characterization of keratoconjunctivitis sicca (KCS) associated with human T cells lymphotropic virus type 1". Were excluded subjects diagnosed with HAM/TSP, and those with other chronic viral infections such as HIV-1 and hepatitis B and C. The study was submitted to the Ethics Committee in Search of Bahiana School of Medicine and Public Health and approved under registration number 187/2011. The written informed consents were obtained from all participants or their legal representatives.

Flow cytometry assessment

Evaluation of activation and regulation phenotype

For tagging molecules present on the cell surface, an aliquot of 100 μ L of whole blood was incubated for 15 minutes at room temperature with monoclonal antibodies for human CD3^{APC-CY7}, CD4^{FITC}, CD8^{APC}, HLA-DR^{PE} (Pharmingen Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), as well as isotype controls for each fluorochrome used. Stained samples were treated with FACS Lysing Solution (1X) (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) for lysis of erythrocytes according to the manufacturer's instructions and washed twice with PBS/BSA 0.5%. After a last wash, the supernatant was discarded and the cells were fixed with PBS/paraformaldehyde 0.4%. To detect intracellular FOXP3, the cells were stained for surface markers (CD3, CD4 and CD8) and then treated with PBS/paraformaldehyde 2% and PBS/BSA/Saponin 0.2% for the fixation and permeabilization before intracellular protein detection. After incubation for 30 minutes with anti-FOXP3^{PE}, the cells were washed and fixed. Analyses were performed using the flow cytometer FACSaria II (BD San Jose CA, USA). At least 100,000 events were analyzed per sample. The events were plotted as a function of FSC x SSC parameters and analyzed by FlowJo software (Tree Star) software.

Evaluation of intracellular production of IL-10 and TGF- β on CD4⁺ and CD8⁺ T cells

PBMCs obtained from heparinized blood samples were suspended in RPMI 1640 medium (Sigma), supplemented with 2 mM L-glutamine (SIGMA), 1% nonessential amino acids (GIBCO), 1mM sodium pyruvate (SIGMA), 100 U/mL penicillin (SIGMA), 100 μ g/mL streptomycin (SIGMA), 100 μ g/mL HEPES (Invitrogen) and 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Hyclone Laboratories, Logan UT). PBMCs (1×10^6) were cultured in the presence of

phytohemagglutinin, as positive control, and in the absence of stimulations for 24 hours in a 5% CO₂ incubator at 37°C. Monensin and brefeldin A were added into the culture 5 hours before the end of incubation. After this time, cells were harvested and stained with anti-CD3^{APC-CY7} and anti-CD8^{APC}. Isotypes antibodies were used as control in each experiment. Then, the cells were fixed and permeabilized with a specific kit for intracellular labeling of FOXP3, (BioLegend's FOXP3 Fix/Perm Buffer Set), according to the manufacturer's recommendations. Cells were incubated for 30 minutes at room temperature with anti-FOXP3^{PE}, anti-IL-10^{APC} and anti-TGF-β^{FITC} (ebioscience). After incubation, the cells were washed and analyzed by FlowJo software (Tree Star) software, as described above.

Statistical analysis

Data were expressed as median and interquartile range (25th percentile and the 75th percentile). Mann-Whitney and Kruskal–Wallis following of the Dunn multiple comparison test were used to assessment differences between two or three different groups. The correlations were performed by Spearman correlation test. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant. The GraphPad Prism 5 (La Jolla, CA) software was used for all statistical analyses.

Results

The study included 54 individuals, of which 17 were volunteers not infected (NI) and 37 were patients infected with HTLV-1 and asymptomatic for HAM-TSP (27 with positive diagnosis for dry ceratoconjunctive - KCS - and 10 with negative diagnosis - ASS). Patients were analyzed according to sex and age. Of the fifty-four individuals included in this study, thirty-seven were female (68.5%) and seventeen were male (31.5%). Ages ranged from 18 to 80 years. There was no difference between the percentage of men ($p = 0.367$) and women ($p = 0.367$) and the mean age ($p = 0.190$) of the study groups (**table 1**).

The frequency of CD4⁺ and CD8⁺ T cells with regulatory profile was determined by transcription factor FOXP3 expression. This analysis revealed in CD4⁺ and CD8⁺ T cells an increase in FOXP3 expression in the ASS and KCS group compared to the uninfected control group ($p = 0.0001$ and $p = 0.0001$, respectively) (**Figure 1**). This increase of CD4⁺FOXP3⁺ was about five times higher in infected individuals compared to non-infected ($p < 0.0001$; median: 7.4 and 1.3 respectively - data not shown). The frequency of FOXP3 in CD8⁺ T cells was twice as high in patients infected compared to uninfected (median: 5.3 and 2.4 respectively - data not shown).

For analysis of cell activation, we evaluated the expression of surface glycoprotein HLA-DR. There was an increased frequency of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes expressing HLA-DR in the ASS and KCS groups in relation to the NI

control group ($p < 0.0001$ and $p < 0.0001$, respectively) (**Figure 2**). Through the analysis of the fluorescence intensity, it was not observed among the three groups significant differences in the expression of this activation molecule in $CD4^+$ T lymphocytes ($p = 0.14$) and $CD8^+$ ($p = 0.57$) (data not shown)

As noted in **Figure 3**, the frequency of $CD4^+FOXP3^+$ T lymphocytes TGF- β only producers was significantly higher in KCS group compared to the group of NI subjects ($p = 0.008$; median: 65.2% and 12.5% respectively), whereas the frequency of $CD4^+FOXP3^+$ double producers of TGF- β and IL-10 was higher in KCS compared to the ASS group ($p = 0.03$; median: 3.96 and 0.04 respectively). Individuals NI group had an IL-10 production greater than ASS patients ($p = 0.007$).

Regarding the production of suppressive cytokines in $CD8^+FOXP3^+$ T lymphocytes, found that patients KCS group had a higher frequency of cells IL-10 only producers, compared to the ASS subjects ($p = 0.012$; median: 8.15, and 1.42, respectively). The ASS group had a higher frequency of $CD8^+FOXP3^+$ T cells TGF- β only producers ($p = 0.0014$) and TGF- β and IL-10 double producers ($p = 0.002$) when compared to the group of individuals NI (**Figure 4**).

Discussion

Regulatory T cells are important in the prevention of tissue damage caused by the immune response, playing an important role in maintaining homeostasis of the system and performing a protective function during chronic viral, bacterial and fungal infections. (BELKAID; TARBELL, 2009; MILLS, 2004).

The importance of Treg cells has been demonstrated in various models of infection, however, its role in HTLV-1 infection and KCS is unclear. This work presented for the first time data on the regulatory response in the context of KCS associated with HTLV-1. The results indicate that the frequency of $CD4^+FOXP3^+$ and $CD8^+FOXP3^+$ T cells is higher in patients with a diagnosis of KCS, than in individuals not infected with HTLV-1, however there was no difference when the KCS group were compared with asymptomatic infected individuals. Moreover, a higher frequency of $CD4^+FOXP3^+$ T cells IL-10 and TGF- β double producers and TGF- β only producers in KCS group was observed compared to the ASS and NI, respectively. Our results confirm previous studies which demonstrated an expansion of regulatory T cells ($CD4^+FOXP3^+$) in asymptomatic individuals infected with the virus and with diagnosis of HAM/ TSP compared to healthy donors (BEST e al., 2009; COUTINHO et al., 2014; TOULZA et al., 2008). In the present study, we demonstrate for the first time a higher frequency of $CD8^+FOXP3^+$ T cells in infected individuals with HTLV-1, illustrating the diversity of regulatory cell subclasses that may be involved in the development of the suppressive response. Moreover, a higher frequency of $CD8^+FOXP3^+$ T cells IL-10 only producers was observed in the KCS group compared to the ASS.

The intense activation of the immune system induced by the virus is present even in patients with low proviral load (<1% infected cells) (COUTINHO et al., 2014). In the present study, the subjects of the ASS and KCS groups showed an increased frequency of CD4⁺ and CD8⁺ T cells activated (HLA-DR⁺) compared to the NI group. The HLA-DR molecule has been described as a marker of cellular activation in HTLV-1 in both asymptomatic subjects and in patients with HAM/TSP (BRITO-MELO et al., 2007; COUTINHO et al., 2014).

It is possible that the expansion of Treg cells targeted by the virus is not enough to contain the intense cellular activation triggered by HTLV-1. On the other hand, the FOXP3 expression in CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes does not only occur in regulatory cells, since this protein can be also expressed in activated T lymphocytes (ALLAN et al., 2007; KMIĘCIAK et al., 2009). Yamano and collaborators described a lower FOXP3 expressing CD4⁺ CD25⁺ cells correlates with suppressive function decreased in patients with HAM/TSP patients as compared to healthy individuals (YAMANO et al., 2005). This result differs from that described in this study, however we used the marker FOXP3 and cytokine production to characterize Treg cells. Other factors may be related to lower suppressor function, such as changes in cytokine signaling pathway. In fact, a study conducted by Grant and collaborators identified a lower expression of TGF-βRII receiver, resulting in a disruption in the signaling pathway of TGF-β in individuals infected with HTLV-1 with HAM/TSP. The same study demonstrated an inverse correlation between the proviral load and expression of TGF-βRII receiver, and the frequency of CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ cells (GRANT et al., 2008). The authors suggest that a dysfunction in the signaling pathway of TGF-β may be a cofactor in the progression of HAM/TSP. Changes in signaling pathways of cytokines have also been described in the pathogenesis of bowel inflammatory disease and the development of Alzheimer's, confirming the importance of this signaling pathway in protection against chronic inflammatory diseases (GRANT et al., 2008; MONTELEONE et al., 2001; TESSEUR et al., 2006). Future studies in this context can clarify whether the slightest expression of TGF-βRII receptor is involved in the CCS associated with HTLV-1.

The expansion of CD8⁺ Treg cells have also been linked to autoimmune inflammatory disorders such as ankylosing spondylitis (JARVIS et al., 2005), type 1 diabetes (BISIKIRSKA et al., 2005), multiple sclerosis (TENNAKOON et al., 2006) and bowel inflammatory disease (BRIMNES et al., 2005). However, these cells have been characterized in a much smaller proportion when compared to CD4⁺ Treg, so that their phenotype and effector mechanisms remain poorly understood. Some studies point to suppression mechanisms contact cell-cell, via cell surface expression of CTLA-4 and TGF-β, others suggest that IL-10 cytokine is closely related to the inhibition of cellular proliferation, either alone or in combination TGF-β, and CTLA-4 (CAI et al., 2004; COSMI et al., 2003; FILACI et al., 2007; JARVIS et al., 2005; JOOSTEN; OTTENHOFF, 2008).

Although the immunopathological mechanisms KCS associated with HTLV-1 are not established, the virus appears to have an important role. A high proviral load (above 10% of infected cells) was associated with the presence KCS (CASTRO-LIMA VARGENS et al., 2011). Moreover, KCS associated with HTLV-1 differs in several

aspects of autoimmune primary Sjögren's syndrome, probably being closest to the dry syndrome caused by other viral infections such as HIV and Hepatitis C virus (ALVES; ANGERAMI; ROCHA, 2013; SIPSAS; GAMALETSSOU; MOUTSOPOULOS, 2011). The virus could induce lymphocytic infiltration in the glandular tissue with inflammation and functional damage. There is a tropism for lymphocytes expressing the tax gene for the salivary and lacrimal glands in mice (GREEN et al., 1989). It is possible that the expansion of Treg lymphocytes, especially CD8⁺ subpopulation favoring the activation of autoreactive T-cell clones or these cells exert some degree of autoreactivity, leading to an inflammatory process in lacrimal glands. CD8⁺ lymphocytes clones with self-reactive profile were already described in ankylosing spondylitis (LORNA, 2005).

One limitation of this study is the evaluation of Treg cells in the bloodstream and not at the site of injury. The suppressive effect mediated by Treg cells occurs by cell-cell contact or by secretion of immunosuppressive cytokines, indicating close proximity to the target cell, which implies the need for the presence of regulatory cells at the site of the disease, such as cancer, infections fungal and HCV (CAVASSANI et al., 2006; FILACI et al., 2007; WARD et al., 2007).

In conclusion, this study indicates that while occurs an expansion of Treg cells (CD4⁺ and CD8⁺) in HTLV-1, there is not an efficiently control of cell activation. Future studies should be conducted to assess more accurately the regulatory mechanisms played by Treg CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes. The use of other markers, as well as different methodological strategies, to assess the suppressive activity of these cells are included in the outlook for continuation of this work.

REFERENCES

- ALLAN, S. E. et al. Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. **Int Immunol**, v. 19, n. 4, p. 345-54, 2007.
- ALVES, M.; ANGERAMI, R. N.; ROCHA, E. M. Dry eye disease caused by viral infection: review. **Arq Bras Oftalmol**, v. 76, n. 2, p. 129-32, Mar-Apr 2013.
- BEST, I. et al. IFN-gamma production in response to Tax 161-233, and frequency of CD4+ Foxp3+ and Lin HLA-DRhigh CD123+ cells, discriminate HAM/TSP patients from asymptomatic HTLV-1-carriers in a Peruvian population. **Immunology**, v. 128, n. 1 Suppl, p. 1365-2567, 2009.
- BISIKIRSKA, B. et al. TCR stimulation with modified anti-CD3 mAb expands CD8+ T cell population and induces CD8+CD25+ Tregs. **J Clin Invest**, v. 115, n. 10, p. 2904-13, 2005.
- BRIMNES, J. et al. Defects in CD8+ regulatory T cells in the lamina propria of patients with inflammatory bowel disease. **J Immunol**, v. 174, n. 9, p. 5814-22, 2005.
- BRITO-MELO, G. E. et al. IL-10 produced by CD4+ and CD8+ T cells emerge as a putative immunoregulatory mechanism to counterbalance the monocyte-derived TNF-alpha and guarantee asymptomatic clinical status during chronic HTLV-I infection. **Clin Exp Immunol**, v. 147, n. 1, p. 35-44, 2007.
- CAI, J. et al. Minor H antigen HA-1-specific regulator and effector CD8+ T cells, and HA-1 microchimerism, in allograft tolerance. **J Exp Med**, v. 199, n. 7, p. 1017-23, 2004.
- CASTRO-LIMA VARGENS, 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. **J Clin Virol**, v. 52, n. 3, p. 177-80, 2011.
- CAVASSANI, K. A. et al. Systemic and local characterization of regulatory T cells in a chronic fungal infection in humans. **J Immunol**, v. 177, n. 9, p. 5811-8, 2006.
- COUTINHO, R., JR. et al. Human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) proviral load induces activation of T-lymphocytes in asymptomatic carriers. **BMC Infect Dis**, v. 14, n. 453, p. 1471-2334, 2014.
- COSMI, L. et al. Human CD8+CD25+ thymocytes share phenotypic and functional features with CD4+CD25+ regulatory thymocytes. **Blood**, v. 102, n. 12, p. 4107-14, 2003.
- MUELLER, N. et al. Findings from the Miyazaki Cohort Study. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol**, v. 13, n. 1, p. S2-7, 1996.
- DE THE, G.; BOMFORD, R. An HTLV-I vaccine: why, how, for whom? **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 9, n. 5, p. 381-6, 1993.
- DOURADO, I. et al. HTLV-I in the general population of Salvador, Brazil: a city with African ethnic and sociodemographic characteristics. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 34, n. 5, p. 527-31, 2003.
- FILACI, G. et al. CD8+ CD28- T regulatory lymphocytes inhibiting T cell proliferative and cytotoxic functions infiltrate human cancers. **J Immunol**, v. 179, n. 7, p. 4323-34, 2007.

GESSAIN, A.; CASSAR, O. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, 2012-November-15 2012.

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, 1985.

GRASSI, M. F. et al. Human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) proviral load of HTLV-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) patients according to new diagnostic criteria of HAM/TSP. **J Med Virol**, v. 83, n. 7, p. 1269-74, 2011.

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

HORI, S.; NOMURA, T.; SAKAGUCHI, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. **Science**, v. 299, n. 5609, p. 1057-61, 2003.

JARVIS, L. B. et al. Autoreactive human peripheral blood CD8+ T cells with a regulatory phenotype and function. **Eur J Immunol**, v. 35, n. 10, p. 2896-908, 2005.

JOOSTEN, S. A.; OTTENHOFF, T. H. Human CD4 and CD8 regulatory T cells in infectious diseases and vaccination. **Hum Immunol**, v. 69, n. 11, p. 760-70, 2008.

KMIECIAK, M. et al. Human T cells express CD25 and Foxp3 upon activation and exhibit effector/memory phenotypes without any regulatory/suppressor function. **J Transl Med**, v. 7, n. 89, p. 1479-5876, 2009.

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

MILLS, K. H. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? **Nat Rev Immunol**, v. 4, n. 11, p. 841-55, 2004.

MOCHIZUKI, M. et al. HTLV-I uveitis: a distinct clinical entity caused by HTLV-I. **Jpn J Cancer Res**, v. 83, n. 3, p. 236-9, 1992.

MONTELEONE, G. et al. Blocking Smad7 restores TGF-beta1 signaling in chronic inflammatory bowel disease. **J Clin Invest**, v. 108, n. 4, p. 601-9, 2001.

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

OLINDO, S. et al. HTLV-1 proviral load in peripheral blood mononuclear cells quantified in 100 HAM/TSP patients: a marker of disease progression. **J Neurol Sci**, v. 237, n. 1-2, p. 53-9, 2005.

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. **Braz J Med Biol Res**, v. 42, n. 8, p. 761-4, 2009.

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**, v. 77, n. 12, p. 7415-7419, 1980.

RATHSAM-PINHEIRO, R. H. et al. Ocular lesions in HTLV-1 infected patients from Salvador, State of Bahia: the city with the highest prevalence of this infection in Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 42, n. 6, p. 633-7, 2009.

The definition and classification of dry eye disease: report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye WorkShop (2007). **Ocul Surf**, v. 5, n. 2, p. 75-92, 2007.

TESSEUR, I. et al. Deficiency in neuronal TGF-beta signaling promotes neurodegeneration and Alzheimer's pathology. **J Clin Invest**, v. 116, n. 11, p. 3060-9, 2006.

TENNAKOON, D. K. et al. Therapeutic induction of regulatory, cytotoxic CD8+ T cells in multiple sclerosis. **J Immunol**, v. 176, n. 11, p. 7119-29, 2006.

TOULZA, F. et al. High frequency of CD4+FoxP3+ cells in HTLV-1 infection: inverse correlation with HTLV-1-specific CTL response. **Blood**, v. 111, n. 10, p. 5047-53, 2008.

WARD, S. M. et al. Quantification and localisation of FOXP3+ T lymphocytes and relation to hepatic inflammation during chronic HCV infection. **J Hepatol**, v. 47, n. 3, p. 316-24, 2007.

YAMANO, Y. et al. Virus-induced dysfunction of CD4+CD25+ T cells in patients with HTLV-I-associated neuroimmunological disease. **J Clin Invest**, v. 115, n. 5, p. 1361-8, 2005.

TABLES

Table 1 - Characteristics of the subjects included in the study groups.

Groups	Age (years) mean \pm SD	Women (%)
NI	42,5 \pm 13,23	11 (65%)
ASS	49,4 \pm 13,10	09 (90%)
KCS	50,0 \pm 14,75	17 (63%)

IQ: interquartile range. NI: non-infected individuals (n = 13). ASS: HTLV-1 asymptomatic carriers and without CCS (n = 10). KCS: HTLV-1 asymptomatic carriers diagnosed with KCS (n = 27).

FIGURES

FIGURE 1

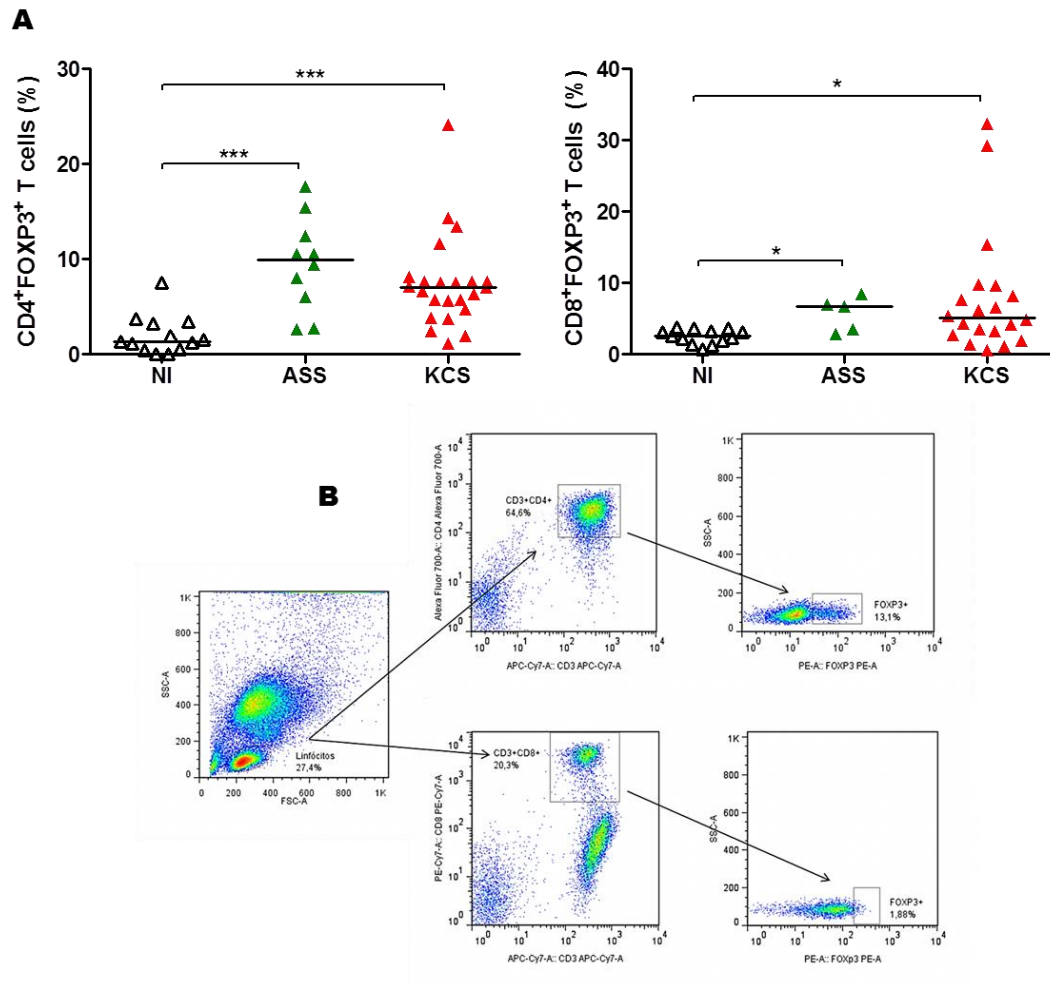


FIGURE 2

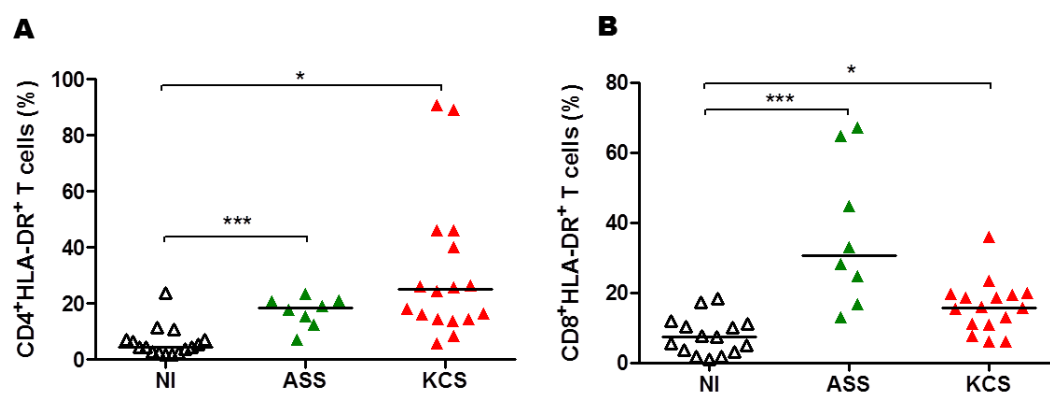


FIGURE 3

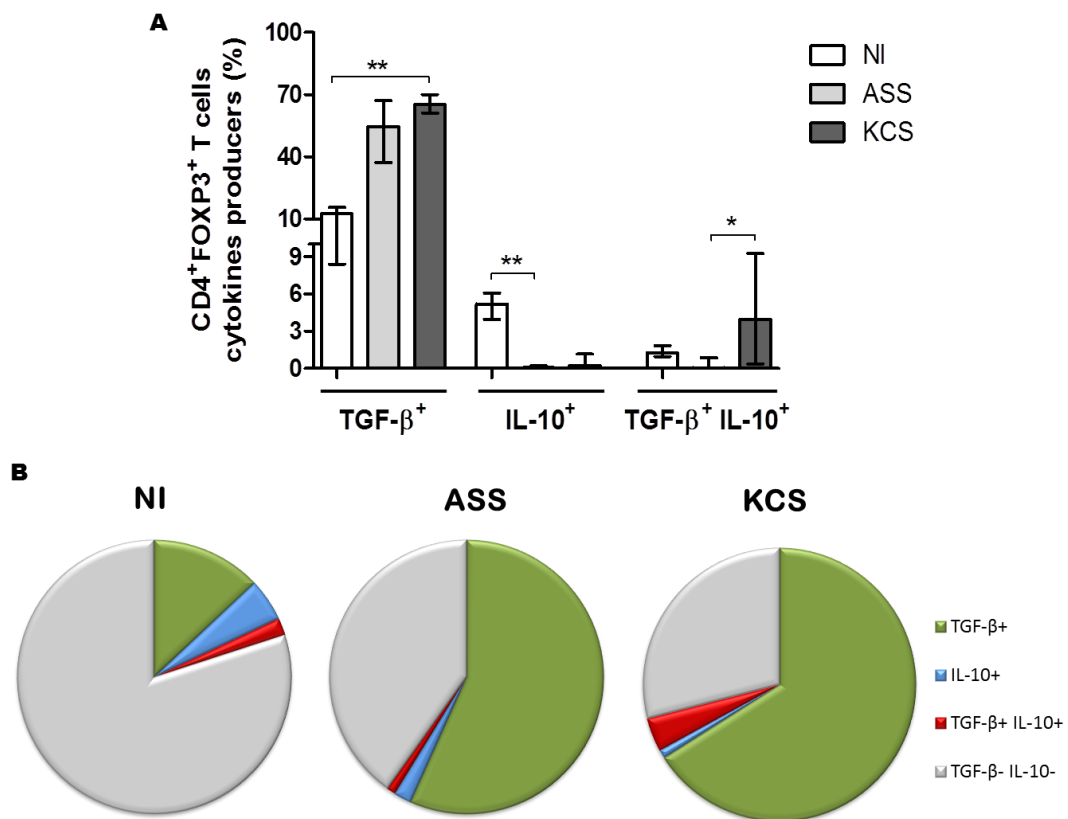
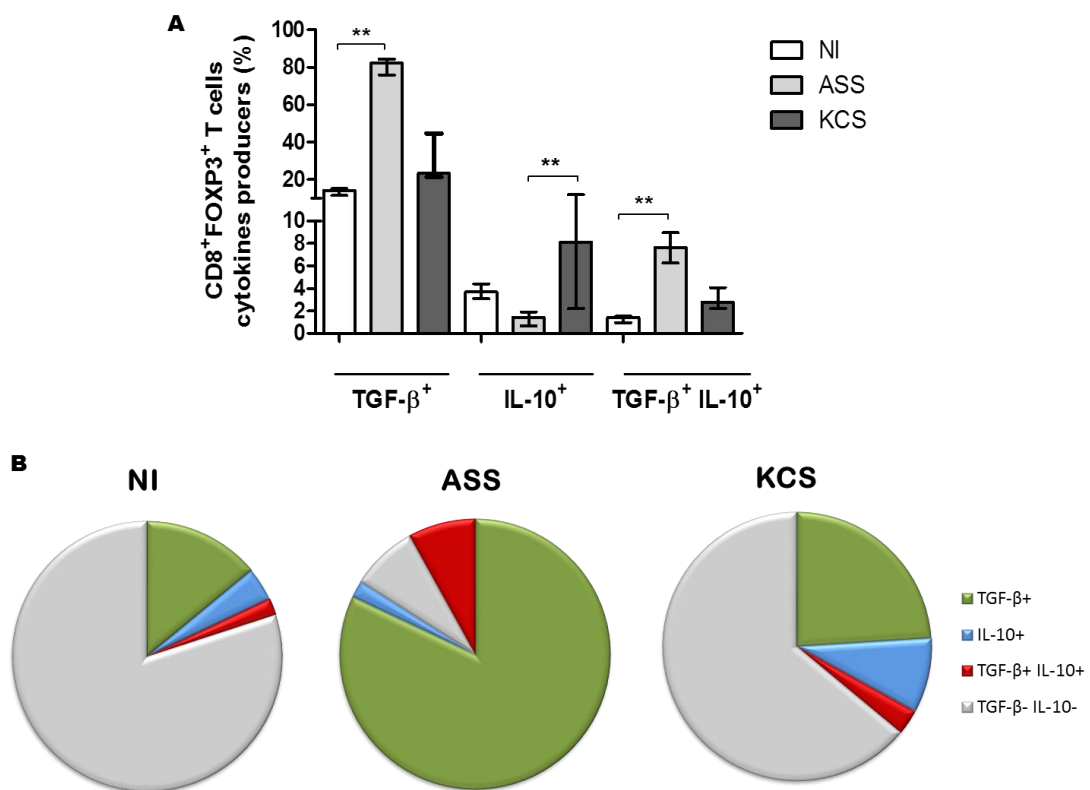


FIGURE 4



LEGENDS

Figure 1. Frequency of FOXP3 expression in CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes. (A) Comparative analysis of the frequency of lymphocytes CD4⁺ and CD8⁺ expressing FOXP3 between NI, ASS and KCS groups. The horizontal lines correspond to the median of frequencies. Statistical analysis performed using the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-test. *** $p < 0.0005$. (B) Flow diagram of the strategy used for frequency analysis of CD4⁺ and CD8⁺ T cells express FOXP3, based on using isotype controls for each fluorochrome used.

Figure 2 HLA-DR activation phenotype frequency in CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes. Comparative analysis of the frequency of CD4⁺ (A) and CD8⁺ (B) expressing HLA-DR among NI, ASS and KCS groups. The horizontal lines correspond to the median of frequencies. Statistical analysis performed using the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-test. * $p < 0.05$. *** $p < 0.0005$.

Figure 3. Production of TGF- β and IL-10 in CD4⁺ T cells with regulatory status. Representation of frequency (A) and distribution (B) of FOXP3⁺CD4⁺ producers TGF- β and IL-10 in NI groups (n = 4), ASS (n = 5) and SCC (n = 7). FOXP3⁺CD4⁺ populations were analyzed within the population of T lymphocytes (CD3⁺). The bars indicate the median and interquartile range for each group. The sectors of pie charts indicate the approximate median. Statistical analysis using the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-test. * $p < 0.05$. ** $p < 0.005$.

Figure 4. Production of TGF- β and IL-10 in CD8⁺ T cells with regulatory status. Representation of frequency (A) and distribution (B) of FOXP3⁺CD8⁺ producers TGF- β and IL-10 in NI groups (n = 4), ASS (n = 5) and SCC (n = 7). FOXP3⁺CD8⁺ populations were analyzed within the population of T lymphocytes (CD3⁺). The bars indicate the median and interquartile range for each group. The sectors of pie charts indicate the approximate median. Statistical analysis using the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-test. * $p < 0.05$. ** $p < 0.005$.