

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

*LUCIANA RODRIGUES CARVALHO BARROS*

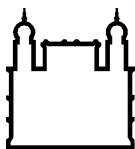
Células epiteliais do timo são possível reservatório viral e transmitem o HTLV-1 para  
linfócitos T CD4

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte  
dos requisitos para obtenção do título de Doutor em  
Ciências

**Orientador:** Wilson Savino

**RIO DE JANEIRO**

2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

***LUCIANA RODRIGUES CARVALHO BARROS***

**CÉLULAS EPITELIAIS DO TIMO SÃO POSSÍVEL RESERVATÓRIO VIRAL E  
TRANSMITEM O HTLV-1 PARA LINFÓCITOS T CD4**

**ORIENTADOR: Wilson Savino**

**Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_**

### **EXAMINADORES:**

<b>Prof. Dr.</b>	Alda Maria Cruz	<b>Presidente</b>
<b>Prof. Dr.</b>	Amilcar Tanure	
<b>Prof. Dr.</b>	Thiago Moreno Lopes de Souza	
<b>Prof. Dr.</b>	Edgar Marcelino de Carvalho Filho	<b>Suplente</b>
<b>Prof. Dr.</b>	Adriana Cesar Bonomo	<b>Suplente</b>

Rio de Janeiro, 27 de março de 2014



## AGRACEDIMENTOS

Acho esse o pior e melhor momento para escrever os agradecimentos. Depois de um caminho longo estamos cansados, mas esse momento nos dá a oportunidade de olharmos para trás e refletirmos. Eu olhei para trás e vi que nunca caminhei sozinha, por isso agradeço...

Agradeço aos meus pais, que são pessoas maravilhosas, íntegras, cheios de valores e que acreditaram em mim, que me deram suporte nos momentos bons e nos difíceis também. Mesmo sem saberem o que um doutorado significa, ou o que eu realmente faço, eles são especiais...

Agradeço ao meu marido Heitor. Tudo ficou mais fácil, mais bonito, mais emocionante porque você estava comigo. Sem palavras para expressar minha gratidão.

À minha irmã Patricia, que sempre foi mais que uma irmã, sempre com um conselho, uma chamada, mas que acreditou e investiu em mim.

Ao meu irmão André e minha cunhada Patricia. Além da alegria de duas lindas sobrinhas, vocês estiveram sempre lá e agora me acolheram, apostam em mim.

À minha sogra, Luiza e Vó Dulce, que abriram as portas da sua casa. Sei que não foi fácil, mas vocês são minha família também.

Às minhas duas novas irmãs, Adriana e Denise e porque não Alexandre. Meus sobrinhos Lucas e o pequeno Daniel. Toda a família Barros, minha família.

Ao meu sogro, Claudio e a Beth. À todos os nossos encontros semanais que renderam muita conversa e a ajuda que vocês nos deram. Ao otimismo, inestimável, sempre viram o que havia de bom mim.

Aos meus amigos, nem são tantos. Eu fui deixando-os pelo caminho. Me desculpem. Mas eu queria agradecer àquela que nunca me deixou, Isabel. Desde a escola, quando éramos inimigas declaradas, agora quase nunca nos encontramos, mas sabemos que a outra está lá.

Aos meus grandes amigos Leandra e Marcelo. Nossa, sem vocês isso não teria chegado ao fim. Obrigada por todo o incentivo, por me ouvirem, por tentarem de tudo para fazer dar certo.

Aos meus amigos do Laboratório de Pesquisas sobre o Timo, em especial ao Pedro pela ajuda nos protocolos, principalmente pelas conversas. Ao Jairo, meu consultor de plantão. À eles e ao Cister, pelas gargalhadas durante o expediente. Ao Luiz, Aryane, Danielma, Daniele Ingrid, Tiago, Triciana, Marina, Leilane e todos os outros pelas conversas e por tornar o trabalho menos difícil.

Aos meus amigos que já deixaram o laboratório, mas que foram imprescindíveis durante essa jornada. Agradeço especialmente a Klayssa, a Fernanda, a Mariana, a Eugênia.

Aos meus amigos “franceses”, do Laboratoire des Maladies du Muscle Strié, que me acolheram durante essa jornada, longos meses em Paris. Especialmente a Debora, Erica, Alhondra, Arnon, Victorine e Max.

Agradeço a Gillian e ao Vincent por me aceitarem em seu laboratório para um estágio de doutorado-sanduiche.

Agradeço a pós-graduação do IOC, Biologia Celular e Molecular pela oportunidade e pelo investimento que faz em seus alunos. Agradeço a Daniele, por toda a tolerância, compreensão, atenção que dá aos estudantes e por reconhecer minha voz ao telefone e me responder antes que eu perguntasse.

Aos pesquisadores do laboratório, que sempre tiveram um olhar crítico e contribuíram para o meu crescimento profissional.

Ao Dumith, que foi fundamental no desenvolvimento dessa tese. Pelas inúmeras e intermináveis conversas que tiveram e que terão bons frutos. Pelos projetos que fizemos e para os que virão.

Aos membros da banca que avaliarão esse trabalho e com certeza darão importantíssimas contribuições.

Ao revisor da tese, Thiago. Obrigada não só pela revisão em cima da hora. Sei que ajudei na lista de traumas para ser revisor das próximas teses. Mas obrigada pelo seu tempo e paciência. Que o trauma não tenha sido tão grande e que possamos colaborar nos próximos projetos.

Ao Cnpq que financiou minha formação desde a graduação, mestrado e doutorado, além dos projetos de pesquisa. À FAPERJ que financiou minha ida a França, durante o doutorado-sanduiche e especialmente, aos seus funcionários, que sempre me atenderam bem e resolveram a burocracia.

Ao Savino, eu nem sei o que agradecer. Depois de uns e-mails e uma reunião num bar, me aceitou como estudante e parecia que sempre tivera grandes planos para mim. Depois de 6 meses no laboratório, me fez uma proposta irrecusável. Terminar a faculdade um ano antes e entrar direto no mestrado, no próximo concurso. Eu aceitei. E assim foi. O mestrado foi ótimo, tivemos ótimos resultados, mas também foi bastante conturbado e quando ele me fez a proposta irrecusável novamente: terminar o mestrado com um ano e entrar no doutorado; confesso que fiquei em dúvida. Depois de refletir um pouquinho, lá fomos nós de novo. Mal entrei no doutorado e fiz as malas para ir à Paris. Problemas sempre acontecem em teses, e conosco não foi diferente. O projeto original não poderia ser mais executado. Então entrei nesse projeto, sem grandes expectativas, mas deu resultados. Então pedi para que esse, fosse minha tese. O resultado está aqui, atrás dessas páginas. Mas o que não está escrito vale muito mais. Obrigada, Savino por acreditar sempre em mim, por aceitar desde aquela época. Por aceitar que eu defendesse antes, agora que fui eu quem fiz a proposta irrecusável. Obrigada por tudo o que já fez e por mais alguns anos juntos.

**“No fim, tudo dá certo, e se não deu certo é porque ainda não chegou ao fim.”**

*Fernando Sabino*

## SUMÁRIO

<b>Resumo.....</b>	<b>xv</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>xvi</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1. Timo.....	1
1.1.1. Os processos de seleção e a migração de timócitos.....	4
1.1.2. As células epiteliais corticais e medulares definem microambientes funcionais distintos.....	6
1.2. HTLV-1.....	8
1.2.1. Descoberta do HTLV-1.....	8
1.2.2. Epidemiologia do HTLV-1.....	8
1.2.3. Biologia do HTLV-1.....	9
1.2.4. Doenças associadas ao HTLV-1.....	13
1.2.5. Receptores de entrada do vírus e infecção.....	17
1.2.6. Transformação de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> pelo HTLV-1.....	22
1.2.7. Supressão viral mediada pela célula e evasão do sistema imune.....	22
1.3. O HTLV-1 no timo.....	13
<b>2. OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>26</b>
2.1. Objetivos específicos.....	26
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
3.1. Linhagens Celulares.....	27
3.2. Obtenção de células mononucleares de sangue periférico.....	27
3.3. Cultivo celular.....	27
3.4. Produção do sobrenadante de cultura contendo HTLV-1.....	28
3.5. Infecção de células epiteliais tímicas por contato com linhagens celulares infectadas por HTLV-1.....	28
3.6. Infecção de células epiteliais tímicas por sobrenadantes de linfócitos T HTLV- 1 <sup>+</sup> .....	28
3.7. Separação de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> por sorting em citômetro de fluxo.....	29
3.8. Cultura de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> de sangue periférico.....	29
3.9. Infecção de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> por contato com células epiteliais tímicas HTLV-1 <sup>+</sup> .....	29

3.10. Análise fenotípica por citometria de fluxo.....	29
3.11. Avaliação da infecção por Imunofluorescência.....	30
3.12. Quantificação de células epiteliais tímicas Gag <sup>+</sup> por imunofluorescência..	31
3.13. Análise da proliferação celular por incorporação de CFSE.....	31
3.14. Análise da morte celular por incorporação de iodeto de propídeo (PI).....	31
3.15. Visualização de partículas virais por microscopia eletrônica.....	31
3.16. Ensaio de migração <i>in vitro</i> .....	32
3.17. Anticorpos.....	33
3.18. Extração de RNA.....	34
3.19. PCR quantitativa em Tempo Real.....	35
3.20. Análise de PCR quantitativa em Tempo Real.....	36
3.21. Análise Estatística.....	37
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>38</b>
4.1. Células epiteliais tímicas expressam os receptores de entrada do HTLV-1.	38
4.2. Células epiteliais tímicas são infectadas pelo HTLV-1 através do contato com linfócitos T cronicamente infectados.....	39
4.3. Vírus livres são capazes de infectar células epiteliais do timo.....	40
4.4. Formação de filopódios nas TECs infectadas.....	48
4.5. Expressão gênica de citocinas e quimiocinas aumenta em TEC após contato com sobrenadante infectado por HTLV-1 proveniente de paciente com ATL, mas não com HAM/TSP.....	49
4.6. Expressão gênica de Interferon alfa diminui, mas não de Interferon beta..	51
4.7. Expressão de Neuropilina-1 e GLUT-1 não são modulados após infecção na TEC, mas expressão de CCR4 diminui.....	52
4.8. Linfócitos T CD4 <sup>+</sup> de cultura primária são atraídos por células epiteliais tímicas <i>in vitro</i> .....	55
4.9. Células epiteliais tímicas HTLV-1 <sup>+</sup> são capazes de infectar linfócitos T.....	62
4.10. Não há modulação de receptores de entrada do vírus e quimiocinas em linhagens de linfócitos T após infecção por HTLV-1.....	65
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>68</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>77</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>78</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

1.1. Organização celular do timo.....	2
1.2. Micrografias mostrando uma linhagem de linfócito T cronicamente infectada pelo HTLV-1.....	9
1.3. Representação esquemática da estrutura da partícula viral do HTLV-110	
1.4. Ciclo replicativo do HTLV-1.....	11
1.5. O genoma proviral do HTLV-1.....	13
1.6. Modelo de persistência e patogênese.....	16
1.7. Receptores de entrada do HTLV-1.....	19
1.8. Modelos de transmissão do HTLV-1 via contato célula-célula.....	16
4.1. Células epiteliais tímicas expressam os receptores para a entrada do HTLV-1.....	39
4.2. Células do epitélio tímico são infectadas pelo HTLV-1 in vitro.....	40
4.3. Infecção de células epiteliais tímicas por vírus livre.....	42
4.4. Percentual de células epiteliais tímicas infectadas aumenta com o tempo.....	43
4.5. Infecção pelo HTLV-1 não alterou a proliferação, mas aumentou morte nas TECs infectadas.....	44
4.6. Células epiteliais tímicas apresentam partículas virais características de HTLV-1.....	46
4.7. Formação de filopódios e localização do HTLV-1 na extremidade das células.....	48
4.8. TEC tratadas com sobrenadante de C91/PL, mas não CIB, tem expressão gênica para quimiocinas e ICAM-1 aumentada.....	50
4.9. Diminuição da expressão gênica de fatores antirretrovirais em TEC após 10 dias de infecção.....	52
4.10. Percentual de células epiteliais do timo CCR4 <sup>+</sup> diminui após infecção pelo HTLV-1.....	54
4.11. Expressão de moléculas de superfície analisadas não foi modificada após infecção pelo HTLV-1.....	55
4.12. Migração de linhagem de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> , CEM, frente à diferente estímulos de TEC.....	57

4.13. Migração de células mononucleares de doadores saudáveis frente à diferente estímulos de TEC.....	58
4.14. Maior migração de linfócitos T CD4+ de doadores saudáveis frente à TEC HTLV-1+ sem a presença do sobrenadante.....	60
4.15. Expressão concomitante de NRP-1 e GLUT-1 em linfócitos T CD4+ antes e após a migração se mantém.....	61
4.16. Formação de sincício entre as células epiteliais tímicas tratadas com os sobrenadantes de CIB e C91/PL após co-cultivo com CEM.....	62
4.17. Células epiteliais tímicas transmitem HTLV-1 para linfócitos T CD4+ <i>in vitro</i> .....	63
4.18. Células epiteliais do timo infectadas pelo HTLV-1 são capazes de transmitir a infecção para linfócitos T CD4+ de sangue periférico.....	64
4.19. Mais de 70% das TEC apresentaram mais de três linfócitos aderidos a sua membrana.....	64
4.20. Fenótipo das linhagens infectadas provenientes de pacientes HTLV-1, CIB e C91/PL, de linfócitos T CD4+ de sangue periférico e de CEM antes e após a infecção pelo HTLV-1.....	67

**LISTA DE TABELAS**

**Tabela 3.1: Anticorpos.....34**  
**Tabela 3.2: Primers e Sequências.....36**

## **LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

**ATL – Leucemia ou linfoma da célula T do adulto**

**BSA – albumina sérica bovina**

**CCL2 – MCP-1, proteína quimioatraente de monócitos**

**CCR4 – receptor de CCL3, CCL5, CCL17 e CCL22**

**CCR5 – receptor de CCL3, CCL4, CCL8, CCL11, CCL13, CCL16**

**CCR6 – receptor de CCL20 (MIP-3 alfa)**

**CCR7 – receptor de CCL19 (MIP-3 beta) e CCL21**

**CD – “cluster of differentiation”**

**CD11a – cadeia alfa da integrina LFA1**

**CD49a – cadeia alfa da integrina VLA-1**

**CD49b – cadeia alfa da integrina VLA-2**

**CD49c – cadeia alfa da integrina VLA-3**

**CD49d – cadeia alfa da integrina VLA-4**

**CD49e – cadeia alfa da integrina VLA-5**

**CD49f – cadeia alfa da integrina VLA-6**

**CD62L – L-selectina**

**CFSE - diacetato carbo-fluoresceína succinimidil ester**

**CTL – linfócitos T citolíticos**

**CXCL1 – GRO-alfa, oncogene relacionado a tumor-alfa**

**CXCL3 – GRO-gama, oncogene relacionado a tumor-gama**

**CXCR4 – receptor da quimiocina CXCL12 ou SDF-1**

**DC – célula dendrítica**

**DLL – ligante de “delta like”**

**DN – timócito duplo-negativo**

**DP – timócito duplo-positivo**

**EDTA – ácido ácido etilenodiamino tetra-acético**

**EPCAM-1 – molécula de adesão da célula epitelial-1**

**Foxn1 – mutação do fundador ancentral do nude**

**GLUT-1 – receptor ubíquo de glicose tipo 1**

**GPI – glicosil-fosfatidil-inositol**

**HAM/TSP – Miopatia Associada ao HTLV-1/ Paraparesia Espastica Tropical**

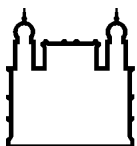
**HIV – vírus da imunodeficiência humana**  
**HLA – antígeno leucocitário humano**  
**HTLV – Vírus Linfotrópico T Humano**  
**HSPG – proteoglicano de heparan sulfato**  
**ICAM-1 – molécula de adesão intercelular**  
**IFN – interferon**  
**IgG – imunoglobulina classe G**  
**IL – interleucina**  
**IL8 – CXCL8**  
**ISG – genes induzidos por Interferon tipo 1**  
**LFA-1 – antígeno associado a função de linfócitos**  
**LT $\alpha$  – linfotoxina alfa**  
**LT $\beta$ R – receptor de linfotoxina beta**  
**LTR – longa repetição terminal**  
**MTOC – centro organizador de microtúbulos**  
**MHC – complexo de histocompatibilidade principal**  
**NF- $\kappa$ B – fator nuclear kappa b**  
**NRP-1 – neuropilina 1**  
**PBMC – células mononucleares de sangue periférico**  
**PBS – solução de salina tamponada fosfatada**  
**PCR – reação em cadeia da polimerase**  
**PHA – fitohemaglutinina**  
**PI – iodeto de propideo**  
**PKR – proteína quinase R**  
**TCR – receptor da célula T**  
**TEC – célula epitelial do timo**  
**cTEC – célula cortical do epitélio tímico**  
**mTEC – célula medular do epitélio tímico**  
**TNF – fator de necrose tumoral**  
**Rag – Gene ativador de recombinase**  
**RANK – receptor ativador de NF- $\kappa$ B**  
**RANKL – ligante de RANK**  
**RANTES - CCL5**  
**RPMI – Roswell Park Memorial Institute medium**

**mRNA – RNA mensageiro**

**SBF – soro bovino fetal**

**VGEF – fator de crescimento vascular endotelial**

**VLA – antígeno de aparecimento tardio**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

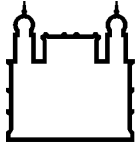
### CÉLULAS EPITELIAIS DO TIMO SÃO INFECTADAS E TRANSMITEM O HTLV-1 PARA LINFÓCITOS T CD4

#### RESUMO

#### TESE DE DOUTORADO

**Luciana Rodrigues Carvalho Barros**

O timo é um órgão linfóide primário, sítio do desenvolvimento de células T, provendo fatores críticos e coordenados que induzem e suportam o comprometimento de linhagem, diferenciação e sobrevivência dessas células. A presença das células não-linfóides, principalmente as células epiteliais do timo (TEC) no parênquima tímico promove a migração e diferenciação coordenada dos linfócitos T. Os linfócitos T são o principal alvo do Virus linfotrópico T humano (HTLV-1), agente etiológico da leucemia/linfoma associado ao HTLV-1 (ATL) e de doença que compromete o sistema nervoso/muscular (HAM/TSP). É desconhecida a causa que leva a uma ou outra doença. A resposta imune antiviral mediada por células T é ineficiente nessas patologias. Mesmo que o vírus tenha tropismo pelos linfócitos T, ele é capaz de infectar outros tipos celulares por contato direto entre células ou por partículas virais livres. Linfócitos ativados recirculam pelos órgãos linfóides, incluindo o timo, onde as células epiteliais tímicas (TEC) interagem intimamente com as células recirculantes, promovendo uma possível via de transmissão do HTLV-1. No nosso trabalho, observamos que as TECs possuem os receptores para a entrada do vírus (GLUT-1 e Neuropilina-1). Experimentos *in vitro* mostraram que as TECs podem ser infectadas pelo HTLV-1 por linhagens de linfócitos derivados de pacientes portadores de ATL e de HAM/TSP. Essas infecções ocorreram tanto por contato direto entre as células, quanto por sobrenadante contendo partículas virais livres derivadas do sobrenadante dos linfócitos. O vírus pode ser observado após 24 horas e 10 dias de cultivo, quando a maioria das células estava infectada. Através de microscopia eletrônica de transmissão, foram observadas partículas virais brotando de estruturas semelhantes a corpos multivesculares nas TECs. A expressão gênica de citocinas e quimiocinas foram encontradas aumentadas nas TECs logo após contato com o sobrenadante contendo HTLV-1 derivado dos linfócitos. Somado a isso, a expressão gênica de interferon tipo 1 e genes induzidos por interferon estavam diminuídos. A resposta migratória de linfócitos T CD4<sup>+</sup> induzida por TEC HTLV-1<sup>+</sup> estava aumentada em relação as TEC não-infectadas. As TEC infectadas são capazes de transmitir a infecção para linfócitos T por contato, alterando a expressão de receptores de quimiocinas e de adesão nos linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Juntos, esses resultados sugerem que as TEC HTLV-1<sup>+</sup> infectadas por linfócitos infectados ou por vírus livres, transmitem a infecção para outras TECs e para linfócitos T CD4<sup>+</sup>, disseminando a infecção.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### THYMIC EPITHELIAL CELLS ARE INFECTED BY HTLV-1 AND TRANSMIT THE VIRUS TO CD4 T LYMPHOCYTES

#### ABSTRACT

#### TESE DE DOUTORADO

Luciana Rodrigues Carvalho Barros

The thymus is a primary lymphoid organ, site of developing T cells, providing a coordinated set of critical factors to induce and support lineage commitment, differentiation and survival of these cells. The presence of non-lymphoid cells through the thymic parenchyma serves to provide coordinated migration and differentiation of T lymphocytes. T lymphocytes are the main target of Human T Lymphotropic Virus type 1 (HTLV-1). This virus is the etiologic agent of HTLV-1 associated lymphoma and leukemia (ATL) or a disease of muscular/nervous systems (HAM/TSP), but it is unknown what triggers to one or other disease. T-cell mediated immune response against viral proteins is not effective in both diseases. Although the virus has T lymphocyte tropism, it can infect other cells by cell contact and cell-free virus. Activated T lymphocytes circulates around lymphoid organs, including the thymus, where the thymic epithelial cells (TEC) strongly interact with recirculating cells, so infected lymphocytes could transmit the virus to TEC. Interestingly, in our work we observed that TEC expresses molecules related to the HTLV-1 transmission (GLUT-1, Neuropilin 1). *In vitro* experiments showed that TEC could be infected by cell lineages derived from ATL and HAM/TSP patients. These infections happened from cell contact and by cell-free virus derived from cell supernatants. The virus can be seen after 24h and after 10 days, when most cells in the culture were infected. By transmission electron microscopy, virus particles were observed budding from multivesicular bodies like structures in TEC. Cytokines and chemokines were increased at mRNA level soon after contact with HTLV-1 containing supernatant derived from lymphocytes. In addition, type 1 interferon and interferon stimulated genes were decreased in HTLV-1 infected TEC. Migration response from T CD4<sup>+</sup> lymphocytes driven by HTLV-1<sup>+</sup> TEC were increased in relation to non-infected TEC. HTLV-1<sup>+</sup> TEC could transmit the infection to T CD4<sup>+</sup> lymphocytes by cell contact, altering some chemokines and adhesion receptors in T CD4<sup>+</sup> cells. Altogether, these results suggest that after TEC infection by HTLV-1 via infected lymphocytes and cell-free virus, it is able to contaminate another TEC and transmit the virus to non-infected T lymphocytes, disseminating the infection.



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Timo

O timo foi descrito pela primeira vez há mais de 2 mil anos pelos gregos, que achavam que àquela grande massa no tórax, em frente ao coração seria o lugar onde a alma era guardada. Nessa época, já foi observado que o timo de crianças era maior do que de adultos, mas foram 2 mil anos até que o mistério da sua função fosse esclarecida. Apenas em 1961, Miller publicou a descoberta da crucial função imunológica do timo. Ele escreveu “o timo fornece um ambiente no qual linfócitos (produzidos pelo próprio timo ou por outros órgãos linfoides) podem proliferar mais ativamente do que em outros órgãos linfoides” [1].

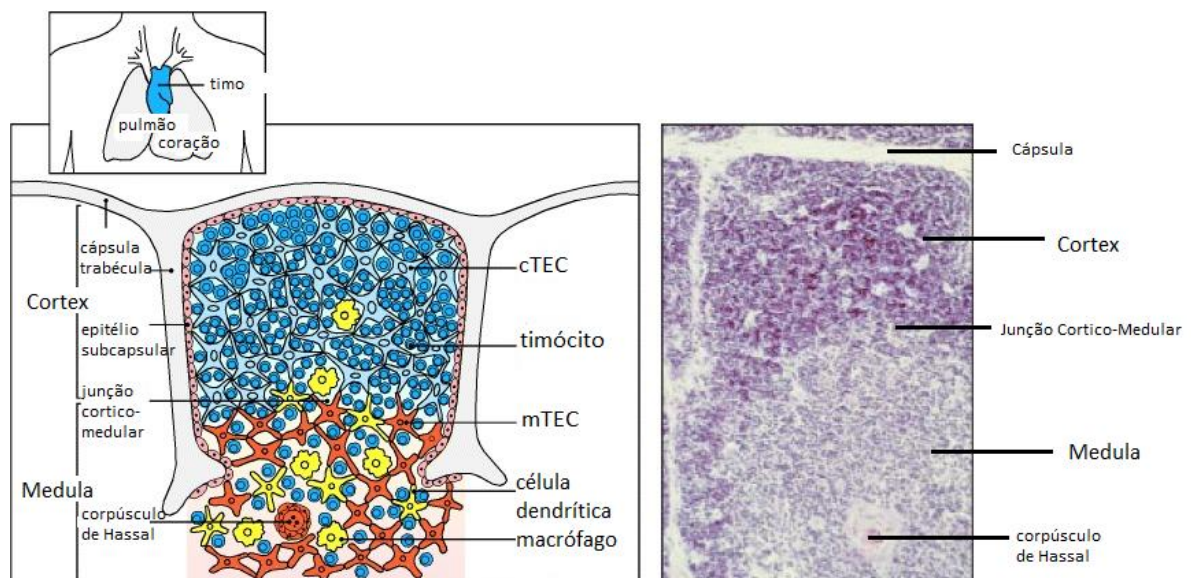
O timo é um órgão linfoide primário, sítio de desenvolvimento dos linfócitos T. É localizado no tórax, na região do mediastino superior em frente à traquéia, anterior aos grandes vasos que emergem do coração. Consiste em dois lobos que surgem no embrião como primórdios separados de cada lado da linha média e mais tarde se tornam intimamente ligados por tecido conjuntivo [2]. Esse órgão atinge seu maior peso relativo no final do desenvolvimento fetal, porém seu peso absoluto continua aumentando até a puberdade. Durante essa época, o timo inicia um processo de involução progressiva e no adulto, seu tecido é substituído por células adiposas em grande parte [2].

O desenvolvimento do timo tem início na 5ª semana de vida do período embrionário. Se desenvolve de células epiteliais derivadas do endoderma do terceiro par de bolsas faríngeas e do mesênquima, dentro dos quais tubos de células epiteliais crescem. Cada tubo se torna um cordão sólido que prolifera, e forma os ramos que originarão o centro do lóbulo tímico. Algumas células do cordão epitelial se organizam num ponto central e formam os Corpúsculos de Hassal. Outras células epiteliais espalham-se e formam o epitélio tímico. O mesênquima entre os cordões epiteliais forma septos finos incompletos entre os lóbulos. Os precursores linfoides preenchem o interstício entre as células epiteliais [2].

Os precursores dos linfócitos T, provenientes da medula óssea, diferenciam, proliferam e amadurecem. O desenvolvimento das células T no timo consiste em vários processos que requerem a migração dos linfócitos T em diferenciação, chamados timócitos, entre os múltiplos microambientes do órgão. Os microambientes são formados em parte pela anatomia do timo, envolvido por uma cápsula de tecido conjuntivo formando 2 lobos, sendo que cada lobo é dividido em lóbulos separados

por septos que saem da cápsula. Cada lóbulo tem duas regiões, o córtex, região mais externa e a medula, região mais interna (Figura 1.1). Outras partes importantes da formação de microambientes são a frequência e os tipos celulares presentes naquela região, além de componentes não-celulares como proteínas de matriz extracelular e fatores solúveis. Os tipos celulares presente no timo além dos timócitos são: as células epiteliais do timo (TEC), macrófagos, células dendríticas e fibroblastos [3].

Dos vários órgãos linfoides, o timo é histologicamente o mais consistente entre as diferentes espécies. Em ratos, os lobos tímicos aparecem após 21 dias do desenvolvimentos embrionário e está completamente organizados após 1 mês de nascimento, mas em humanos já está completamente desenvolvido no nascimento [1], [4] .



**Figura 1.1: Organização celular do timo.** O timo está localizado acima do coração, contém vários lóbulos, cada qual com uma região cortical e outra medular. Como mostrado no esquema à esquerda, o córtex consiste em linfócitos imaturas (azul escuro), células epiteliais corticais (cTEC, azul claro), com as quais cada timócito está intimamente associado e alguns macrófagos (amarelo), os quais estão envolvidos em fagocitar os corpos apoptóticos dos timócitos. A medula consiste em linfócitos maduros (azul escuro) e células epiteliais medulares (mTEC, laranja), juntamente com macrófagos e células dendríticas (amarelas estreladas). O corpúsculo de Hassal são provavelmente sítios de destruição celular. Os timócitos na camada cortical mais externa são células imatura que proliferam intensamente, enquanto os timócitos do córtex mais interno são principalmente timócitos imaturos passando pelos processos de seleção intratímicos. A fotografia a direita mostra uma seção equivalente do timo humano, marcado com hematoxilina e eosina. A cápsula que reveste o órgão é

seguida de uma região subcapsular. O córtex, área mais externa, tem coloração mais escura devido à grande concentração de timócitos, nos quais os núcleos são corados em roxo. A medula é mais clara que o córtex, contém um maior número de células epiteliais e menor número de timócitos. A junção córtico-medular separa esses dois compartimentos. O septo divide os lóbulos, segregando as regiões. Os corpúsculos de Hassal só estão presentes em timos humanos, sendo ausentes em timos de camundongos. Adaptado de Janeway 6th ed, 2005 [4].

As TEC são partes essenciais da estrutura, organização e função do timo. Apesar de sésseis, elas formam os diversos microambientes envolvidos na diferenciação dos linfócitos T [1]. Os timócitos em diferenciação migram mantêm contato com as TEC e trocam sinais de sobrevivência e diferenciação [5]. A entrada de progenitores linfoides no timo, a geração de células CD4/CD8 duplo-positivas (DP) no córtex e a interação dos timócitos com as células epiteliais medulares (mTEC) completam o desenvolvimento dos timócitos, asseguram a tolerância central e a saída das células T maduras do timo [3].

Os corpúsculos de Hassal são formados por mTEC com expressão de marcadores antigênicos similares aos queratinócitos. Foram primeiro descritas por Arthur Hill Hassal em 1846, quando receberam seu nome. São bem desenvolvidos no timo de preás e seres humanos, mas pouco desenvolvido em camundongos e ratos. O microambiente da medula tímica é composto por redes de tipos celulares, de diversas origens e todos eles participam da formação dos corpúsculos. São importantes componentes da rede do timo que fornece aos timócitos sinais parácrinos que garantem sua maturação funcional durante a linfopoiese intratímica [1]. Sua função ainda é um enigma, mas há estudos que evidenciam que eles são ativos na produção de citocinas, como IL-7, TGF- $\alpha$  e CXCL12. Os corpúsculos de Hassal são estruturas únicas, antigenicamente distintas, funcionalmente ativas, fruto de componentes celulares não-linfoides que formam o microambiente da medula e participam da fisiologia do timo [1].

### **1.1.1. Os processos de seleção e a migração de timócitos**

Os precursores hematopoiéticos que dão origem aos linfócitos T derivam do fígado fetal e da medula óssea. Eles entram no timo através de vasos sanguíneos localizados na junção cortico-medular e migram para a região subcapsular, penetrando no córtex. À medida que migram em direção à medula, interagem com os componentes do microambiente, passando pelos processos de proliferação e diferenciação [6]. Eles diferenciam em linfócitos T com expressão de TCR (do inglês, receptor da célula T) de diferentes especificidades que são restritos ao MHC (do inglês, complexo de histocompatibilidade principal) e tolerantes aos antígenos próprios (Takhama 2012). O desenvolvimento das células T é guiado pelas células do estroma, do qual as TEC são o componente mais abundante. As TEC contituem um componente estrutural e funcional especializado que suporta passos críticos para o desenvolvimento de linfócitos T, provendo citocinas, quimiocinas, ligantes indutores de linhagem e antígenos próprios que controlam o comprometimento, migração, sobrevivência, proliferação e seleção das células T [5], [7].

A diferenciação de timócitos compreende a formação do fenótipo dessas células através da expressão do TCR e dos co-receptores CD4 e CD8. No início do processo de diferenciação, os timócitos não apresentam nenhuma dessas moléculas, e são chamados de células duplo-negativas (DN ou CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>). O timócitos DN podem ser subdivididos em 4 estágios através da expressão de CD25 e CD44. As células DN1 são encontradas próximas a região córtico-medular, proliferam e interagem com ligante presentes no timo como Notch1 [8] e ligantes de Delta (DLL1-4) [9]. Após a sinalização via Notch1, os precursores são comprometidos com a linhagem de linfócitos T [10]. O rearranjo dos genes do TCR é iniciado nesse estágio enquanto os timócitos migram para o córtex e proliferam intensamente. Em seguida, passam a expressar ambos co-receptores CD4 e CD8 simultaneamente, chamados de timócitos duplo-positivos (DP). Gerados no córtex do timo, são selecionados através da especificidade de reconhecimento de seu TCR por meio da interação com o complexo peptídeo-MHC apresentados pelas TEC corticais (cTEC) e células dendríticas. Nesse processo, Notch1 regula a força do sinal do TCR em timócitos DP correspondem a 80% dos timócitos [10], [11]. Os timócitos DP com TCR capaz de reconhecer o MHC próprio são selecionados (seleção positiva), passam a expressar CCR7, assim como sofrem um processo de diferenciação até células simples positivas (SP), com expressão de CD4 ou de CD8. Então, os timócitos CD4<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup> são atraídos pelas quimiocinas CCL19 e CCL21, produzidas pelas mTEC, e migram para a região

medular do timo [3]. Na medula, os novos timócitos SP são selecionados pelas mTEC que expressam Aire (do inglês, regulador de autoimunidade). Aire controla a transcrição de diversos genes de antígenos próprios tecido-específicos ou expressão gênica promíscua nas mTEC. A deficiência de Aire leva a autoimunidade devido a falhas no processo de tolerância central. O MHC de classe I das mTEC apresenta peptídeos gerados através da degradação de proteínas citoplasmáticas pelo proteassoma e é reconhecido pelos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, enquanto o MHC de classe II apresenta antígenos extracelulares para linfócitos T CD4<sup>+</sup>, sendo estes derivados de proteínas endocitadas e degradadas pelo lisossomo. Através desse mecanismo clássico, os antígenos apresentados para os linfócitos T CD4<sup>+</sup>, via MHC de classe II, não seriam os antígenos tecido-específicos expressos pelas mTEC via Aire. Diferente dos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, os linfócitos T CD4<sup>+</sup> só seriam desafiados por antígenos extracelulares presente no timo e o mecanismo de tolerância a antígenos próprios ficaria comprometido. Os antígenos tecido-específicos são apresentados via MHC de classe II por outro mecanismo, a macroautofagia. Através desse processo, as mTEC formam autofagossomos que levam antígenos próprios citoplasmáticos para a degradação proteolítica. O mesmo pode ser aplicado para antígenos derivados da ingestão de material extracelular, cruzando as duas vias de processamento de antígenos para apresentação via MHC de classe I e II [12]–[14]. Dessa forma, a tolerância central é concebida com uma grande diversidade de antígenos apresentados para ambos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> através da deleção dos clones autorreativos a antígenos próprios pelo processo conhecido como seleção negativa. Essas células passam a expressar o receptor para esfingosina-1-fosfato (S1P<sub>1</sub>) e são atraídas para circulação, onde a concentração de seu ligante é maior, deixando o timo [3]. A maioria dos timócitos não é capaz de completar a diferenciação e somente entre 1 e 3% sairão maduros do timo [3].

A comunicação entre os timócitos e as TEC ocorre durante todo o processo de diferenciação dos timócitos. A produção de citocinas e sinalização das TEC para os timócitos são essenciais no seu processo de diferenciação, formação do repertório e na tolerância central. Não só a diferenciação dos timócitos é dependente do contato com as TEC, mas as TEC também se diferenciam após o contato com os timócitos, formando uma colaboração bilateral ou “crosstalk” [5], [7], [15]. Algumas interações moleculares são importantes nesses processos, como CD28-CD80/86 e CD40-CD40L. Essas são moléculas coestimulatórias medeiam a seleção negativa e a tolerância central, aumentam a expressão de LT $\alpha$  (linfotóxina) e LT $\beta$  e ativam NF- $\kappa$ B.

Essa sinalização é importante no desenvolvimento das mTEC e do microambiente da medula. A deficiência combinada de CD28 e CD40 ou seus ligantes resulta numa profunda deficiência em mTEC. Os linfócitos T CD4 desenvolvidos no timo CD40/CD80/86 deficiente são autorreativos *in vitro* e letais quando transferidos para outros animais [15].

### **1.1.2. As células epiteliais tímicas corticais e medulares definem microambientes funcionais distintos**

Os lóbulos do timo são organizados em duas áreas principais, a área central medular, na qual as mTEC residem, e o córtex na periferia, no qual estão localizadas as cTEC. As cTEC e mTEC formam microambientes funcionalmente distintos para o desenvolvimento do linfócito T [7]. Ainda há controvérsias se as cTEC e mTEC vêm de um ou mais progenitores. A partir de novas informações em estudos em camundongos, Alves e colaboradores sugerem que ambas vêm de um progenitor comum, sugerindo um modelo de progressão seriada. A partir desse modelo, os progenitores adquirem os marcadores típicos de cTEC e depois progridem para a diferenciação de mTEC [7]. Entretanto, as controvérsias existem porque ainda não há marcadores confiáveis o suficiente para separar as etapas do desenvolvimento das TEC [1].

Em camundongos, a migração dos precursores das TEC é iniciada a partir do dia 9 embrionário. A expressão de Foxn1 (*forkhead transcription factor*) representa um marco na diferenciação das TEC. Camundongos deficientes para esse fator apresentam a migração dos precursores de TEC, mas não a diferenciação para cTEC e mTEC [16]. A diferenciação entre cTEC e mTEC não é clara no timo antes do nascimento e pode ser resultado da ancestralidade comum dessas linhagens.

Ainda que a via de desenvolvimento precisa dessas linhagens não seja bem compreendida, diversos marcadores vem sendo utilizados para diferenciar cTEC e mTEC. Os marcadores utilizados hoje para definir mTEC imaturas são MHCII<sup>lo</sup>CD80<sup>lo</sup>Aire<sup>-</sup> e maduras são MHCII<sup>hi</sup>CD80<sup>hi</sup>Aire<sup>hi</sup>. Esses marcadores apontam para um desenvolvimento linear das mTEC cuja expressão de Aire, MHC de classe II e CD80 aumentam conforme a maturação [7]. Apenas 20% das mTEC apresentam o fenótipo maduro [17], [18]. Além disso, Aire é um importante fator no processo de diferenciação das mTEC e da formação e arquitetura da área da medula do timo [19].

Durante a diferenciação dos linfócitos T, as mTEC apresentam antígenos tecido-específicos aos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>. Caso o reconhecimento do complexo

MHC-peptídeo seja muito forte, a mTEC promove a deleção ou geração de células T reguladoras naturais. As células dendríticas do timo são capazes de capturar esses antígenos e apresentá-los ao linfócito T durante a diferenciação, contribuindo para a deleção de clones autoreativos no timo. A seleção negativa é reforçada pelas células dendríticas recirculantes que apresentam antígenos próprios provenientes da periferia. A medula tímica garante o estabelecimento da tolerância central da célula T através da colaboração entre mTEC e células dendríticas [18]. Três membros da família do fator de necrose tumoral (TNF) estão envolvidos no “crosstalk” entre timócitos e mTEC. RANK (receptor de NF- $\kappa$ B) e CD40, expresso pelas mTEC e CD40L e RANKL nos timócitos determinam o número de mTEC maduras e LT $\beta$ R (receptor de linfotóxina  $\beta$ ) e LT $\alpha$ 1 $\beta$ 2 influenciam a organização da medula [18].

As cTEC não expressam Aire, mas uma subunidade específica do proteassoma 20S, chamado beta5t ( $\beta$ 5t). Nas cTEC, a  $\beta$ 5t é incorporada ao proteassoma junto com outras subunidades e forma um proteassoma singular, chamado timoproteassoma. Há evidências de que o timoproteassoma apresenta um espectro diferenciado de peptídeos próprios associados ao MHC de classe I que são essenciais para o desenvolvimento do repertório de linfócitos T CD8<sup>+</sup> imunocompetentes. A expressão desse componente é vista no dia 12,5 embrionário (E12,5) em camundongos e é independente da formação da medula e dos timócitos no timo, pois está presente em camundongos Rag2<sup>-/-</sup>. Entretanto não foi observado em camundongos Foxn1<sup>-/-</sup>.

As cTEC expressam IL-7 e DDL4, ligante de Notch1. Esses fatores induzem o comprometimento dos progenitores hematopoiéticos com a linhagem T e sua proliferação. Subsequentemente, as cTEC medeiam a seleção dos timócitos CD4/CD8 duplo-positivos (DP), através da expressão de peptídeos próprios por MHC de classe I e II [7].

Apesar das diferenças, as TEC compartilham a expressão de diversas moléculas, como EPCAM-1 (do inglês, molécula de adesão da célula epitelial-1)/CD326 e MHC de classe II.

## **1.2 HTLV-1**

### **1.2.1 Descoberta do HTLV**

Durante os anos 1960 e 1970, foi descoberta a transcriptase reversa de diversos retrovírus causadores de doenças neoplásicas em animais. Impulsionados por essas descobertas, cientistas procuraram um retrovírus em humanos com características semelhantes, mas sem sucesso. Ainda assim, um grande número de artigos foram publicados, mas depois foi averiguado haver contaminação por retrovírus de animais nos laboratórios de pesquisa. Em 1972, Robert Gallo submeteu o primeiro artigo sobre HTLV-1, encontrado em células de linfoma, mas o manuscrito não foi aceito [20]. Em 1979, Robert Gallo demonstrou que o vírus poderia ser isolado de cultivo primário de tecido e também de linfócitos T do mesmo paciente, que o vírus não se assemelhava a nenhum retrovírus de animal, que poderia infectar linfócitos T *in vitro*, que havia anticorpos contra o vírus no soro do paciente, que o DNA do provirus estava presente no DNA das células onde o vírus foi isolado [20]–[22]. Alguns meses depois, Hinuma et al. (1980) também detectaram vírus nas células MT-1, o qual chamou de vírus da leucemia de células T do adulto (ATLV). No final de 1982, os grupos de Gallo e Hinuma reportaram que o vírus encontrado era o mesmo e decidiram chamá-lo de HTLV-1 [20], [23].

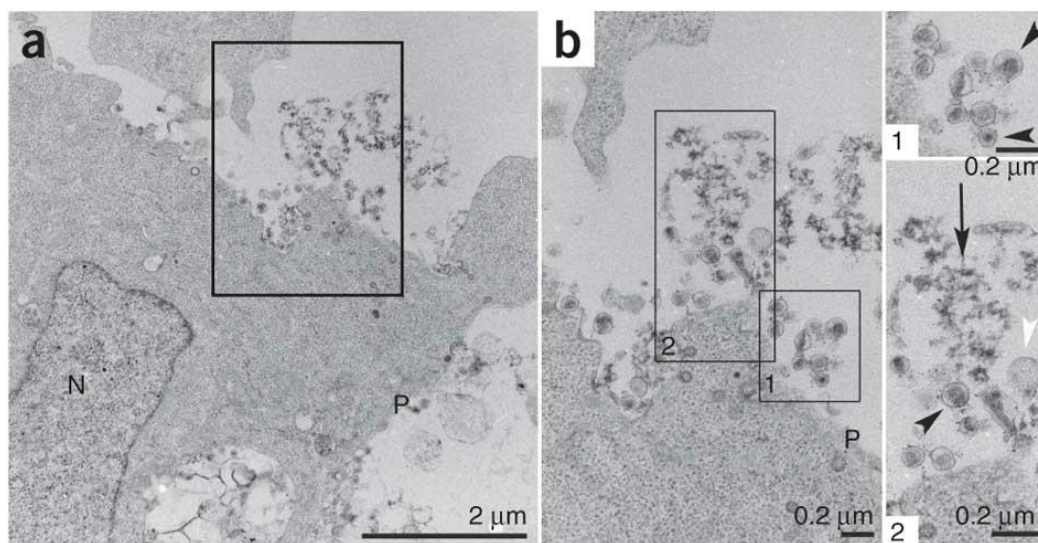
### **1.2.2 Epidemiologia do HTLV-1**

O número de pessoas infectadas pelo HTLV-1 é incerto. A última grande estimativa foi publicada há 25 anos, sendo entre 10 e 20 milhões de pessoas em todo o mundo. No Brasil, entre os doadores de sangue, a prevalência de HTLV-1 foi de 3,6 a cada 100.000 pessoas, com variação regional. Essa taxa leva ao risco de transmissão do HTLV-1 por transfusão de sangue infectado em 5 a cada 1 milhão de transfusões, sendo este número 10 vezes maior do que nos Estados Unidos [24], [25]. Estudos epidemiológicos sistemáticos estão ausentes em áreas onde o HTLV-1 não é endêmico. Todavia, os efeitos debilitantes da infecção pelo HTLV-1 vem se tornando notáveis, principalmente pelos altos custos de tratamento para os pacientes em países em desenvolvimento, onde focos endêmicos estão localizados em áreas de baixo padrão socioeconômico [26].



### 1.2.3 *Biologia do HTLV-1*

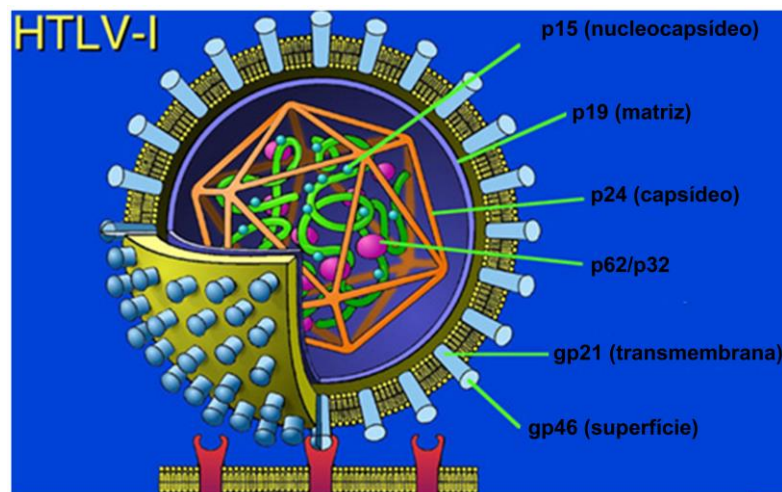
HTLV-1 é um retrovírus tipo C membro da família *Retroviridae*, subfamília *Oncovirinae*, gênero *Deltaretrovirus*. É um vírus envelopado, com diâmetro em torno de 100 nanômetros (nm) e morfologia esférica conforme apresentado na figura 1.2. Apresenta estrutura morfológica similar à de outros retrovírus diferindo morfológicamente do mais conhecido, o HIV, por apresentar nucleocapsídeo arredondado.



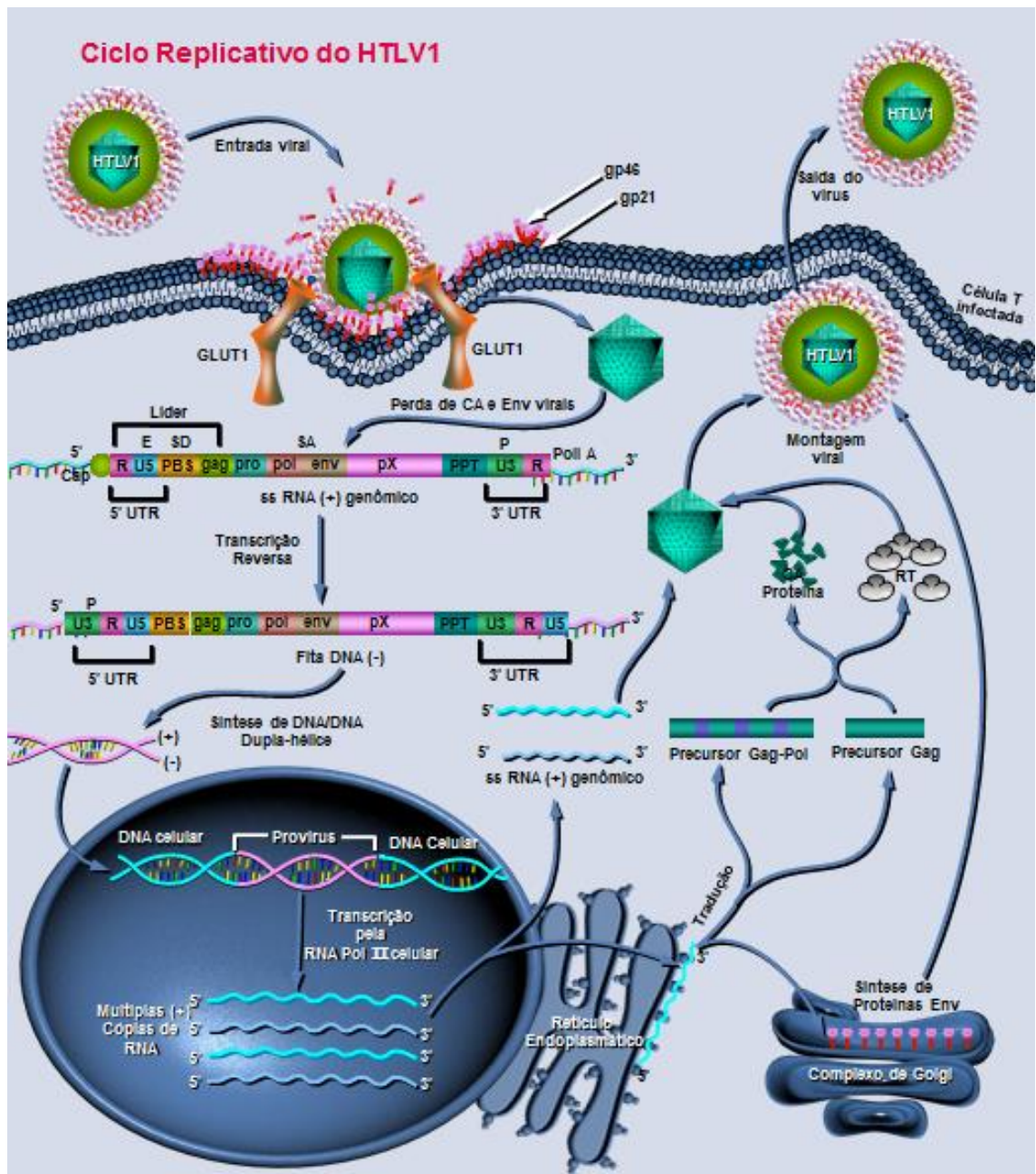
**Figura 1.2: Micrografias mostrando uma linhagem de linfócito T cronicamente infectada pelo HTLV-1. a)** células MT-2 foram fixadas e a área marcada em **a** representa o painel **b**. **b)** é possível observar as partículas virais do HTLV-1 na área externa do linfócito. As áreas 1 e 2 foram demarcadas e ampliadas evidenciando a morfologia das partículas virais. Retirado de Pais-Correa et al., 2010 [27].

O HTLV-1 é adsorvido na membrana da célula alvo através das glicoproteínas de superfície (SU). Os receptores virais são GLUT-1 e Neuropilina-1 que serão discutidos em seções posteriores. Os vírus penetram via fusão, perda do envelope viral e depois o provírus é produzido por integração aleatória no DNA [28]. A proteína de envelope retroviral (Env) media a adsorção e subsequente fusão a membrana celular. A proteína Env consiste de uma subunidade conhecida como gp46 (glicoproteína-46) ligada de forma não-covalente a gp21 (TM). A gp21 é formada a partir da clivagem proteolítica de gp62. A ligação do receptor ao complexo gp46/gp21 resulta na fusão mediada por gp21. No genoma do HTLV-1, as regiões codificantes são gag, pro, pol e env, que são expressas como poliproteínas. Comuns aos retrovírus, essas poliproteínas incluem Gag (antígeno de grupo), PR (protease), Pol

(polimerase) e Env. O precursor de Gag é clivado em três proteínas estruturais: p19 (Matriz - MA), p24 (capsídeo - CA) e p15 (nucleocapsídeo – NC) [29] (figura 1.3). Além dessas, o vírus possui as enzimas: PR, transcriptase reversa (RT) e integrase (IN). A RT tem estrutura conformacional similar a DNA polimerase I tem atividade RNaseH (Ribonuclease-H), mostrando atividade somente quando é hibridizada no DNA. O HTLV-1 não tem um sítio preferencial de inserção no DNA da célula alvo. Entretanto, muitos fatores, como a estrutura da cromatina, atividade transcripcional, interação entre DNA e proteínas, metilação e composição nucleotídica da sequência alvo influenciam o sítio de integração. O HTLV-1 comumente é inserido em regiões ricas em A/T, não sendo associado com integração em regiões transcripcionais ativas ou elementos de repetição do genoma hospedeiro [30].

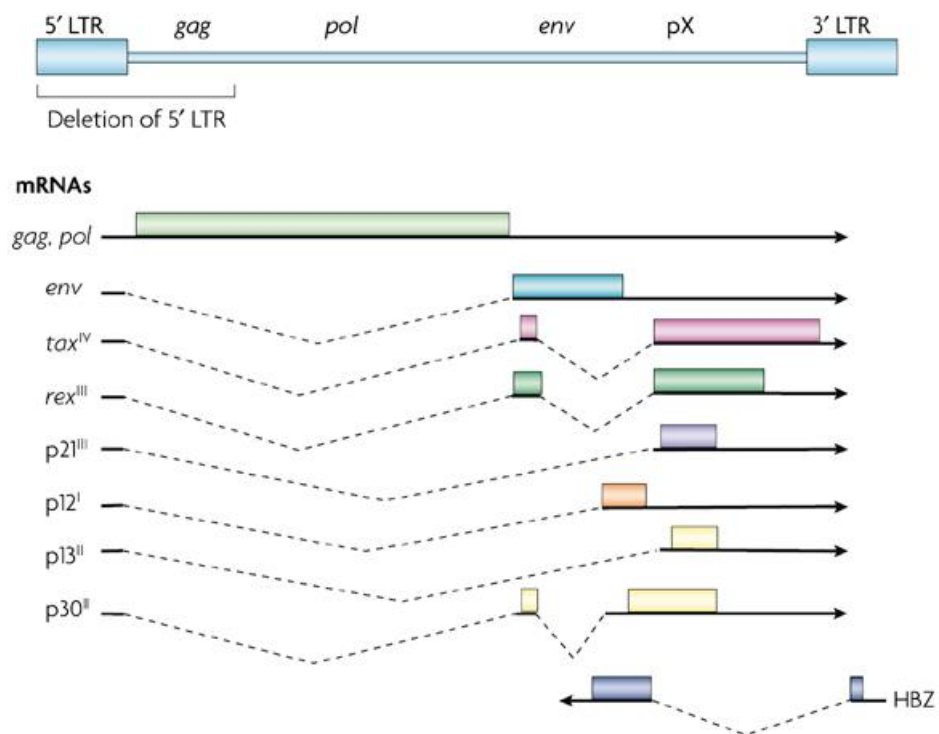


**Figura 1.3: Representação esquemática da estrutura da partícula viral do HTLV-1.** Neste esquema são apresentadas as principais proteínas do HTLV-1. As glicoproteínas que compõem o envelope viral são gp46, também conhecida como SU, e gp21. A proteína p19 forma a matriz e a p24 o capsídeo viral. O nucleocapsídeo é formado pela p15 e contém as fitas de RNA genômico além das proteínas p62/p32 que formam a transcriptase reversa. Retirado de [www.htlv.com.br/index.htm](http://www.htlv.com.br/index.htm).



**Figura 1.4: Ciclo replicativo do HTLV-1.** O HTLV-1 é adsorvido na membrana da célula alvo por GLUT-1, através de sua ligação com as proteínas gp46 e gp21. O envelope e o capsídeo virais são perdidos durante esse processo. A seguir o RNA dupla-fita (+) é transcrito numa fita de DNA (-) pela transcriptase reversa que. A fita de DNA complementar é sintetizada em seguida e logo segue para o núcleo da célula. O genoma viral é integrado ao DNA celular através do corte e inserção de nucleotédeos por uma atividade ribonuclease da transcriptase reversa. O HTLV-1 não possui sítio de ligação preferencial. Muitas cópias de RNA viral seguem para a montagem da partícula viral, enquanto outras seguem para se tornar o genoma viral. As proteínas virais são transcritas pela maquinaria celular e seguem para a montagem da partícula viral que brota da célula hospedeira infectada. Adaptado do site da Qiagen.

Os retrovírus, como o HTLV-1, apresentam genoma composto por 2 fitas simples de RNA de polaridade positiva. Seu genoma contém os genes GAG, POL e ENV flanqueados por terminais de longa repetição nucleotídica (LTR). O gene Gag codifica as proteínas do capsídeo viral, a região Gag-Pol sintetiza a protease, Pol codifica a transcriptase reversa e a integrase, e o gene Env codifica as proteínas que compõem o envelope viral [31]. Além desses genes, o HTLV-1 contém uma região chamada pX, dentro da região env, um gene adicional próximo a extremidade 3' que codifica as proteínas transativadoras (Tax) e reguladoras (Rex). Tax é importante para a transcrição viral, mas também é capaz de ativar diversos genes celulares. Os genes celulares induzidos por Tax em linfócitos T incluem a cadeia alfa do receptor de IL-2 (CD25), IL-2 e GM-CSF [32]. A proteína Rex, regula a saída de mRNA que codificam proteínas estruturais e promove a produção viral. É uma proteína do genoma do HTLV-1 que induz o processamento do RNA mensageiro (RNAm) viral favorecendo o acúmulo de proteínas estruturais em detrimento de proteínas acessórias, levando à produção de partículas virais [33].



**Figura 1.5: O genoma proviral do HTLV-1.** Os genes estruturais *gag*, *pol* e *env* são flanqueados por 5' e 3' LTR. A região 5' LTR é frequentemente deletada e metilada, enquanto a região 3' LTR invariavelmente permanece intacta em todos os casos de ATL. Na porção 3' do genoma, a região pX codifica as proteínas Tax, Rex, p21, p12, p13 e p30. Como a oncoproteína Tax é a primeiro antígeno a ser alvo da resposta citotóxica do hospedeiro, as células infectadas com mutações em no gene de *tax* geralmente aparecem nos pacientes com ATL. O HBZ, localizado na fita (-) do RNA e a proteína sintetizada numa maneira antisense da região 3' LTR está mostrada em azul. Os números romanos indicam a respectiva região de leitura aberta (ORF) usado para a tradução da proteína indicada. Modificado a partir de Matsuoka et al, 2007 [34].

### 1.2.4 Doenças associadas ao HTLV-1

Desde a sua descoberta, o primeiro retrovírus patogênico em humanos, HTLV-1, foi considerado como agente etiológico da Leucemia T do Adulto (ATL) e mais tarde associado a uma doença neurológica, conhecida como paraparesia tropical ou mielopatia associada ao HTLV-1, HAM/TSP [35]. Além da ATL e da HAM/TSP, o HTLV-1 é responsável pela uveíte e dermatite infecciosa associada ao HTLV-1, entre

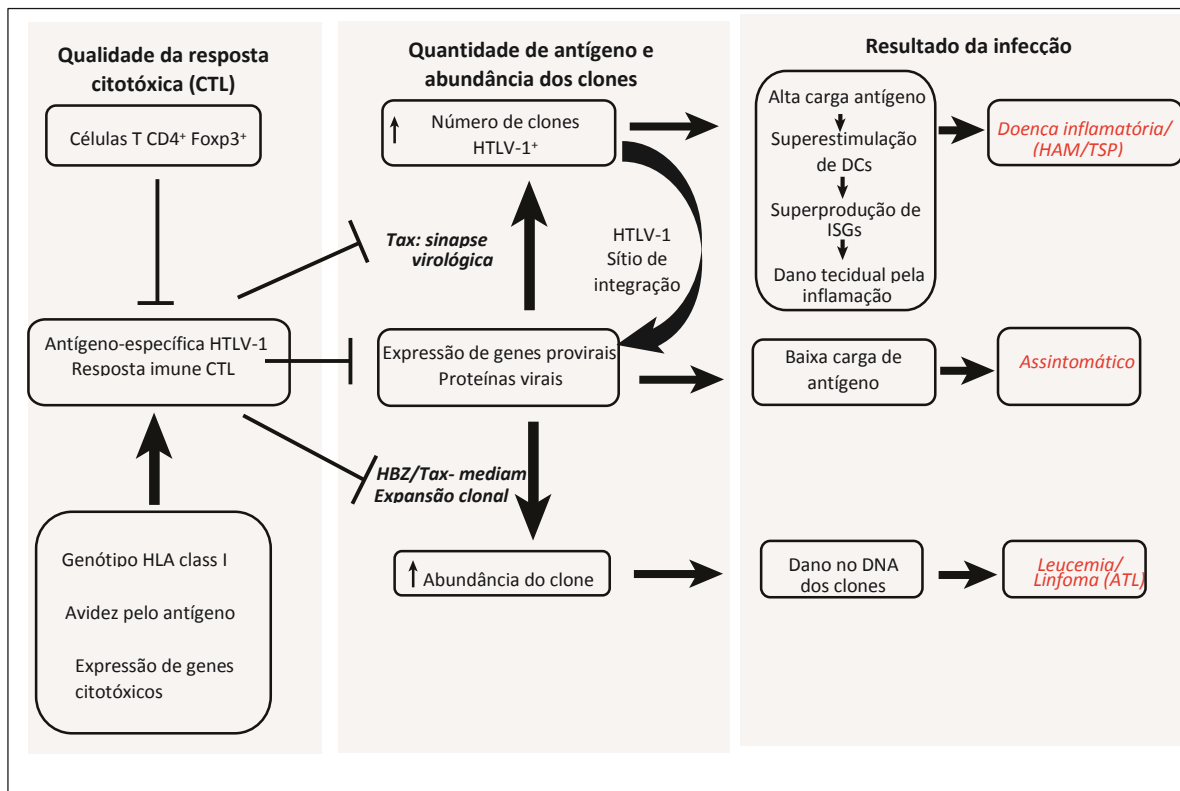
outras doenças [36], [37]. O HTLV-1 é transmitido entre indivíduos através da amamentação, do sêmen e de hemoderivados.

Até hoje não estão esclarecidos os motivos do desenvolvimento de doenças em apenas 2 – 5% dos indivíduos infectados. Outro fator intrigante é que os pacientes desenvolvem HAM/TSP ou ATL, nunca ambas. O aparecimento da ATL ou da HAM/TSP ocorre em indivíduos entre 35 e 50 anos de idade, muitos anos ou até décadas após o contágio. Ainda não se se há sintomas agudos da infecção, nem porque a latência clínica é tão longa. Alguns autores postularam teorias para explicar esses fenômenos. Já se sabe há muitos anos que há uma correlação entre a alta carga viral e o aparecimento da HAM/TSP [37], [38]. O mesmo não ocorre em pacientes com ATL, nos quais a infecção permanece encriptada [35]. Essa observação sugere que eventos no início da infecção sejam importantes para a progressão da doença. A figura 1.6 resume alguns dos fatores que podem levar há uma dessas duas formas de patologia.

Ambas as doenças são caracterizadas pela presença do provirus nas células T CD4<sup>+</sup> de pacientes, mas em níveis muito baixos, sendo difícil a detecção através de anticorpos monoclonais, dando-se preferência à detecção por métodos de amplificação de ácidos nucléicos virais [25], [39], [40]. As células T CD4<sup>+</sup> parecem ser o alvo da infecção pelo HTLV-1. Entretanto, existem evidências da presença do vírus em diversos tipos celulares como linfócitos T CD8<sup>+</sup>, células progenitoras CD34<sup>+</sup>, células endoteliais, astrócitos, células dendríticas e timócitos [35], [41]–[45]. Inclusive, durante a infecção crônica, 90-95% das células infectadas são CD4<sup>+</sup>, mas 5-10% são CD8<sup>+</sup>. A carga viral permanece estável no indivíduo durante todo o curso da doença, apesar de variar até 1000 vezes entre indivíduos [26].

Outro fator que poderia contribuir para o desfecho das patologias associadas ao HTLV-1 é o sítio de integração viral. Alguns estudos mostraram que os sítios de integração varia entre os indivíduos carreadores e os portadores da ATL ou HAM/TSP. Nos carreadores, o vírus é integrado principalmente em regiões silenciosas do genoma, nas quais não há transcrição de proteínas regularmente. A integração em áreas ativas do genoma leva a uma predisposição ao desenvolvimento da HAM/TSP [26], [46]. Quando as células desses pacientes são cultivadas *in vitro*, rapidamente passam a expressar proteínas virais, diferente das células T dos carreadores [46]. Entretanto a resposta imune do indivíduo deve ser levada em consideração para o desenvolvimento dessas patologias, como a qualidade da resposta citotóxica mediada por linfócitos T (CTL). Nos carreadores, os linfócitos T CD8<sup>+</sup> específicos para o HTLV-

1 são abundantes e em ensaios *ex vivo*, sem reestimulação *in vitro*, são capazes de matar as células infectadas pelo vírus. Em indivíduos portadores de HAM/TSP, essa resposta é baixa [47]. Não só a qualidade da resposta citotóxica deve ser levada em consideração, mas também a regulação dessa resposta por células T reguladoras. A frequência de células T reguladoras em pacientes HTLV-1 é mais alta do que na população em geral. Essa alta frequência de células T reguladoras foi correlacionada com uma resposta citotóxica ineficiente. A proteína Tax do HTLV-1 induz a produção de CCL22, ligante de CCR4, expresso nas células T reguladoras. Essa quimiocina atrairia as células T reguladoras em direção às células infectadas, aumenta sua sobrevivência e impede uma resposta citotóxica eficiente [48], [49].



**Figura 1.6: Modelo de persistência e patogênese.** O lado esquerdo da figura mostra a qualidade da resposta dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos (CTL). A eficiência das células líticas é determinada pela herança genética do indivíduo, que define o reconhecimento do epítipo, a avidade funcional e a citotoxicidade das células líticas. As células T CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> (T reguladoras) diminui a resposta lítica às células infectadas, contribuindo de maneira negativa para a resposta a infecção. A seção central da figura mostra a carga viral e a abundância clonal. A carga proviral do HTLV-1 é mantida pela expressão dos genes virais que levam a proliferação das células infectadas e promovem a passagem de vírus para as células alvos via sinapse virológica. Os níveis intrínsecos de expressão dos genes virais são modulados pelo ambiente genômico do sítio de integração e da ação da resposta imune. O desfecho da infecção é determinado pelo equilíbrio entre a abundância de antígeno viral e a eficiência da resposta CTL. À direita, a figura mostra que a eficiência da lise das células infectadas resulta em baixa abundância de antígenos virais e baixa ativação das células dendríticas, as quais promovem respostas de células T moderadas e portadores assintomáticos. A baixa eficiência da resposta lítica resulta em grande abundância de antígenos virais e grande ativação das células dendríticas. A produção persistente de IFN pelas células dendríticas leva ao dano tecidual pela inflamação observado em pacientes com HAM/TSP. Mas se houver muita proliferação clonal, o resultado é o acúmulo de mutações secundárias no DNA e a emergência de um ou mais clones de células T malignos, característicos de pacientes com ATL. Adaptado de Tattermush e Bangham, 2012.



### **1.2.5 Receptores de entrada do vírus e infecção *in vitro***

Apesar de mais de 30 anos após a descoberta do HTLV-1 pelo grupo do Dr. Robert Gallo, os receptores para entrada do vírus em células humanas ainda estão sendo esclarecidos. Recentemente os receptores para a entrada do vírus foram descritos como Neuropilina-1, transportador ubíquo de glicose-1 (GLUT-1) e o Proteoglicano de Heparan Sulfato (HSPG) parecem ser os mais importantes para a entrada do vírus em células humanas. O bloqueio de pelo menos uma dessas moléculas leva a diminuição da infecção *in vitro* [50]. Outros candidatos a receptor são CCR4 e DC-Sign em células dendríticas [44], [48].

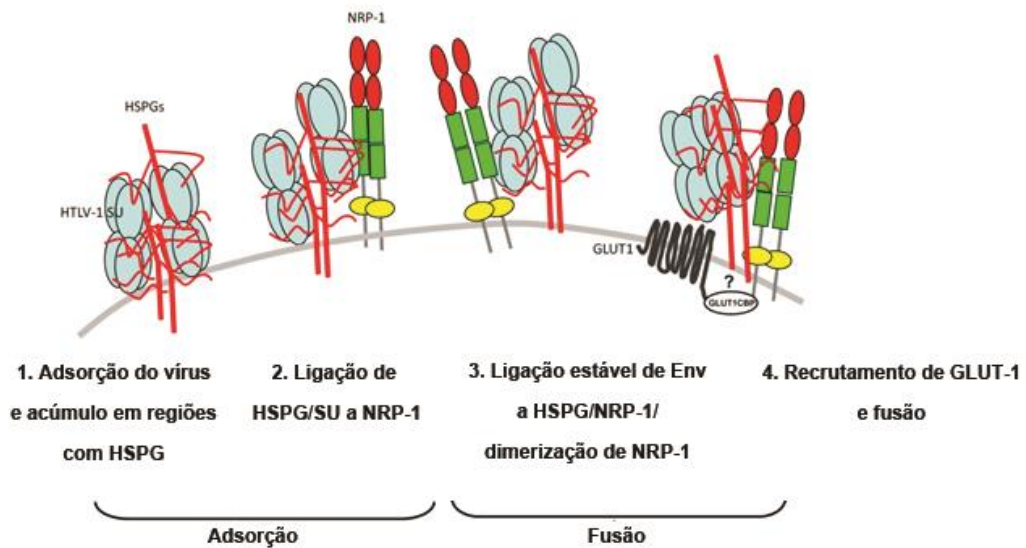
A Neuropilina-1 (NRP-1) interage com a proteína viral Env na superfície da célula alvo contribuindo tanto para a infecção do vírus quanto para a fusão celular [51]. Naturalmente, os ligantes da NRP-1 são a Semaforina III e VEGF (fator de crescimento vascular endotelial). A ligação do VEGF a NRP-1 causa diminuição da expressão da NRP-1 e inibe parcialmente a infecção pelo HTLV-1 em astrócitos, mas não em células HeLa [50]. Indetectável em células T não-ativadas, a NRP-1 é expressa rapidamente após ativação, justamente na área da sinapse imunológica [52]. Essa localização espacial e temporal poderia facilitar a transmissão viral durante a sinapse. Inclusive, alguns trabalhos mostraram que os linfócitos infectados tem expressão de ICAM-1 aumentada e localizada justamente na sinapse virológica, o que aumentaria a adesão e o tempo de contato dessas células com outras que expressam LFA-1, facilitando também a transmissão viral [53].

O segundo receptor descrito como um importante fator da infecção pelo HTLV-1 é o GLUT-1. As células infectadas pelo HTLV-1 expressam alterações metabólicas, independentes da formação de sincícios e são caracterizadas pela acidificação do meio de cultivo e diminuição da produção de lactato extracelular e do consumo de glicose. A interação do GLUT-1 com o envelope viral do HTLV-1 altera o metabolismo da glicose e evidencia os mecanismos que podem levar as desordens fisiopatológicas presentes nos indivíduos infectados pelo HTLV-1 [54].

Apesar de NRP-1 e GLUT-1 serem considerados receptores de entrada do HTLV-1, ainda é controverso se a expressão de ambos é necessária, ou apenas de uma dessas moléculas. Em astrócitos, quando NRP-1 foi bloqueado, houve uma significativa inibição da infecção. Entretanto, o mesmo não aconteceu com as células HeLa. Para inibir completamente a infecção em astrócitos, tanto NRP-1 quanto GLUT-1 precisavam ser bloqueados, mas em HeLa, apenas o bloqueio de GLUT-1 inibiu a

infecção [50]. Apesar de pouco compreendidos, esses resultados mostram que a entrada do vírus é um evento mais complexo do que previamente se esperava.

Outro fator descrito como importante na infecção pelo HTLV-1, o proteoglicano de heparan sulfato (HSPG) é expresso na superfície de diversos tipos celulares, mas tem baixa expressão em linfócitos T CD4<sup>+</sup> não ativados, alvo principal do HTLV-1. Entretanto, após ativação, os linfócitos T CD4<sup>+</sup> passam a expressar HSPG [55]. As moléculas de HSPG são compostas por um core proteico associado a uma ou mais cadeias de polissacarídeos chamadas glicosaminoglicanos de heparan sulfato. Possuem alta carga negativa que facilita a interação com diversos fatores de crescimento e seus receptores, quimiocinas, citocinas e diversas proteínas de matriz extracelular ou do plasma, contribuindo para a fisiologia do sistema [56]. Já foi visto a interação entre patógenos e vírus com os HSPG, geralmente aumentando a infecção por facilitar sua adesão a célula alvo, formando “clusters” de proteínas e partículas virais antes da interação com seus receptores específicos de entrada. No caso do HTLV-1, a remoção do HSPG da superfície das células diminui a infecção em linfócitos T CD4<sup>+</sup> [55]. No modelo de entrada do vírus descrito atualmente, parece que o HSPG não é um receptor para a entrada do vírus, mas se liga a proteína SU do envelope viral, facilitando a infecção. Dessa forma, o vírus permanece aderido a membrana das células e se liga aos seus receptores de específicos que culminam na infecção (Figura 1.7) [50], [57]. Inclusive, um modelo de interação entre o HSPG, NRP-1 e GLUT-1 foi proposto baseado no modelo de entrada do HIV-1. Nesse modelo, durante a adsorção inicial do vírus a célula, a proteína SU do HTLV-1 interage com HSPG via sua porção C-terminal, permitindo a adesão do vírus a superfície celular. Esse evento permitiria o acúmulo de SU e aumenta a probabilidade de interação dessa proteína com a NRP-1. O complexo de HSPG/SU interagiria com a NRP-1 e direciona a ligação de NRP-1/SU, levando a uma mudança conformacional de SU, expondo o sítio de ligação para GLUT-1. A ligação de SU com GLUT-1 levaria ao processo de fusão da partícula viral a membrana celular [57]. Esse modelo é sustentado pelos dados em linfócitos T CD4, células dendríticas e astrócitos, mas em outras células são necessárias mais investigações. A partir desse modelo de interação entre o vírus e os receptores elucidaremos alguns mecanismos proposto de transmissão viral, que podem ser vistos na Figura 1.7.

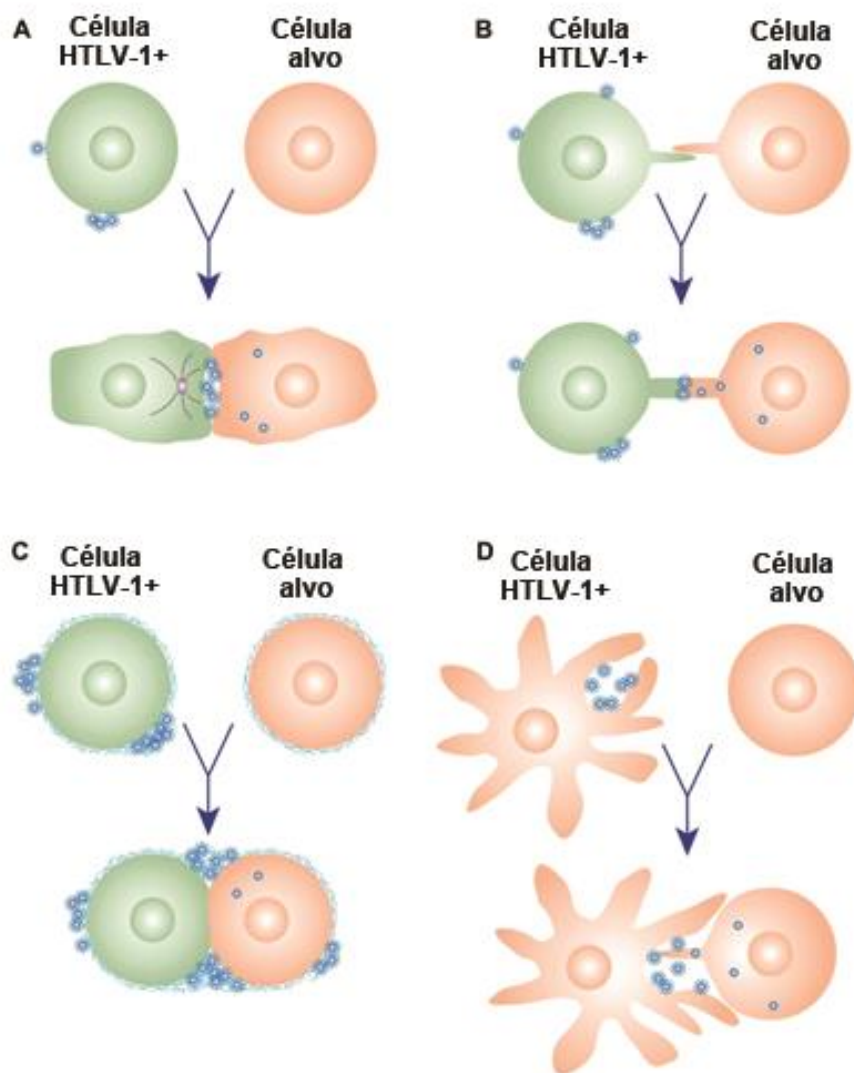


**Figura 1.7: Receptores de entrada do HTLV-1.** A entrada do HTLV-1 na célula alvo começa com a ligação da partícula viral à moléculas de HSPG pela glicoproteína de superfície viral gp46. A proximidade entre HSPG e NRP-1 levaria a uma mudança conformacional de NRP-1, que formaria dímeros, permitindo sua ligação com o vírus. GLUT-1 seria recrutado para essa região rica em HSPG e NRP-1 dimerizada. A ligação das glicoproteínas de superfície gp46 e gp21 a GLUT-1 levaria a adsorção viral e fusão do envelope a membrana celular, permitindo a entrada do capsídeo viral [57].

A via clássica descrita para a infecção do HTLV-1 é por contato direto célula-célula através da formação da sinapse virológica. Nessa via, logo após o contato entre duas células, o HTLV-1 induz uma rápida reorientação do centro organizador de microtúbulos (MTOC) para a junção entre as células, através de sinalização via Tax [58]. A formação da sinapse virológica requer a polarização do citoesqueleto e a expressão de moléculas de adesão, como LFA-1 e ICAM-1, estabilizando e mantendo a sinapse por tempo maior [53], [59] (Figura 1.8 A). A sinapse seria o ponto onde as partículas virais estariam concentradas e passariam diretamente de uma célula para outra, evitando o meio extracelular e a retenção de partículas virais via tederina, molécula presente na membrana celular que se liga ao envelope viral no momento do brotamento da partícula, impedindo o desprendimento do vírus, que é novamente internalizado via endocitose e posteriormente degradado [60], [61]. Outro mecanismo de transmissão viral via contato direto entre as células, é por filopódios. Nessa via, a

célula envia projeções da membrana plasmática ricas em proteínas virais que são transmitidas a outra célula no momento do contato. A proteína p8 do HTLV-1, induz a localização do LFA-1 nos microdomínios de membrana e também a formação, o número e o comprimento dos filopódios, favorecendo a comunicação entre as células e a transmissão viral [62], [63] (Figura 1.8 B).

Há muito se acredita que a transmissão do HTLV-1 só seria por contato célula-célula e através da expansão clonal das células CD4<sup>+</sup> infectadas, passando o vírus para as células filhas [26], [53], [59]. Entretanto, em 2008, Pais-Correa e colaboradores mostraram que células dendríticas tanto mielóides quanto plasmocitóides eram capazes de ser infectadas por vírus livre no sobrenadante e mediavam a transferência do vírus para células T CD4<sup>+</sup> primárias. As células T CD4<sup>+</sup> primárias eram infectadas e passavam a proliferar de maneira independente de IL-2 [45], [64] (Figura 1.8 D). Mais tarde, o mesmo grupo mostrou que os linfócitos T CD4<sup>+</sup> das linhagens C91/PL e MT-2 apresentavam partículas virais que formavam “clusters” na superfície da célula, aderidas a uma estrutura em forma de tipo biofilme. Essas estruturas tipo biofilme eram formadas por componentes da matriz extracelular, sendo que proteoglicanos de heparan sulfato estavam co-localizados com as partículas virais, enquanto colágeno e fibronectina, apesar de aumentados, estavam distribuídos aleatoriamente pela membrana da célula. Minutos após o contato entre o linfócito T infectado e o linfócito T alvo, toda a estrutura de biofilme, incluindo as partículas virais foram observadas na célula alvo, em locais independentes da sinapse (Figura 1.8 C).



**Figura 1.8: Modelos de transmissão do HTLV-1 via contato célula-célula:** **A)** Sinapse virológica. Quando uma célula infectada pelo HTLV-1 entra em contato com outra a célula alvo, a sinapse virológica é formada por interações específicas entre as proteínas de adesão (LFA-1/ICAM-1) da célula infectada e da célula alvo. O MTOC (em cinza) é reorientado em direção ao ponto de contato. O brotamento do vírus acontece na sinapse virológica. Os novos vírus entram na célula alvo através da fenda da sinapse virológica. **B)** Filopódios: as células infectadas pelo HTLV-1 podem transmitir o vírus através de extensões transitórias da membrana celular, o filopódio. As interações podem acontecer entre filopódios e células e entre filopódios de duas células. **C)** Vírus no biofilme. Logo após o brotamento, as partículas virais ficam presas as proteínas de matriz extracelular que compõem o biofilme. Quando em contato com outra célula, toda a estrutura seria transferida e o vírus infectaria a célula alvo logo em seguida. **D)** Transmissão via células dendríticas (DCs). DCs capturariam as partículas virais nos sítios de infecção, mas ao invés de se infectar, transfeririam as partículas virais para linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Modificado a partir de Pique e Jones, 2012.

### **1.2.6 Transformação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> pelo HTLV-1**

Atualmente existem diversas linhagens celulares derivadas de pacientes HTLV-1. Muitas delas não sofreram qualquer manipulação *in vitro*, pois foram imortalizadas *in vivo* pelo próprio HTLV-1. Aliás, para imortalização de células linfóides *in vitro*, o HTLV-1 pode ser utilizado como ferramenta.

Um fato bastante intrigante é que a expressão de proteínas virais *in vivo* é muito baixa, mas quando as células são colocadas por 24 horas em cultura, sem qualquer agente de ativação, ocorre uma significativa expressão de proteínas virais na superfície das células. Esse fenômeno é observado tanto em células provenientes de pacientes com ATL, HAM/TSP ou carreadores [65]. A baixa expressão de proteínas virais na superfície das células infectadas deve fazer parte de um sistema do vírus de evasão da resposta imune e também uma possível explicação para o longo período de progressão para a doenças.

Acredita-se que a imortalização das células *in vivo* ocorra através de modificações transcricionais mediadas por Tax, uma proteína transativadora do HTLV-1. Tax é codificada pela região pX do genoma viral e ativa a região LTR, assim como transativa diversos genes celulares, majoritariamente via ativação de NF- $\kappa$ B [65].

### **1.2.7 Supressão viral mediada pela célula e evasão do sistema imune**

O papel da resposta imune inata e adquirida já foi visto em células infectadas pelo HTLV-1, mas muito ainda resta para ser esclarecido. Na resposta imune inata, o papel de Interferon (IFN) do tipo I (IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ) já foi descrito por alguns autores. A partir da ligação do IFN tipo I ao seu receptor (IFNAR), é iniciada uma cascata de sinalização que leva a indução de mais de 300 genes, conhecidos como genes induzidos por IFN (ISGs – “Interferon Stimulated Genes”) [66]. A resposta antiviral mediada por IFN tipo I tem como principais vias a Mx GTPase, via ISG15 tipo ubiquitina, a OAS (2'-5'-oligodenilato-sintetase) direcionada por ribonuclease L (RNase L) e a proteína quinase R ou PKR. A Mx GTPase bloqueiam a transcrição, limitando a expressão de genes virais. A OAS ativa a RNase L latente que cliva o RNA simples fita, que é rico em Uracila. A PKR é ativada por RNA fita simples ou dupla, e inibe a tradução proteica através da fosforilação de eIF2 $\alpha$  [65], [67], [68]. Inclusive foi vista que a produção de IFN tipo I por células não-linfóides, como HEK293T e fibroblastos (3T3) é capaz de diminuir a expressão de proteínas virais *in vitro*. O tratamento de células recentemente isoladas de pacientes com ATL ou HAM/TSP com

IFN tipo I impediu que a expressão de proteínas virais aumentassem. Esses fatos nos levam a crer que o IFN tipo I é um potente inibidor do HTLV-1 não só *in vitro*, mas também *in vivo*. E ainda mais, as células não-linfóides são as fontes de IFN tipo I. Todavia, os autores não demonstram se durante os experimentos de co-cultivo entre as células não-linfóides são infectadas ou não pelo vírus [65].

Além dos citados anteriormente, a expressão de outros ISGs também já foi estudada na infecção pelo HTLV-1. A tederina (do inglês, “tetherin”) é uma proteína transmembrana com as extremidades C- e N-terminal ancoradas na membrana por uma âncora de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) e domínios de membrana convencionais, sendo enriquecida nos microdomínios de membrana. Originalmente esta proteína foi chamada de BST2 ou CD317, é um braço efetor da parte da resposta imune inata antiviral baseado na sua capacidade de retenção das partículas de HIV e outros vírus na membrana da célula infectada [69], [70]. Sua ação não é específica, mas parece que duas ou mais moléculas de tederina na membrana celular se ligam umas às outras no momento do brotamento da partícula viral, retendo o vírus a membrana da célula. Eventualmente, as partículas virais são endocitadas e degradadas [60][71]–[73]. Alguns vírus desenvolveram mecanismos de evasão da tederina. Por exemplo, a proteína Vpu do HIV-1 é capaz de se ligar a tederina e de alguma forma, ainda não muito clara, liberar a partícula viral formada da membrana da célula [69], [70], [72]–[77]. Contudo, ainda não foi encontrada nenhuma proteína com função semelhante no HTLV-1, sugerindo que a tederina é um fator de restrição da transmissão do HTLV-1 via partículas livres e que apesar de restringir o brotamento das partículas virais, ela não é capaz de restringir a infecção via contato direto célula-célula, podendo até ser um facilitador nesta via de transmissão [61].

### **1.3 O HTLV-1 no timo**

Há evidências da presença de HTLV-1 no timo demonstrada por PCR (14). Num estudo italiano com pacientes portadores de Miastenia Gravis, o timo foi analisado quanto a presença dos genes *tax* e *pol* do HTLV-1. Através de PCR, 92,5% dos pacientes eram positivos para *tax* e 55% para os genes *pol*, sendo que 55% das amostras eram positivas para ambos. No mesmo estudo, 53% dos pacientes com hiperplasia do timo, 93% das amostras de timo era positivas para *tax* (40% para ambos). Das amostras com timoma, 91,6% era positiva para *tax* e 75% para ambos. Os autores sugeriram que o HTLV-1 ou parte de seu genoma pode estar envolvida na etiopatogênese da miastenia gravis [78]. Para nós, esse trabalho confirma a presença

do HTLV-1 em timo total, sem separação entre timócitos e células do estroma. Outros autores mostraram que os timócitos são alvos do HTLV-1. Marguer e colaboradores demonstraram a infecção de timócitos pelo HTLV-1 induzindo, sua proliferação de maneira independente de IL-2, característica desse retrovírus (5). Nesse trabalho, os autores mostraram também que a ativação dos linfócitos T pelo HTLV-1 era independente da sinalização via CD3-TCR. Precusores linfoides CD2<sup>-</sup> CD3<sup>-</sup> proliferam e reorganizam seu TCR antes da expressão de CD3. Nesses timócitos CD2<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>, os mRNAs para as cadeias alpha e beta do CD3 foram transcritos, mas não havia expressão na membrana da célula. Alguns anos mais tarde, o mesmo grupo publicou outro artigo propondo que a infecção vertical através do aleitamento materno poderia ser correlacionada com o desenvolvimento da ATL [42]. Essa correlação se deve ao achado de que as células transformadas encontradas nos pacientes com ATL sofreram expansão mono ou oligoclonal na periferia, mas que esse resultado seria fruto de transformações nos linfócitos T nos primeiros anos de vida. Os timócitos poderiam ser alvo do HTLV-1 e como células imaturas, seriam mais vulneráveis a alterações genéticas que resultariam na leucemia. Conseqüentemente, as células alvo do HTLV-1 devem ser recrutadas entre os precusores de células T, mas não nas progenitoras, já que não foi encontrada HTLV-1 nos progenitores da medula óssea. Resumindo, a infecção dos timócitos poderia favorecer o desenvolvimento da leucemia anos depois [35]. Outras evidências suportam esse raciocínio. Por exemplo, alterações que poderiam perturbar os processos de seleção tímica foram observados em timócitos infectados, como a diminuição da expressão gênica da cadeia alfa do receptor da célula T (TCR) (16). A expressão anormal desse receptor leva a um atraso na maturação do linfócito T, perturbando o processo de diferenciação dessas células, culminando na geração de um repertório de células T anormal. Apesar das evidências da presença de HTLV-1 no timo, vários estudos em linfócitos foram realizados, mas muito pouco foi explorado quanto à infecção do estroma tímico, em particular, da célula epitelial tímica. Recentemente, nosso grupo publicou um artigo evidenciando que células do epitélio tímico podem ser infectadas pelo HTLV-1 presente no sobrenadante de cultura de linhagens provenientes de pacientes HTLV-1 [79]. Essas linhagens eram de linfócitos T CD4<sup>+</sup> isoladas de pacientes com Leucemia T do Adulto (ATL). No mesmo estudo, foi demonstrado que esses linfócitos T cronicamente infectados pelo HTLV-1 tem maior capacidade de adesão às células epiteliais do timo que linfócitos T não-infectados. Esses resultados nos levaram a acreditar que as células epiteliais do timo podem ser alvo da infecção pelo HTLV-1, espalhando a



infecção pelo órgão, já que são abundantes, e culminaria na transmissão da infecção do HTLV-1 para os timócitos, levando prejuízos aos processos de maturação, seleção e formação do repertório de linfócitos T. O período de latência da infecção também poderia ser explicado pela infecção das células do epitélio tímico, porque uma vez infectadas, serviriam como reservatório do vírus, transmitindo a infecção para os timócitos. Mesmo que a eficiência de transmissão do vírus seja baixa, as células do epitélio tímico são capazes de infectar um grande número de timócitos, amplificando a infecção. Os timócitos infectados sofreriam alterações na expressão gênica devido a influência de fatores virais, como Tax, que num momento de ativação e expansão clonal, transmitem o vírus as células-filhas que são transformadas levando a leucemia do adulto.

## 2 OBJETIVO GERAL

Definir se o epitélio tímico é alvo e reservatório da infecção pelo HTLV-1, sendo infectado e transmitindo a infecção para novas células.

### 2.1 Objetivos específicos

1. Confirmar a infecção das células epiteliais do timo pelo HTLV-1 via contato célula-célula;
2. Demonstrar que vírus livres são capazes de infectar de células do epitélio tímico;
3. Verificar se há modulação da expressão gênica nas células epiteliais do timo após infecção do HTLV-1 por vírus livres;
4. Verificar se há a modulação dos expressão dos receptores de entrada do vírus e outras moléculas importantes para função das células epiteliais do timo após infecção pelo HTLV-1;
5. Avaliar se as células do epitélio tímico infectadas atrairiam mais linfócitos T CD4<sup>+</sup> através de ensaios de migração *in vitro*;
6. Demonstrar que a célula epitelial do timo é capaz de infectar linfócitos T CD4<sup>+</sup>;
7. Mostrar o fenótipo dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> antes e após a infecção mediada pelas células epiteliais do timo.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

**3.1 Linhagens celulares:** A célula tímica humana utilizada em nossos experimentos foi estabelecida de timo fetal humano (entre 9 – 20 semanas) por técnica de explante, subcultura e clonagem por diluição seriada [80]. As células foram derivadas do epitélio cortical do timo e expressam CD40, HLA-ABC e HLA-DR, H-CAM (*homing associated cell-adhesion molecule*), ICAM-1, LFA-3, e integrinas da família beta-1. CIB foi obtida de um paciente com HAM/TSP, purificada por seleção positiva para T CD4<sup>+</sup> após estimulação com PHA-M (fitohemaglutinina, 1µg/mL) e cultivada com IL-2 (50 U/mL) [81]. C91/PL é uma linhagem produtora de HTLV-1 obtida por Robert Gallo (National Cancer Institute, Bethesda, MD) proveniente de um paciente com ATL [82]. CEM é uma linhagem de linfócitos T proveniente de uma criança de 5 anos com leucemia linfoblástica, descrita em 1965 [83].

**3.2 Obtenção de célula mononucleares de sangue periférico:** bolsas de sangue de doação voluntária foram coletadas no banco de sangue do Hospital Geral de Bonsucesso, Rio de Janeiro. O sangue foi retirado da bolsa e acondicionado em tubos plásticos de centrífuga de 50 mL (Corning) em cabine de segurança biológica nível 2. Em outro tubo contendo 10 mL de Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich) foram adicionados 20 mL de sangue total. Os tubos foram centrifugados a 800 x g durante 20 minutos a 25 °C com baixa aceleração e sem frenagem. O anel formado entre as hemácias e o plasma contendo as células mononucleares foram aspiradas e dispensadas num novo tubo. Ao tubo contendo as hemácias foram adicionados 10 volumes de PBS para a lavagem das células por centrifugação a 400 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em meio próprio para cada experimento realizado. As células foram contadas com o auxílio da câmara de Neubauer e aquelas não-viáveis excluídas por coloração com Azul de Tripan 0,2% (Sigma-Aldrich).

**3.3 Cultivo celular:** Para todas as linhagens celulares utilizadas no presente estudo foram utilizados meio RPMI 1640, obtido da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino da Cultilab (Campinas, Brasil) no momento da utilização. A esse meio de cultivo foram acrescentados antibióticos estreptomicina e penicilina, além de L-glutamina.

**3.4 Produção de sobrenadante de cultura contendo HTLV-1:** para os experimentos de infecção de células epiteliais tímicas através do sobrenadante de linhagens de linfócitos T provenientes de pacientes cronicamente infectados pelo HTLV-1, foram feitas culturas de CIB, C91PL e CEM (controle não-infectado). Cada cultura foi iniciada com  $2 \times 10^6$  células em 10 mL de meio de cultura e mantida por 72 horas a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> em atmosfera úmida. Após esse período, todo o meio de cultivo contendo as células foi retirado e centrifugado a 400 x g durante 5 minutos. O sobrenadante foi filtrado em filtros de 0,2 µm (Merck-Millipore) e usado congelado a -80 °C em alíquotas. O pellet celular foi ressuspendido, contado e novamente colocado em cultura. O sobrenadante utilizado nos experimentos de migração, proveniente da cultura de células epiteliais tímicas, foi retirado de culturas contendo  $10^6$  células plaqueadas em garrafas de 75 cm<sup>2</sup> contendo 15mL de meio de cultura. Após 48 horas, o sobrenadante foi retirado e filtrado em filtro com poro de 0,2 µm (Merck-Millipore), sendo utilizado imediatamente nos experimentos. Como não tínhamos a nossa disposição kits para detecção de partículas virais no sobrenadante, recolhemos o sobrenadante das culturas e após filtração estocamos a -80°C. Em todos os experimentos foram utilizados sobrenadantes recolhidos e estocados previamente.

**3.5 Infecção de células epiteliais tímicas por contato com linhagens celulares infectadas por HTLV-1:** em lâminas de vidro de 8 poços (Lab-Tek, Nunc),  $2 \times 10^4$  células THF foram plaqueadas em 500 µL de meio de cultivo RPMI com 10% de SBF, por poço. Após 24 horas, o sobrenadante foi retirado, a cultura lavada com 100 µL de PBS por poço e um novo meio de cultivo contendo  $10^5$  linfócitos T CD4<sup>+</sup> das linhagens CIB, C91/PL ou CEM foram adicionados e deixados em contato durante 1h30 a 37 °C. Após esse período o sobrenadante contendo as células não-aderidas foi retirado e um novo meio de cultivo foi adicionado. O tempo de co-cultura variou e está descrito na seção Resultados.

**3.6 Infecção de células epiteliais tímicas por sobrenadante de linfócitos T HTLV-1\*:**  $10^6$  células epiteliais tímicas (TEC) foram cultivadas em 15 mL de meio de cultivo durante 24 horas. O meio de cultivo foi retirado e 10 mL de sobrenadante derivado da cultura de linfócitos T infectados ou não pelo HTLV-1 (como descrito no item 4.3) foram adicionados. As garrafas foram incubadas durante 1h30 a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub>. O sobrenadante foi retirado e a cultura lavada com 10 mL de PBS. Em seguida, um novo meio de cultivo foi adicionado e a cultura mantida até a análise. A partir do resultado

positivo de infecção por imunofluorescência, expandimos e mantivemos a linhagem em cultura ou congelada, seguindo o mesmo protocolo de cultivo da linhagem original, sem infecção. Em experimentos subsequentes foram utilizadas essas linhagens estocadas.

**3.7 Separação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> por sorting em citômetro de fluxo:** 10<sup>8</sup> células mononucleares de sangue periférico foram marcadas com 10µL de anticorpos anti-CD4 FITC e anti-CD3 Percep (BD Biosciences). As células duplo-positivas foram selecionadas e separadas através do citômetro de fluxo FACS Aria II (BD Biosciences). A pureza foi avaliada imediatamente após o *sorting* e aceitas amostras contendo acima de 95% de linfócitos T CD4<sup>+</sup>.

**3.8 Cultura de linfócitos T CD4<sup>+</sup> de sangue periférico:** 2 x 10<sup>6</sup> células mononucleares por mililitro de meio de cultivo RPMI 1640, suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Cultilab) foram colocados em cultura a 37 °C, 5% de CO<sub>2</sub> em atmosfera úmida. As células foram ativadas com fitohemaglutinina (PHA) a 10 µg/mL (Sigma-Aldrich) por 48 horas antes dos experimentos (exceto migração).

**3.9 Infecção de linfócitos T CD4<sup>+</sup> por contato com células epiteliais tímicas HTLV-1<sup>+</sup>:** vinte mil células epiteliais tímicas (THF) foram cultivadas por 48 horas em lâminas de vidro (Lab-Tek, Nunc) com 500 µL de meio RPMI 1640 e 10% de soro fetal bovino, com já descrito. Após esse período, a cultura atinge cerca de 70% de confluência, momento em que os linfócitos T CD4<sup>+</sup>, tanto da linhagem CEM quanto de cultura primária ou células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram co-cultivados. Para tal, o sobrenadante da cultura foi retirado, lavado uma vez com PBS. 10<sup>5</sup> linfócitos foram adicionados, num volume de 500 µL de seu próprio meio de cultura. O tempo de co-cultivo está descrito para cada experimento na seção 4 (Resultados).

**3.10 Análise Fenotípica por Citometria de Fluxo:** para a análise fenotípica das linhagens celulares foram utilizadas 3 x 10<sup>5</sup> células por poço. Para esses experimentos, as células aderentes (THF) tiveram o meio de cultura retirado, e foram lavadas com PBS gelado. Após a lavagem a monocamada recebeu 10 mL de solução contendo EDTA 10 mM durante 10 minutos a 37 °C. Após esse tempo, as células foram cuidadosamente retiradas com “cell scraper” ou “rodinho”, sendo observadas

através de microscópio invertido durante o processo para garantir que o maior número de células fosse retirado. As células foram condicionadas em tubos e centrifugadas a 400 x g durante 5 minutos a 10 °C. O processo de lavagem foi repetido e as células contadas. As células foram transferidas para placas de 96 poços, centrifugadas e o sobrenadante descartado. A seguir foram adicionados 5 µL de soro humano AB+ durante 10 minutos e a solução contendo os anticorpos num volume final de 10 µL. Após 30 minutos a 4 °C, as células foram lavadas com 50 µL de PBS e ressuspendidas em formaldeído 1% (Merck). Onde houve marcação com anticorpo secundário, este foi adicionado num volume final de 10 µL após a lavagem, incubado durante 30 minutos a 4 °C, lavado novamente e finalmente as células foram fixadas em formaldeído. As amostras foram adquiridas nos citômetros de fluxo FACS Aria II ou FACS Canto II, ambos da BD Biosciences (California, USA). As análises foram realizadas através do software FlowJo (Tree Star Inc, Ashland, USA).

**3.11 Avaliação da infecção por Imunofluorescência:** as células foram plaqueadas em Lab-teks de vidro de 8 poços (Nunc, Thermo Scientific) num volume de 500 µL, contendo  $2 \times 10^4$  células por poço. Após 48 horas, as células atingiram 70% de confluência, momento no qual o meio de cultivo foi retirado. Inclusive nos experimentos de co-cultivo, o procedimento descrito a seguir foi realizado (ver seções 3.4, 3.5 e 3.6). A cultura foi cuidadosamente lavada com PBS a temperatura ambiente e fixada por adição de 100 µL de etanol por poço durante 4 minutos. Após retirada do etanol as lamínas foram armazenadas a -20 °C. Para a marcação foram adicionados 100 µL de PBS/BSA 2% para bloqueio de sítios inespecíficos durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após a retirada dessa solução, o anticorpo primário anti-citoqueratina diluído em PBS 1:50, num volume final de 50 µL foi adicionado e deixado por 1 hora. Os poços da placa foram lavados 3 vezes com PBS, sendo cada lavagem de 5 minutos. Em seguida, foi adicionado o anticorpo secundário (1:300) por 1 hora. Novamente, foram feitas 3 lavagens com PBS e incubação durante a noite com anti-p19 ou anti-gp46 (1:50) a 4 °C. No dia seguinte, foram realizadas 3 lavagens com PBS e adicionado o anticorpo secundário por 1 hora. As placas foram lavadas com PBS e adicionado DAPI (1:10.000) (DAKO) por 5 minutos. Após lavagem, as divisórias das placas foram retiradas, meio de montagem Prolong Gold (DAKO) adicionado e a lamínula montada. As placas foram mantidas a temperatura ambiente durante a noite e mantidas a 4 °C. As fotografias foram tiradas no microscópio Zeiss ou no

microscópio confocal de varredura a laser FluoView FV10i (Olympus) e analisadas no ImageJ (NIH).

### **3.12 Quantificação de células epiteliais tímicas Gag<sup>+</sup> por imunofluorescência:**

trezentos núcleos corados com DAPI de pelo menos 3 experimentos foram contados com o auxílio do programa ImageJ. Após essa contagem, foram contados núcleos com marcação de Gag ao seu redor. Núcleos negativos para Gag, foram contados como células não-infectadas e núcleos positivos como células infectadas. A contagem foi realizada de maneira semiautomática com o auxílio do plugin do programa “Analyse > Cell Counter”. Através dessa ferramenta, cada clique num núcleo contou como uma célula e o segundo clique no mesmo núcleo com o filtro vermelho aplicado (mostrando a coloração de Gag em vermelho) contava como célula infectada. A diferença entre a contagem total de núcleos e a contagem de células infectadas foi considerada como contagem de células não-infectadas.

### **3.13 Análise da proliferação celular por incorporação de CFSE:**

10<sup>6</sup> células THF e THF HTLV-1+ (após 7 dias de infecção) foram tratadas com CFSE (diacetato carbofluoresceína succinimidil ester) 10 µM durante 15 minutos a 37 °C. Após esse tempo, foram adicionados 10 mL de RMPI 1640 e as amostras centrifugadas a 400 x g por 5 minutos. O processo foi repetido mais uma vez e as células recolocadas a 37 °C por mais 15 minutos, e novamente centrifugadas para que o excesso de CFSE fosse retirado, tornando a incorporação mais homogênea. A aquisição dos controles de incorporação de CFSE foi realizada no mesmo dia e o restante das células foi analisado após 72 horas em cultura. A aquisição foi feita no FACS Canto II (BD Biosciences) e a análise automática de ciclo no software FlowJo (Tree Star Inc, Ashland, USA).

### **3.14 Análise de morte celular por incorporação de iodeto de propídeo (PI):**

duzentas mil células foram coradas com adição de 5 µL de PI a 50 µg/mL. Após leve agitação a amostra foi adquirida no citômetro FACS Canto II (BD Biosciences) e analisado no software FACSDIVA (BD Biosciences).

### **3.15 Microscopia Eletrônica de Transmissão:**

Após a retirada do sobrenadante, as células epiteliais tímicas foram retiradas da garrafa de cultura com o “cell scraper” ou “rodinho” (TPP Techno Plastic Products, Suíça) e lavadas com PBS duas vezes. O

sobrenadante descartado e o pellet desfeito com agitação e ressuspendido em glutaraldeído 2,5% num volume 10 vezes o do pellet durante 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida as células foram fixadas em tampão cacodilato de sódio-HCl (0,1 M), novamente centrifugadas e ressuspendidas em 1mL deste tampão e armazenadas a 4 °C. A pós-fixação foi feita com solução de tetróxido de ósmio (OsO<sup>4</sup>) a 1% em tampão cacodilato 0,1 M por 1 hora à temperatura ambiente no escuro seguida de lavagem no mesmo tampão. Em seguida, foi feita desidratação com série crescente de 30, 50, 70, 90 e 100% durante 10 minutos cada etapa. Os fragmentos foram infiltrados em solução de agente desidratante e resina a 4 °C por 18 horas. O pellet celular foi incluído com resina Epoxi (Epon 812) a 60 °C durante 72 horas. O pellet celular emblocado foi cortado em ultramicrotomo e condicionados em grades de cobre. A solução de contraste contendo acetato de uranila 2% em água foi utilizada durante 10 minutos, seguida de 3 minutos em solução de citrato de chumbo. Esta preparação foi gentilmente realizada pela Dra Maria Cristina Machado Motta, do Laboratório de do IBCCF/UFRJ. O material foi observado no microscópio eletrônico de transmissão Tecnai Spirit Biotwin G2 da Rede de Plataformas Tecnológicas PDTIS da Fiocruz.

**3.16 Ensaios de migração in vitro:** para estes ensaios foram utilizadas placas de Transwell (Nunc) de 24 poços, com insertos contendo membrana com poro de 5 µm. Nos poços contendo células THF na câmara inferior, foram plaqueadas  $2 \times 10^4$  células, 48 horas antes do experimento, num volume de 500 µL. No dia do experimento, 140 µL de BSA a 10 µg/ µL (albumina sérica bovina, Sigma-Aldrich) ou fibronectina humana (Sigma-Aldrich), na mesma concentração, foi colocado no inserto da câmara de Transwell. Após 1 hora a 37 °C, o excesso de líquido foi retirado com auxílio de pipeta e adicionado mais 140 µL de PBS/BSA 0,5% por 45 minutos. Novamente, o excesso de líquido foi retirado e o inserto transferido para o poço da migração contendo ou não as células epiteliais do timo. Em todos os poços foi feita a cobertura da membrana do inserto com o BSA, como descrito, exceto no poço contendo fibronectina. Nos poços utilizados como controle negativo, havia somente a cobertura com BSA e a migração se deu em meio RPMI/BSA 1% sem qualquer célula ou sobrenadante. Nos poços utilizados como controle positivo, havia a cobertura da membrana com fibronectina, e a migração feita em RPMI/BSA 1%. No poço inferior foram colocados 500 µL de RPMI/BSA 1% ou sobrenadante de cultura conforme o experimento realizado. Para migrar, foram colocadas  $5 \times 10^5$  células da linhagem CEM



ou  $10^6$  células mononucleares de sangue periférico fresco na câmara superior do inserto com poro de 5  $\mu\text{m}$  de diâmetro, em 100  $\mu\text{L}$  de meio RPMI com BSA 1% (albumina sérica bovina, Sigma-Aldrich) ou sobrenadante da cultura de THF infectada ou não de 48 horas de cultivo, como já descrito. Após 20 horas a 37 °C, 5% de  $\text{CO}_2$  em atmosfera úmida, as células foram recolhidas da câmara inferior e contadas através de câmara de Neubauer, com exclusão das células mortas por Azul de Tripán 0,2% (Sigma-Aldrich). Nos poços onde haviam células THF na câmara inferior, essas também foram recolhidas e facilmente diferenciadas dos linfócitos pelo tamanho e morfologia.

**3.17 Anticorpos:** Os anticorpos para ensaios de citometria de fluxo e imunofluorescência foram obtidos junto à Becton Dickinson (Franklin Lakes, EUA), Abcam (Cambridge, USA), R&D Systems (Minneapolis, USA), DAKO Corporation (Carpinteria USA). Maior detalhamento sobre esses anticorpos pode ser obtido na tabela 2.1. Anexina V, iodeto de propidium e soluções tampão utilizadas nos ensaios para análise de morte celular foram obtidas da Southern Biotech (Birmingham, USA).

**Tabela 3.1: Anticorpos**

ALVO	ANTICORPO (ANTI-)	FLUOROCROMO	ESPÉCIE PRODUZIDA	ESPÉCIE ALVO	FABRICANTE
CD3	CD3	PE/PERCP/APC	CAMUNDONGO	HUMANO	BD PHARMINGEM
CD4	CD4	PE/PECY5/APC	CAMUNDONGO	HUMANO	BD PHARMINGEM
CD8	CD8	Alexa Fluor 647	CAMUNDONGO	HUMANO	BD PHARMINGEM
LFA-1	CD11a	PE	CAMUNDONGO	HUMANO	BD PHARMINGEM
VLA-1	CD49a	PE	CAMUNDONGO	HUMANO	BD PHARMINGEM
VLA-2	CD49b	FITC	CAMUNDONGO	HUMANO	BD PHARMINGEM
VLA-3	CD49c	PE	CAMUNDONGO	HUMANO	BD PHARMINGEM
VLA-4	CD49d	APC	CAMUNDONGO	HUMANO	BD PHARMINGEM
VLA-5	CD49e	PE	CAMUNDONGO	HUMANO	BD PHARMINGEM
VLA-6	CD49f	FITC	CAMUNDONGO	HUMANO	BD PHARMINGEM
ICAM-1	CD54	PECY5	CAMUNDONGO	HUMANO	BD PHARMINGEM
NCAM-1	CD56	FITC	CAMUNDONGO	HUMANO	BD PHARMINGEM
L-SELECTINA	CD62L	PECY5	CAMUNDONGO	HUMANO	BD PHARMINGEM
VCAM-1	CD106	APC	CAMUNDONGO	HUMANO	BD PHARMINGEM
CXCR4	CD184	APC	CAMUNDONGO	HUMANO	BD PHARMINGEM
CCR4	CD194	FITC	CAMUNDONGO	HUMANO	BD PHARMINGEM
CCR5	CD195	APC CY7	CAMUNDONGO	HUMANO	BD PHARMINGEM
CCR6	CD196	Alexa Fluor 647	CAMUNDONGO	HUMANO	BD PHARMINGEM
CCR7	CD197	FITC	CAMUNDONGO	HUMANO	BD PHARMINGEM
CITOQUERATINA	PANCITOQUERATINA	PURIFICADO	COELHO	HUMANO	DAKO
GAG	p19	PURIFICADO	CAMUNDONGO	HTLV-1	ABCAM
ENV	gp46	PURIFICADO	CAMUNDONGO	HTLV-1	ABCAM
GLUT-1	GLUT-1	PURIFICADO	CAMUNDONGO	HUMANO	BD PHARMINGEM
NEUROFILINA-1	NEUROFILINA-1	PE	CAMUNDONGO	HUMANO	BD PHARMINGEM
<b>ANTICORPOS SECUNDÁRIOS</b>					
IgG	IgG	Alexa Fluor 488	CABRA	COELHO	AMERSHAM BIOSCIENCES
IgG	IgG	Alexa Fluor 546	CABRA	CAMUNDONGO	AMERSHAM BIOSCIENCES
IgG	IgG	CY5	CABRA	COELHO	AMERSHAM BIOSCIENCES

**3.18 Extração de RNA:** As células foram cultivadas por pelo menos 10 dias após o descongelamento ou imediatamente após os experimentos. Em seguida, essas foram recolhidas e lavadas duas vezes com PBS (Sigma Aldrich), centrifugando-as a 400 x g, durante 5 minutos, a 10 °C, e transferidas para microtubos de 1,5 mL, centrifugadas novamente e o sobrenadante retirado completamente com auxílio de micropipeta. O pellet foi imediatamente congelado em gelo seco e mantido a -80 °C até o momento da extração. Foram utilizadas pelo menos 10<sup>6</sup> células por experimento. O RNA foi extraído com kit próprio para este fim da Qiagen (RNeasy Mini Kit). As células foram

lisadas adicionando 350  $\mu\text{L}$  do tampão RLT do kit diretamente no pellet congelado e a amostra pipetada até formar solução homogênea. Em seguida, adicionou-se 350  $\mu\text{L}$  de etanol 70% e misturado. A solução foi colocada na coluna presente no kit e centrifugada a 8000 x g durante 15 segundos. O sobrenadante foi descartado e 700  $\mu\text{L}$  de solução RW1 foi adicionada a coluna. Novamente centrifugada a 8000 x g durante 15 segundos, sobrenadante descartado e adicionado 500  $\mu\text{L}$  da solução RPE, seguida do mesmo processo de centrifugação. Novamente adicionada a solução de RPE e centrifugada durante 2 minutos. A coluna é transferida para um novo tubo e centrifugada a 13.000 x g por 1 minuto com a tampa aberta para que todo o álcool residual fosse eliminado. O RNA foi eluído em 10  $\mu\text{L}$  de água livre de RNase colocada diretamente sobre a membrana da coluna. Novamente centrifugada a 8000 x g por 1 minuto. Foi separado 1  $\mu\text{L}$  de RNA para quantificação no Nanodrop (ThermoScientific). O restante foi mantido a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento da análise.

**3.19 PCR quantitativa em Tempo Real:** após a quantificação, 100 ng de RNA por poço de cada amostra foi utilizada na reação de PCR em tempo real. Para tal utilizamos o kit One Step qRT-PCR com ROX (Life Technologies). A reação se deu de acordo com as instruções do fabricante. De forma resumida, foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de Master Mix (Express Sybr GreenER qPCR Super Mix with premixed ROX), 1  $\mu\text{L}$  de primer Forward, 1  $\mu\text{L}$  de primer Reverse, numa concentração final de 70  $\mu\text{M}$  de cada primer, 100 ng de RNA e água, num volume total de 20  $\mu\text{L}$  por poço. Todos os experimentos foram realizados com triplicatas técnicas, além dos controles “No-RT” (sem enzima) e “No template” (sem amostra), sendo o volume destes componentes substituídos por água. As triplicatas foram feitas num mesmo microtubo, sendo distribuídas pela placa de 96 poços para PCR (Life Technologies), na qual as amostras foram centrifugadas a 200 x g durante 3 minutos a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  antes de ser colocada na máquina de PCR modelo Step One Plus (Life Technologies). Os ciclos da PCR são os seguintes:  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos para síntese de cDNA,  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 20 segundos e 40 ciclos a  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 1 segundo,  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 20 segundos, seguidos da análise da curva de “melting”  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Nos resultados analisados não houve detecção de sinal nos controles de reação, No RT e No Template, nem picos de fluorescência acima de  $75\text{ }^{\circ}\text{C}$  na análise da curva de melting. Resultados positivos para algum desses controles foram descartados. Os primers utilizados nos experimentos estão descritos na tabela 2.2.

**Tabela 3.2 Primers e sequências**

Alvo	Sequência (5'->3')
Hsa IL-8 F	AGCACACAAGCTTCTAGGAC
Hsa IL-8 R	GCAAAACTGCACCTTCACA
Hsa IL-6 F	TACCCCAGGAGAAGATTCC
Hsa IL-6 R	TTACATGTCTCCTTTCTCAGGG
Hsa IL-1a F	AAGGCGAAGAAGACTGACTC
Hsa IL-1a R	GGCCATCTTGACTTCTTTGCT
Hsa IL-1b F	GAATCTGTACCTGTCCTGCG
Hsa IL-1b R	TTGGGATCTACACTCTCCAGC
Hsa B2M F	GATGAGTATGCCTGCCGTGT
Hsa B2M R	TGCGGCATCTTCAAACCTCC
Hsa CXCL3 F	AAACCGAAGTCATAGCCACAC
Hsa CXCL3 R	GGAAGTGTCAATGATACGCTG
Hsa CXCL1 F	TTGCCTCAATCCTGCATCCC
Hsa CXCL1 R	TTGGATTTGTCACTGTTTCAGCA
Hsa CCL2 F	CCGAGAGGCTGAGACTAACC
Hsa CCL2 R	CATTGATTGCATCTGGCTGAG
Hsa ICAM1 F	TTCCTCACCGTGTACTGGAC
Hsa ICAM1 R	GGTAAGGTTCTTGCCCACTG
Hsa HPRT1 F	CCTGGCGTCGTGATTAGTG
Hsa HPRT1 R	TCGAGCAAGACGTTTCAGTCC
Hsa RPL13 F	CGGACCGTGCGAGGTATGCT
Hsa RPL13 R	AGCAGGAACCACCATCCGCT
Hsa TFRC F	CTAGTGTTCTTCTGTGTGGCAGTT
Hsa TFRC R	ACAATGGTTCTCCACCAACAAG

**3.20 Análise da PCR quantitativa em Tempo Real:** A partir dos dados de acúmulo de fluorescência das triplicatas da reação de RT-PCR em tempo real de cada amostra, utilizou-se o ajuste de função logística, ou curva sigmóide, de quatro parâmetros para representar cada curva de amplificação, usando a biblioteca de funções qpcR (Ritz & Spiess, 2008), para a linguagem estatística R (R Development Core Team, 2009) versão 2.922. O ciclo de quantificação, ou Cq, foi determinado como o ciclo relativo ao ponto de máxima da segunda derivada da curva sigmóide ajustada (ponto característico, ou crossing point (Cp)). O uso desse ponto de máxima característico é conveniente uma vez que ele se encontra numa região de eficiência constante na fase exponencial da curva de amplificação, além de ser invariante do poço e placa aonde ocorre a reação de RT-PCR de tempo real (Rebrikov et al., 2006).

A eficiência de cada reação de amplificação foi calculada como a razão entre a fluorescência do ciclo de quantificação e a fluorescência do ciclo anterior a esse. A eficiência estimada de cada gene foi obtida pela eficiência média das eficiências calculadas para cada reação de amplificação daquele gene. Os genes empregados na normalização entre as diferentes amostras amplificadas, TFRC e HPRT, foram selecionados pelo método geNorm (Vandesompele et al., 2003). O algoritmo do geNorm parte do pressuposto de que os genes com expressão mais estável em relação aos outros genes analisados são os mais adequados para normalização interna. Para a comparação de médias dos valores de expressão normalizados entre os grupos foi utilizado, ou teste t não paramétrico via permutação (n=1000), ou one-way ANOVA não paramétrica via permutação irrestrita (n=1000), seguido da comparação de médias par-a-par por teste t não paramétrico via permutação (n=1000) com correção de Bonferroni (Basso et al., 2009), para dois ou mais grupos, respectivamente. Os dados são apresentados pela média  $\pm$  erro padrão da média. Níveis de significância bi-caudais menores ou iguais a 0,01, 0,05 e 0,1 foram considerados como sugestivos, significantes e altamente significantes, respectivamente.

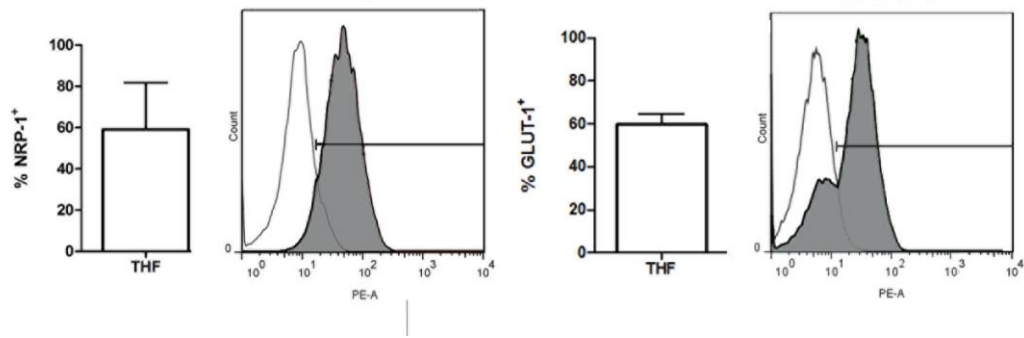
**3.21 Análise estatística:** As comparações foram feitas comparando-se o grupo experimental ao controle ou entre dois grupos com diferentes tratamentos, Foi utilizado o teste *t* para essas comparações seguido de pós-teste. Foi utilizado o software de análise GraphPrism 5 (GraphPad Software), exceto casos em que há menção de outro, como nas análises de PCRq. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas com  $p \leq 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Células epiteliais tímicas expressam os receptores de entrada do HTLV-1

Os receptores envolvidos na entrada do HTLV-1 são a NRP-1, GLUT-1 e HRPG. Recentemente foi proposto um modelo multi-receptor para a entrada do vírus na célula alvo [84] (figura 1.7). O fato é que NRP-1 e GLUT-1 podem formar complexos na presença da proteína gp46 do HTLV-1, sugerindo que essas duas moléculas juntas promoveriam a entrada do vírus. Corroborando com esse modelo, a infecção em linfócitos T é diminuída quando um desses receptores é bloqueado, mas em astrócitos ambos precisam ser bloqueados para que ocorra a inibição da infecção. Ainda de acordo com esse modelo de interação entre receptores, alguns autores sugerem que a ligação ocorre primeiro entre Neuropilina-1 e Env e após mudança conformacional é feita a ligação com GLUT-1, que leva a translocação das proteínas virais para o interior da célula [29].

A expressão de Neuropilina-1 em timo humano foi descrita por nosso grupo em colaboração com pesquisadores franceses em 2007 [85]. Nesse trabalho, a expressão desse receptor foi observada tanto em mTEC quanto cTEC *in situ* e *in vitro*, além de timócitos CD4/CD8 positivos. Inclusive, a expressão de Neuropilina-1 aumentou quando timócitos entravam em contato as TEC ou quando ativados via TCR e IL-7. Com base nesses conhecimentos, nós realizamos experimentos de citometria de fluxo para verificar se a linhagem de células epiteliais tímicas que trabalhamos, THF, expressa os receptores essenciais para a entrada do HTLV-1. Na figura 4.1, podemos observar a expressão de neuropilina-1 e GLUT-1 nas TEC cultivadas em nosso laboratório.

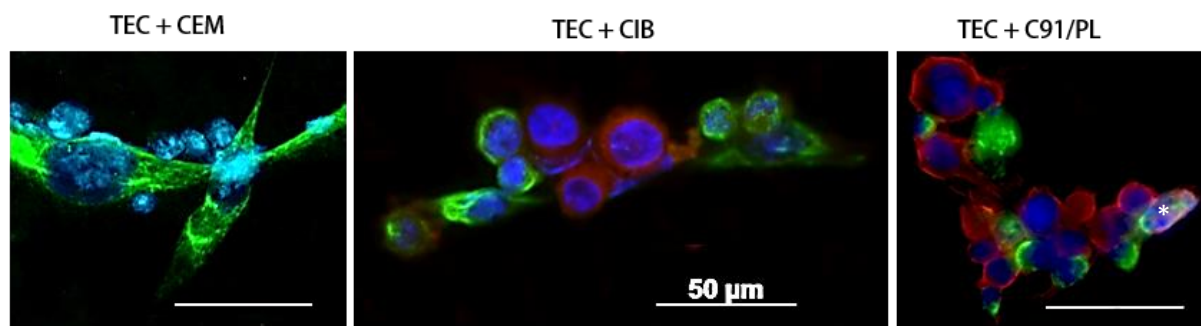


**Figura 4.1: Células epiteliais tímicas expressam os receptores para a entrada do HTLV-1. A)** em média 60% das células em cultura expressaram o receptor neuropilina-1. **B)** expressão GLUT-1 em 60% nas células do epitélio tímico. Em detalhe é mostrado um histograma representativo da expressão de cada um desses receptores. **C)** células expressam ambos os receptores para a entrada do vírus.

A presença desses receptores nessas células nos leva a crer que elas poderiam ser infectadas pelo HTLV-1. Nossa hipótese é reforçada por relatos na literatura da presença de HTLV-1 no timo de pacientes com diversas patologias [35], [42], [86].

#### **4.2 Células epiteliais tímicas são infectadas pelo HTLV-1 através do contato com linfócitos T cronicamente infectados**

A expressão dos receptores para o HTLV-1 e a presença do vírus em timo de pacientes, nos fez acreditar que as células do epitélio tímico podem ser o alvo da infecção e mais ainda, ser um reservatório viral em indivíduos infectados. Apesar da transmissão de diversos retrovírus ser preferencialmente através de vírus livre no meio extracelular, a via clássica de infecção pelo HTLV-1 é diretamente célula-célula, com poucos relatos de infecção por vírus livres. Alguns autores acreditam que o HTLV-1 livre não é capaz de infectar células [45]. Para testar a hipótese de que as células epiteliais tímicas podem ser infectadas e confirmar nossos resultados anteriores [79], fizemos o co-cultivo de linhagens de células T CD4<sup>+</sup> infectadas (CIB e C91/PL) com as TEC. Após 24 horas foi possível observar a marcação dupla de citoqueratina e p19 na cultura, indicando a presença do vírus na TEC nas culturas de células infectadas, mas não na cultura com linfócitos T não-infectados (CEM) (Figura 4.2).



**Figura 4.2: Células do epitélio tímico são infectadas pelo HTLV-1 *in vitro*.** Após 24 horas em co-cultivo foi possível observar a marcação de Gag (p19, em vermelho) nos linfócitos T e nas TEC infectadas. Em verde está um filamento intermediário característico marcador de célula epitelial, a citoqueratina. Em azul foi marcado o DNA com DAPI. O asterisco localiza uma célula com coexpressão de citoqueratina e p19. As barras representam 50  $\mu\text{m}$ . Este experimento é representativo de 5.

Vale ressaltar que o resultado obtido através da marcação com Gag, uma proteína da matriz viral, nos dá indícios fortes de que o vírus fusionou com a membrana, integrou no DNA da célula alvo e novos vírus estão sendo formados. Isso explicaria porque a marcação positiva em TEC só foi observada após 24 horas, com muito poucas células epiteliais positivas para o vírus. Entretanto, o tempo de co-cultivo não foi aumentado devido a formação de sincícios entre os linfócitos infectados e as TEC, gerando dúvidas sobre a produção de proteínas virais pelo linfócito ou pela célula epitelial. Este resultado também reforça nossos achados anteriores que demonstraram que além da TEC ser infectada pelo HTLV-1, a adesão de linfócitos infectados à TEC era superior a adesão de linfócitos não-infectados [79]. Vale ressaltar que a CIB é proveniente de um paciente com HAM/TSP, enquanto a C91/PL de um paciente ATL.

Esse experimento é bastante interessante do ponto de vista que o timo é um órgão onde as células epiteliais e linfócitos têm um intenso contato íntimo e prolongado umas com as outras, havendo grandes possibilidades para a transmissão viral célula-célula. Entretanto, a transmissão viral via contato direto entre as células pode não ser a única forma de infecção do HTLV-1 como veremos a seguir.

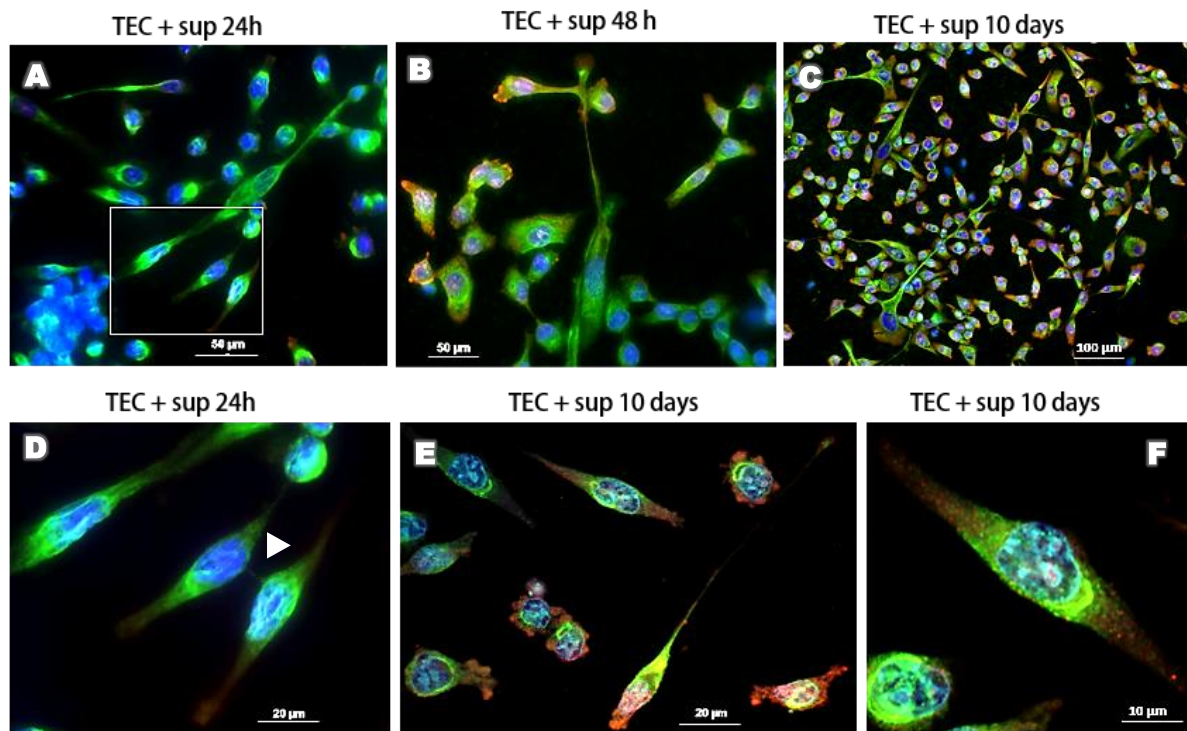
#### **4.3 Vírus livres são capazes de infectar células epiteliais do timo**

Apesar de poucos, há relatos na literatura evidenciando a infecção de células dendríticas por vírus livres, ou seja, independente do contato célula-célula [27]. Pensando no timo como órgão alvo na infecção pelo HTLV-1, a recirculação de



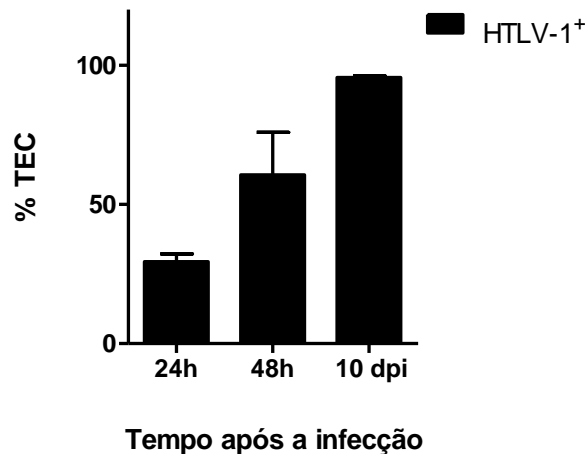
linfócitos T maduros é pequena, mas o microambiente é rico em linfócitos em processo de diferenciação [6]. Uma vez que algumas células infectadas pelo HTLV-1, sendo linfócitos, macrófagos ou até células dendríticas, a infecção por vírus livres poderia ampliar rapidamente a infecção pelo órgão. Para avaliar a possibilidade de que partículas virais de HTLV-1 livres são capazes de infectar células epiteliais do timo fizemos a exposição das TEC ao sobrenadante da cultura de linfócitos T CD4<sup>+</sup> infectados pelo HTLV-1 (CIB e C91/PL) durante 1 hora e 30 minutos. Após esse período, o sobrenadante foi retirado e a cultura lavada com PBS. Um novo meio de cultivo foi colocado e as células fixadas após 24, 48 horas ou 10 dias. Para nossa surpresa, apenas o sobrenadante de C91/PL foi capaz de infectar com sucesso as TEC em todos os experimentos realizados. A infecção através do sobrenadante de CIB não teve sucesso nos experimentos analisados (dados não mostrados). Talvez a divergência entre os autores sobre a infecção pelo HTLV-1 através de vírus livres seja, além do protocolo de infecção, tempo de exposição e outras condições, o próprio vírus ou célula da qual foi colhido o sobrenadante. Decidimos neste momento trabalhar exclusivamente com a infecção das células epiteliais tímicas através do sobrenadante da C91/PL nos próximos experimentos.

Um aspecto bastante relevante em nossos estudos foi o tempo de cultivo das células epiteliais tímicas após o contato com o sobrenadante infectado. Como é possível observar na figura 4.3, a cultura de TEC após 24 horas apresenta poucas células positivas para p19, além da marcação ser bem mais fraca do que a observada após 48 horas de cultivo. Neste tempo, a cultura apresenta células positivas para o HTLV-1, que costumam formar esses grupos de células positivas e áreas de células negativas. Após 10 dias de cultivo, quase todas as células da cultura estão positivas para p19, além da própria intensidade de fluorescência da marcação ser evidente. Esses resultados nos levaram a crer que apesar de inicialmente a infecção ter sido através de partículas virais num sobrenadante de livre célula, o espalhamento da infecção pela cultura se deve em grande parte a infecção por contato célula-célula.



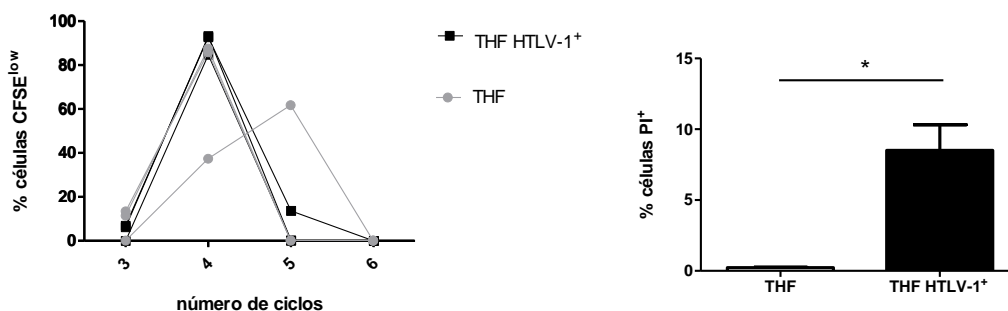
**Figura 4.3: Infecção de células epiteliais tímicas por vírus livre.** **A)** após 24 horas do contato com o sobrenadante contendo partículas virais poucas células apresentaram uma fraca marcação para p19 (em vermelho). **B)** Entretanto, após 48 horas, foi possível observar a marcação de P19 em várias células, além da marcação mais evidente. **C)** em 10 dias, a cultura estava repleta de células positivas para P19. **D)** detalhe de A. A cabeça de seta indica a formação de um filopódio celular entre as TEC. **E** e **F)** Imagens de microscopia confocal mostrando a distribuição das proteínas virais e da citoqueratina nas células infectadas após 10 dias de cultivo. Os valores acima das barras indicam o tamanho em micrômetros. As fotografias são representativas de 5 experimentos.

Fizemos a quantificação das células positivas para P19 ao longo dos dias e após 24 horas, foi possível observar por volta de 20% de TEC P19 positivas, em 48 horas, mais de 50%, sendo bastante variável dependendo da cultura observada. Após 10 dias quase 100% das células estavam infectadas (figura 4.4).



**Figura 4.4: Percentual de células epiteliais tímicas infectadas aumenta com o tempo.** O percentual de células infectadas foi calculado como descrito na seção Material e Métodos. Foram contadas 300 células de 3 experimentos independentes.

Alguns autores sugerem que *in vivo* a transmissão da infecção pelo HTLV-1 entre células seria baixa e que o aumento do número de células infectadas se daria pela proliferação das células infectadas. Já foi visto que linfócitos T CD4<sup>+</sup> são imortalizados pelo HTLV-1 *in vitro* além de *in vivo* [45]. Esse processo se deve a proteína Tax viral que induz alterações na expressão gênica de diversos genes ligados a proliferação e diminuição de genes pró-apoptóticos como *p53* [36], [68], [87], [88]. Nós observamos a proliferação através da marcação com CFSE na cultura de TEC HTLV-1<sup>+</sup> e não houve diferença na proliferação das células tanto por CFSE quanto pela contagem do número de células (figura 4.5). Também analisados o percentual de células não-viáveis na cultura através da incorporação por iodeto de propídeo (PI). O percentual de células não-viáveis na cultura de TEC HTLV-1<sup>+</sup> foi maior do que na cultura sem infecção. Entretanto, a cultura é saudável e suporta ciclos de congelamento e descongelamento, além da manipulação semelhante as células não-infectadas. O número de células é um pouco menor ao longo do tempo de cultivo, provavelmente devido a morte celular, mas como a proliferação não é afetada, não traz prejuízos maiores ao cultivo em si, nem a manipulação e execução de experimentos. Provavelmente o aumento da morte celular ocorre por conta da própria infecção viral que acarreta grande gasto energético para a célula hospedeira e exaustão da maquinaria celular.

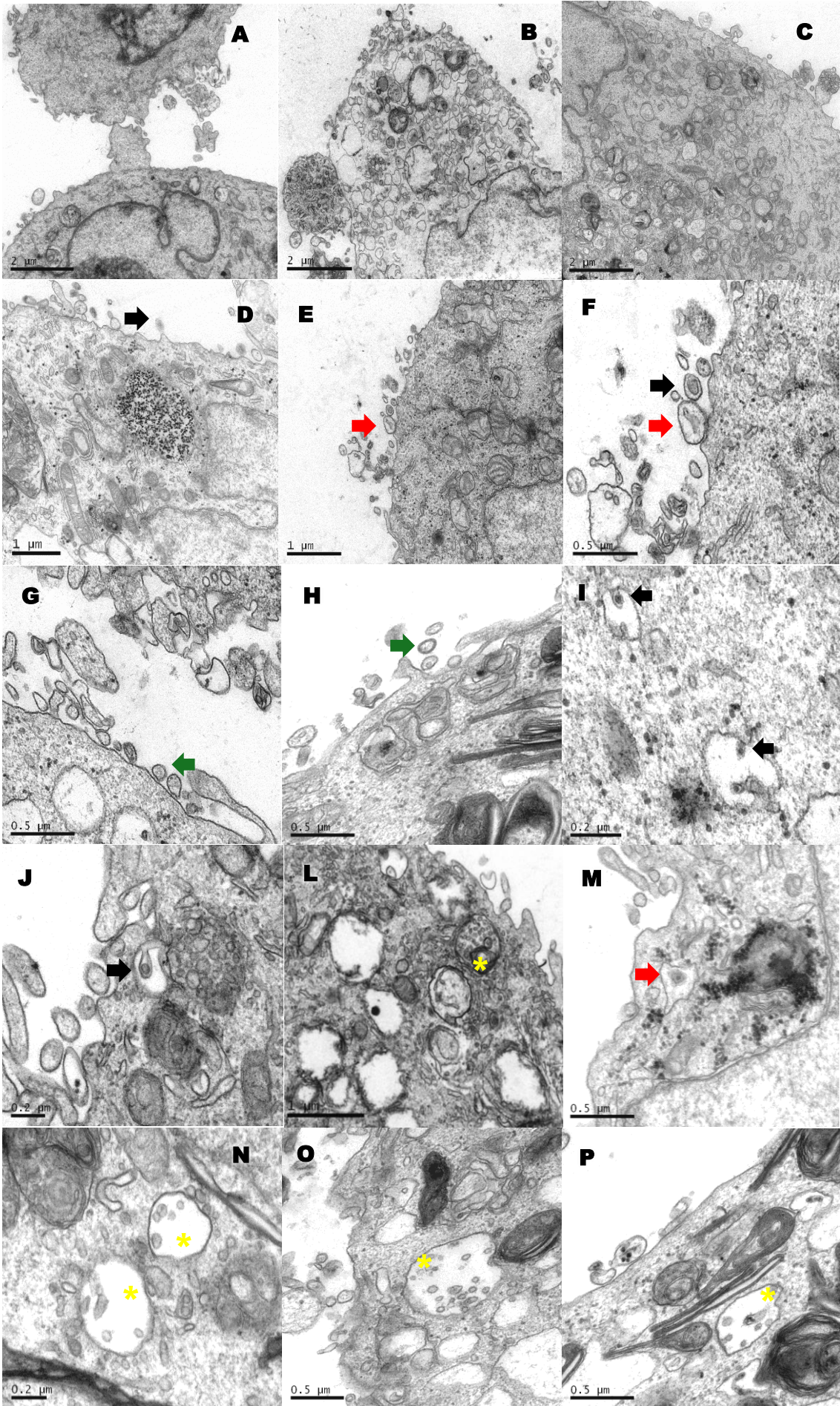


**Figura 4.5: Infecção pelo HTLV-1 não alterou a proliferação, mas aumentou morte nas TEC infectadas. A)** após a infecção pelo vírus foi adicionado CFSE na cultura e observado após 72 horas. O perfil de proliferação foi semelhante entre as células infectadas e não-infectadas exceto em um experimento, no qual as não-infectadas proliferaram mais neste mesmo período. **B)** as células foram marcadas com iodeto de propídeo (PI) momentos antes da aquisição em citômetro de fluxo. Há um aumento significativo no número de células mortas na cultura infectada 10 dias após a infecção. As barras representam 3 experimentos.

Para confirmar a infecção das células epiteliais tímicas por vírus livre, repetimos o mesmo protocolo de infecção por vírus no sobrenadante e deixamos as TEC em cultura por 20 dias, seguidos de congelamento. Após 6 meses, as TEC foram descongeladas, mantidas mais 20 dias em cultura e processadas para microscopia eletrônica de transmissão como descrito na seção Material e Métodos. Esse protocolo foi importante para que não houvesse dúvida da infecção produtiva do HTLV-1 nas células epiteliais do timo, sendo esta a produção de partículas virais pela própria TEC ao invés daquelas presentes no sobrenadante e que por ventura, fossem detectadas na microscopia. Confirmamos a presença de partículas virais nas TEC, através do aspecto morfológico característico do vírus, com a membrana e o a matriz viral arredondados, além da matriz viral mais eletrondensa nas partículas maduras, como pode ser observado na figura 4.6. Nestas microfotografias, parece haver partículas maduras com as características já citadas e ainda partículas imaturas, com membrana de aspecto redondo, mas com a matriz viral de formas diversas e pouco eletrondensa (figura 4.6 G, H, N, O, P). Também foram observados nucléolos bastante proeminentes, característicos das TEC, além de muitas vesículas de diversos tamanhos no citoplasma. Nas células que continham partículas virais, foram observadas muitas mitocôndrias e outras organelas, porém mais experimentos precisam ser realizados para se dizer que haja modificação morfológica devido à

infecção. De fato, foi observada a presença de grandes vesículas com material circular eletrondenso em várias células, como ilustrado na figura 4.6 D, I – P.

Nessas fotografias também podemos distinguir mais um tipo de TEC, baseado em microscopia eletrônica de transmissão já descrito na literatura [1]. Na figura 4.6, intencionalmente A e B, as TEC não infectadas são diferentes entre si pela coloração mais escura no primeiro caso, e mais clara no segundo. O número e formato também variam. O número e distribuição das organelas, assim como a densidade de ribossomos varia entre as TEC da mesma cultura, não importando a infecção pelo HTLV-1. Mesmo que nenhuma marcação tenha sido realizada, parece não haver um só tipo de TEC. Através da morfologia apenas, não é possível distinguir células cTEC de mTEC.

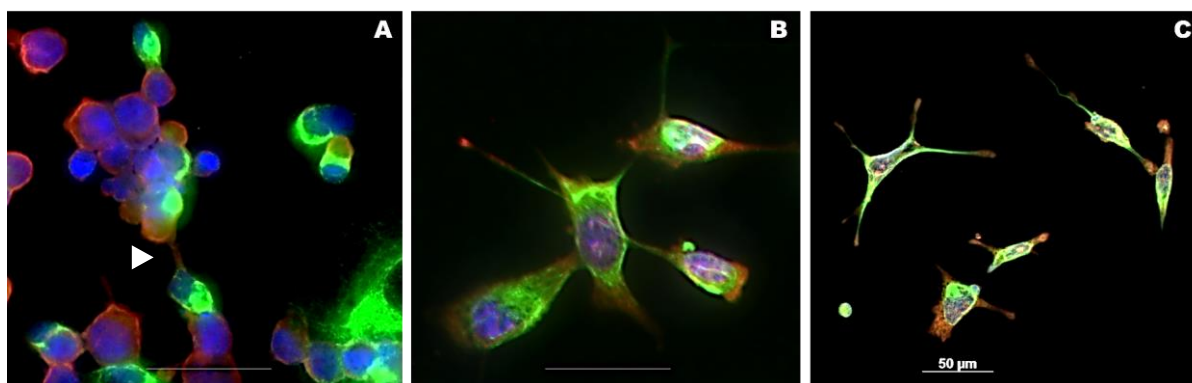


**Figura 4.6: Células epiteliais tímicas apresentam partículas virais características de HTLV-1. A – C)** células epiteliais tímicas não-infectadas pelo HTLV-1 mostram nucléolo bem marcado e vesículas de tamanhos variados. **D - P)** células epiteliais tímicas infectadas com o sobrenadante da cultura de linfócitos T (C91/PL), semanas após a infecção. **D)** Partícula viral em processo de brotamento da membrana da célula infectada e próxima a uma grande vesícula contendo material centenas de esferas eletrondensas. **E)** partículas virais imaturas e maduras ainda ligadas a membrana plasmática. **F)** maior magnificação de E, evidenciando as partículas virais, sendo uma aderida a membrana e outra aderida a última. **G - H)** partículas virais próximas a membrana, mas não aderidas e em processo de maturação. **I)** formas similares a partículas virais maduras no citoplasma e brotando em vesículas da TEC. **J)** grande vesícula contendo múltiplas formas arredondadas semelhantes a partículas virais imaturas e uma partícula viral em processo de brotamento. **L)** célula com várias vesículas aparentemente vazias e com uma contendo formas arredondadas semelhantes a partículas virais próxima a membrana plasmática. **M)** vesícula contendo uma partícula viral e diversas formas esféricas eletrondensas entre o núcleo e a membrana plasmática. **N - O)** grandes vesículas contendo poucas formas semelhantes a partículas virais. As partículas virais maduras apresentam membrana arredondada e core viral também arredondado e eletrondenso (setas pretas). As partículas imaturas podem apresentar o core eletrondenso, mas não redondo (setas vermelhas) ou apenas a membrana mais espessa e bem definida sem aparente core viral eletrondenso (setas verdes). Os asterísticos amarelos indicam as possíveis vesículas contendo partículas virais.

Poucas diferenças morfológicas foram observadas através de microscópio óptico na cultura de rotina entre as células epiteliais infectadas ou não infectadas. Apenas o aspecto do interior da célula, como corpos vesiculares pareciam aumentados e em maior número e menos translúcidas. A área de adesão parecia menor em algumas células da cultura, com aspecto menos ameboide e mais astroide. Todavia, mesmo não aparente, modificações funcionais podem ocorrer após a infecção. Na introdução, foram apresentados alguns dados evidenciando que Tax é um potente indutor da expressão de genes virais e celulares. Essas informações nos fizeram refletir sobre modificações na expressão de diversos genes na célula hospedeira, como será mostrado na próxima seção.

#### 4.4 Formação de filopódios nas TEC infectadas

A localização da proteína viral p19 do vírus e da citoqueratina é diferente nas células epiteliais tímicas, não havendo sobreposição da fluorescência nas fotografias tiradas. Parece que as proteínas virais estão presentes na membrana das células infectadas, enquanto a citoqueratina, filamento intermediário, encontra-se no interior do citosol. Nessas fotos também é possível observar estruturas semelhantes aos filopódios entre as células infectadas, tanto entre a C91/PL e a TEC (Figura 4.6 A), quanto entre TEC (Figura 4.1 D). Na figura 4.6, podemos ver mais alguns exemplos da localização do vírus nas extremidades das TEC infectadas (Figura 4.6 B e C).



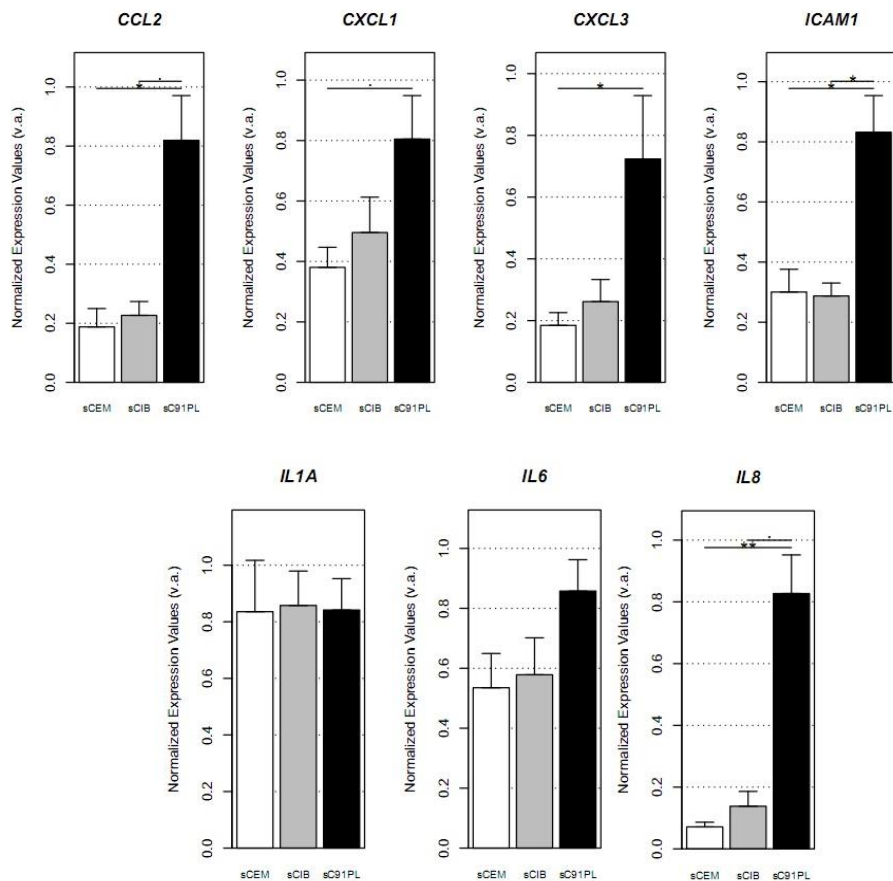
**Figura 4.7: Formação de filopódios e localização do HTLV-1 na extremidade das células.**

**A)** Co-cultivo de C91/PL e TEC por 24 horas mostra a formação de um filopódio celular (cabeça de seta). **B)** e **C)** Mostra algumas TEC após 10 dias de infecção com proteínas virais com forte intensidade de fluorescência nas extremidades da células, num formato um pouco mais longo e menos espraído das células. Barras representam 50 µm.



#### ***4.5 Expressão gênica de citocinas e quimiocinas aumenta em TEC após contato com sobrenadante infectado por HTLV-1 proveniente de paciente com ATL, mas não com HAM/TSP***

Em estudos anteriores do nosso grupo, foi realizado um experimento de microarranjo com as mesmas células epiteliais tímicas após contato por 1 hora e 30 minutos com o sobrenadante das linhagens linfócitos CEM, CIB e C91/PL, as mesmas utilizadas no presente estudo [89]. Vale lembrar aqui alguns resultados daquele trabalho, por exemplo, apenas 18 genes de genes diferencialmente expressos na TEC exposta ao sobrenadante de CIB e CEM (não-infectada) foram observados. Na comparação entre TEC exposta ao sobrenadante de CEM e C91/PL foram observados 305 genes diferencialmente expressos. Entre o tratamento com as duas células infectadas, CIB e C91/PL, as TEC apresentaram 291 genes diferencialmente expressos. Os genes com maior diferença na expressão foram agora analisados por PCR quantitativa em tempo real seguindo o mesmo protocolo de preparação das amostras descrito na seção Material e Métodos e do trabalho anterior. Dentre esses genes estavam diversas quimiocinas, sendo essas na ordem de magnitude de diferença de expressão encontrada no experimento de microarranjo entre o tratamento com sobrenadante de CEM e C91/PL: IL-8, CXCL-1, CCL2 ou MCP-1, CXCL3, ICAM-1, IL-1 $\alpha$  e IL-6. Por PCR quantitativa em tempo real confirmamos a diferença de expressão de CCL2, CXCL3, ICAM-1 e IL-8. A diferença da expressão de CXCL1 é apenas sugestiva ( $p=0,06$ ). Entretanto, não foram observadas diferenças na expressão de IL-1 $\alpha$  e IL-6 (figura 4.8).



**Figura 4.8: TEC tratadas com sobrenadante de C91/PL, mas não CIB, tem expressão gênica para quimiocinas e ICAM-1 aumentada.** Após apenas 1h30 de tratamento com o sobrenadante foi possível observar diferenças em alguns genes nas células do epitélio tímico, sobretudo relacionado a quimiocinas. A molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) também aumentou após tratamento com o sobrenadante de C91/PL. Em nenhum dos genes observados houve diferença entre o tratamento com o sobrenadante de CIB e de CEM, usado neste caso como controle negativo da infecção. Gráficos representativos de 4 experimentos independentes. sCEM: THF tratada com o sobrenadante da cultura de CEM. sCIB: THF tratada com o sobrenadante da cultura de CIB. sC91/PL: THF tratada com o sobrenadante da cultura de C91/PL.

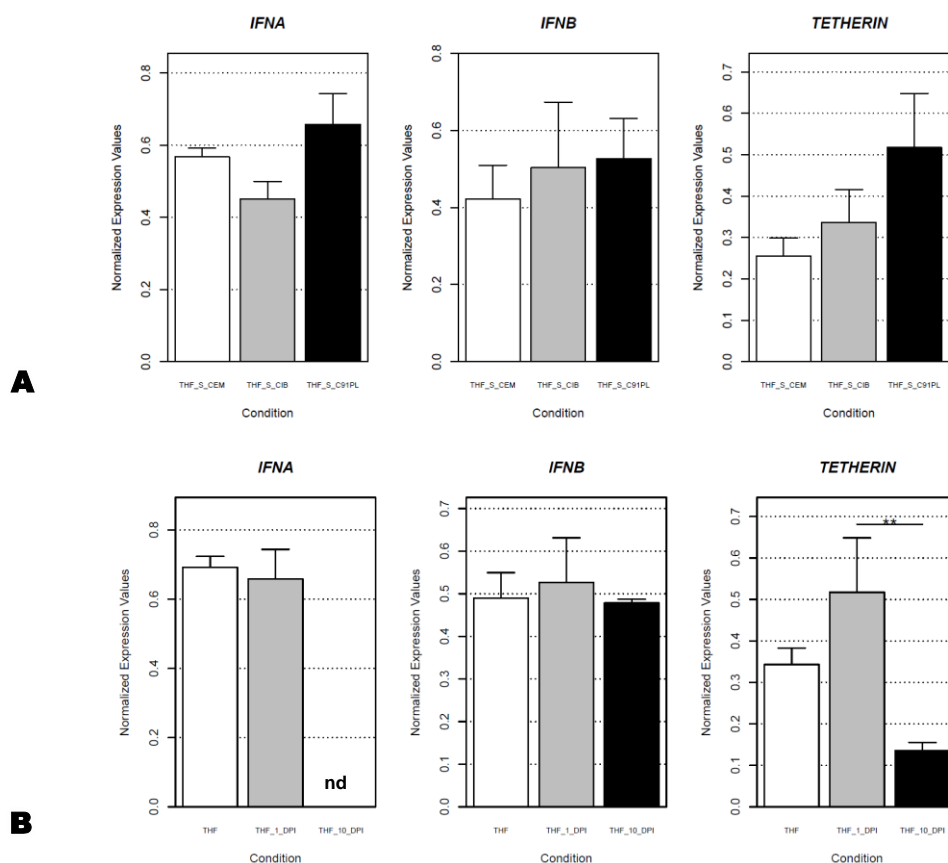
A ausência de diferença na expressão gênica das TEC após tratamento com CIB corrobora com os resultados anteriores da ausência de marcação de infecção da TEC após tratamento com o sobrenadante de CIB. Parece que nesse sobrenadante há poucas partículas virais ou baixa infectividade, apesar dos linfócitos serem positivos para as proteínas virais. Não pudemos confirmar essas hipóteses porque não testamos a concentração de partículas virais no sobrenadante, nem aumentamos o tempo de exposição da TEC a esse sobrenadante. A seguir veremos mais resultados

onde a expressão de genes antirretrovirais da TEC tratada com sobrenadante sem vírus não foi diferente da exposta ao sobrenadante de CIB.

#### **4.6 Expressão gênica de Interferon alfa diminui, mas não de Interferon beta**

Na busca por um melhor entendimento sobre a infecção pelo HTLV-1 em células do epitélio do timo, avaliamos a expressão de genes conhecidamente antirretrovirais, interferons do tipo I (IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ) [68], [90], [91]. Um novo fator antirretroviral tederina, também foi incluído em nosso estudo por ser induzido por interferon do tipo I. A tederina é uma proteína de membrana capaz de formar homodímeros e impedir que o vírus deixem a membrana da célula hospedeira, mantendo-os aderidos a membrana. O HIV tem uma proteína que impede sua retenção na membrana celular via tederina chamada Vpu [70], [72], [73], [76], [92]. Alguns artigos foram publicados recentemente mostrando a expressão de tederina em linfócitos infectados pelo HTLV-1 [27], [61], [72], [91], [93]. Nestes trabalhos, os autores discutem o papel da tederina como fator de restrição ao HTLV-1, mas ainda não há um consenso se a adesão do vírus a tederina seria um fator que dificultaria a transmissão viral por manter o vírus retido a membrana, como no caso do HIV ou se isso poderia facilitar a transmissão viral célula-célula no caso do HTLV-1. Até agora não foi encontrada uma proteína no HTLV-1 com função semelhante ao Vpu do HIV [61].

Em nossas mãos, a expressão de expressão de interferon do tipo I e tederina não foi alterada nas primeiras horas de infecção em nenhum dos tratamentos analisados (Figura 4.9A). No caso de tederina e IFN- $\alpha$ , parece haver uma tendência ao aumento da expressão gênica após 1 hora e 30 minutos de contato da TEC com o sobrenadante de C91/PL. De maneira surpreendente, após 10 dias de infecção, a expressão de IFN- $\alpha$  não foi detectada e expressão gênica de tederina estava diminuída de forma significativa. A expressão gênica de IFN- $\beta$  não foi alterada nos tempos de cultivo avaliados (figura 4.9B).

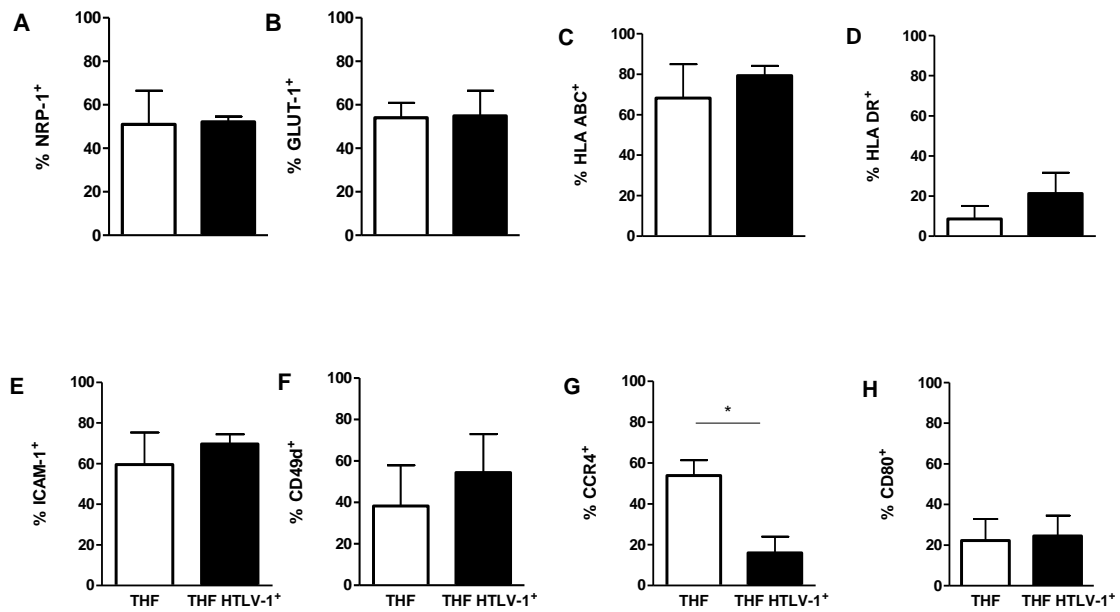


**Figura 4.9: Diminuição da expressão gênica de fatores antirretrovirais em TEC após 10 dias de infecção.** **A)** Após 1 hora e 30 minutos de contato com os sobrenadantes das culturas de linfócitos, a expressão gênica de IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  e tederina foi avaliada, mas não houve diferenças significativas de expressão entre os tratamentos. **B)** a expressão de IFN- $\alpha$  (À esquerda) não foi detectada após 10 dias de cultivo na cultura de TEC e a expressão de tederina (à direita) diminuiu de maneira significativa após o mesmo período em relação a 24 horas após o contato com o sobrenadante. A expressão gênica de IFN- $\beta$  não apresentou variação. THF: linhagem de célula epitelial tímica utilizada nos experimentos sem qualquer tratamento com sobrenadantes. sCEM: THF tratada com o sobrenadante da cultura de CEM. sCIB: THF tratada com o sobrenadante da cultura de CIB. sC91/PL: THF tratada com o sobrenadante da cultura de C91/PL.

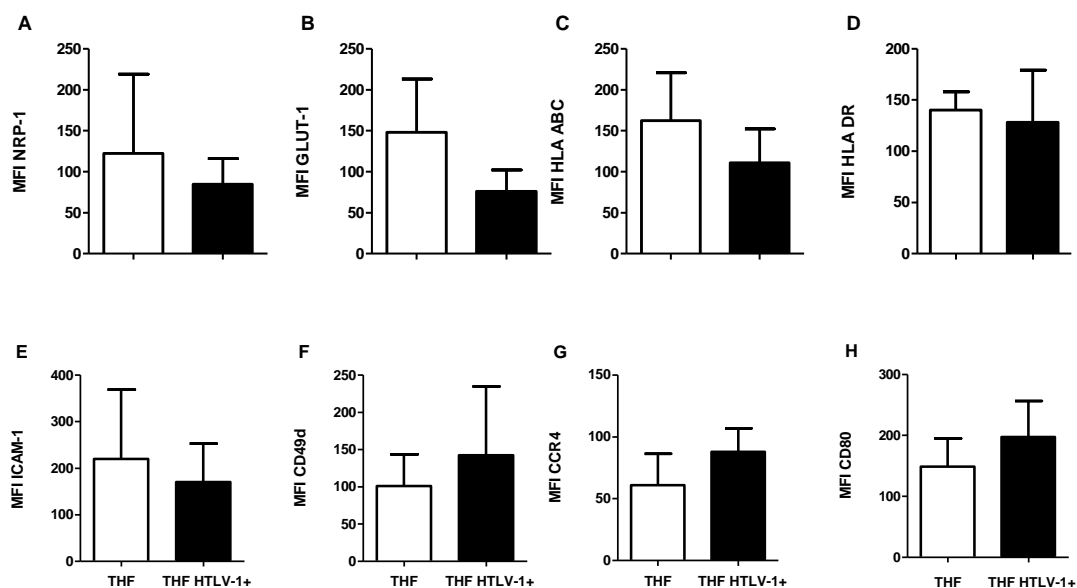
#### **4.7 Expressão de Neuropilina-1 e GLUT-1 não são modulados após infecção na TEC, mas expressão de CCR4 diminui**

Após a análise das modificações na expressão gênica logo após a entrada do vírus na célula epitelial do timo, nos perguntamos se algumas moléculas importantes na própria infecção pelo HTLV-1, e outras envolvidas na função da célula epitelial tímica, estavam alterados após a infecção prolongada pelo HTLV-1. Nós não encontramos alteração na expressão dos receptores para a entrada do vírus, GLUT-1 e NRP-1 nas células infectadas mantidas em cultura analisadas por citometria de

fluxo (figura 4.10A e B e figura 4.11A e B). Também não encontramos qualquer diferença na expressão de HLA de classe I (HLA ABC) e HLA de classe II (HLA DR) (figura 4.10C e D e figura 4.11C e D). Outra molécula importante para a interação entre a célula epitelial tímica e os timócitos, CD80, foi analisada. Não houve qualquer modificação tanto no número de células positivas, quanto na expressão dessa molécula (figura 4.10H e figura 4.11H). Apesar de encontrado aumento na expressão gênica de ICAM-1 logo após o tratamento com o sobrenadante de linfócitos infectados pelo HTLV-1 (C91/PL) (figura 7), o percentual de células positivas para ICAM-1 não foi diferente entre as células não-infectadas e infectadas há pelo menos 10 dias (figura 4.10E). A média de intensidade de fluorescência (MFI) de ICAM-1 também não foi diferente após a infecção (figura 4.11E), sugerindo que apenas houve um aumento transiente na expressão do RNA mensageiro, mas esse aumento não resultou no aumento da expressão da molécula em momento posterior. A expressão de outra molécula importante para a interação entre TEC e timócito, VLA-4 foi verificada pela marcação da cadeia alfa desta, CD49d. Também não houve qualquer diferença no número de células positivas ou na intensidade de fluorescência analisada (figura 4.10F e figura 4.11F). Todavia, encontramos diferença no número de células positivas para CCR4 na cultura infectada. Este fato foi bastante surpreendente já que foi descrito anteriormente que linfócitos CCR4<sup>+</sup> eram atraídos por seu ligante CCL22, cuja expressão era aumentada por Tax, proteína do HTLV-1 [48]. Os autores sugerem que a liberação e CCL22 por células infectadas e expressão de CCR4 nos linfócitos levaria a uma infecção preferencial destas células. O motivo da diminuição do percentual de células CCR4 positivas na cultura ainda precisa ser elucidado. Vale ressaltar que a intensidade de fluorescência dos CCR4 não foi diferente (figura 4.11H).



**Figura 4.10: Percentual de células epiteliais do timo CCR4<sup>+</sup> diminui após infecção pelo HTLV-1.** **A)** Percentual de TEC Neuropilina-1<sup>+</sup>. **B)** Percentual de TEC GLUT-1<sup>+</sup>. **C)** Percentual de TEC HLA ABC<sup>+</sup>. **D)** Percentual de TEC HLA DR<sup>+</sup>. **E)** Percentual de TEC ICAM-1<sup>+</sup>. **F)** Percentual de TEC CD49d<sup>+</sup>. **G)** Percentual de células CCR4<sup>+</sup> é menor na cultura infectada por HTLV-1 depois de pelo menos 10 dias de cultivo. **H)** Percentual de TEC CD80<sup>+</sup>. Os experimentos das células não-infectadas e infectadas foram realizados no mesmo dia, com o mesmo tempo após o descongelamento das células. Representativos de pelo menos 3 experimentos independentes. \*p<0,05.



**Figura 4.11: Expressão de moléculas de superfície analisadas não foi modificada após infecção pelo HTLV-1. A) Neuropilina-1<sup>+</sup>. B) GLUT-1<sup>+</sup>. C) HLA ABC<sup>+</sup>. D) HLA DR<sup>+</sup>. E) ICAM-1<sup>+</sup>. F) CD49d<sup>+</sup>. G) CCR4<sup>+</sup>. H) CD80<sup>+</sup>.** Os experimentos das células não-infectadas e infectadas foram realizados no mesmo dia, com o mesmo tempo após o descongelamento das células. Representativos de pelo menos 3 experimentos independentes. MFI: intensidade média de fluorescência.

#### **4.8 Linfócitos T CD4<sup>+</sup> de cultura primária são atraídos por células epiteliais tímicas in vitro**

A presença do HTLV-1 no timo suscitou a ideia de que a migração de linfócitos T CD4<sup>+</sup> maduros, infectados pelo HTLV-1, de volta ao timo, num processo conhecido como recirculação, seria capaz de levar esse vírus ao órgão e infectar as células do estroma tímico, principalmente as células epiteliais do timo. A infecção através de partículas livres no plasma sanguíneo parece improvável porque até hoje não foram detectadas na circulação. A detecção do vírus acontece nos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, majoritariamente, e os indivíduos infectados têm anticorpos contra proteínas virais no soro [20], [21], [40], [87], [94]. Como vimos no presente estudo, as células epiteliais do timo podem ser infectadas tanto por contato com linfócitos T maduros HTLV-1<sup>+</sup> e pelo sobrenadante de uma das linhagens infectadas. Sobretudo, tendo em vista os resultados de expressão gênica que mostraram maior expressão de genes de

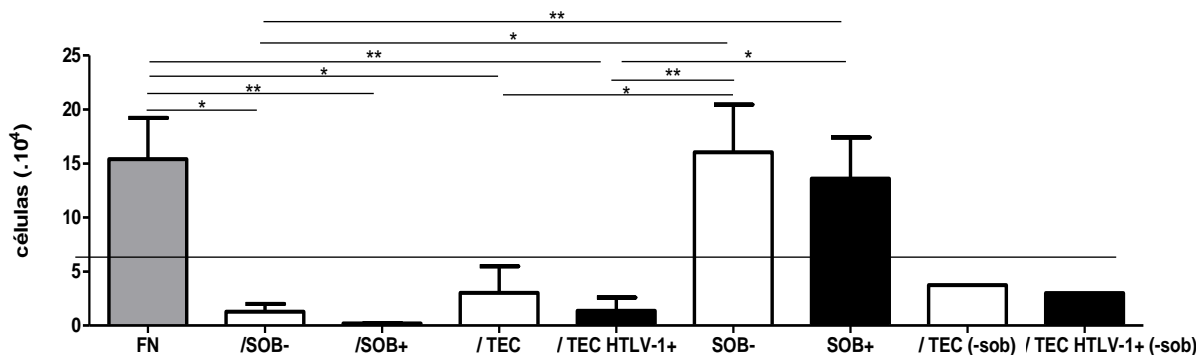
quimiocinas buscamos avaliar se a TEC infectada seria capaz de atrair um maior número de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, principal alvo do HTLV-1. Para isso usamos duas estratégias: a migração da linhagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> que utilizamos até agora, CEM e também células mononucleares de sangue periférico frescas, de indivíduos saudáveis, sem qualquer manipulação além da separação do sangue total (ver Material e Métodos).

Primeiro, observaremos a migração de linhagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, CEM, frente à diferentes estímulos da célula epitelial infectada comparando com a não-infectada pelo HTLV-1. Nestes experimentos utilizamos um poço apenas com BSA na membrana como controle negativo de migração porque o BSA foi usado para cobrir a membrana de todos os poços, exceto aquele com fibronectina. O resultado desse controle negativo está ilustrado como uma linha na figura 4.11. Através dessa linha podemos perceber que não importou se havia células epiteliais ou apenas sobrenadante na câmara inferior, que a migração dos linfócitos foi menor do que nesse controle negativo. Mais ainda, mesmo que não significativo, em todos os casos parecia haver uma migração menor quando a TEC estava infectada pelo HTLV-1. Quando só havia sobrenadante de cultura na câmara inferior (poços /SOB - e SOB +) o número de células que migraram foi muito baixo. Quando havia TEC com seu próprio sobrenadante na câmara inferior, a migração foi maior do que quando havia somente sobrenadante, mas ainda assim, abaixo do número de células do controle negativo (somente BSA e meio de cultivo).

Buscando entender se havia um fator de repulsão no sobrenadante da cultura de TEC, fizemos um poço onde o sobrenadante foi colocado na câmara superior, junto com os linfócitos (poços "SOB -" e "SOB +", sendo o símbolo "-" indicando que se tratava da ausência do HTLV-1 e "+" da presença deste vírus). Corroborando com a hipótese de quimiorrepulsão, os linfócitos migraram mais do que o controle negativo, indo contra o gradiente de concentração do sobrenadante, sem haver diferença se o sobrenadante era proveniente da cultura infectada ou não pelo HTLV-1. O valor dessa migração foi equivalente a migração frente a um estímulo sabidamente positivo, a fibronectina, proteína de matriz extracelular abundante no timo, ligante de VLA-4 e VLA-5. Os sobrenadantes utilizados nestes experimentos provinham de uma cultura de 48 horas após a troca do meio. Parecia evidente que um fator solúvel poderia ser o responsável por esse fenômeno, então fizemos um outro grupo, onde as TEC eram mantidas na câmara inferior, porém seu sobrenadante era retirado logo antes da migração e substituído por meio de cultivo. Nesses poços a migração de CEM também



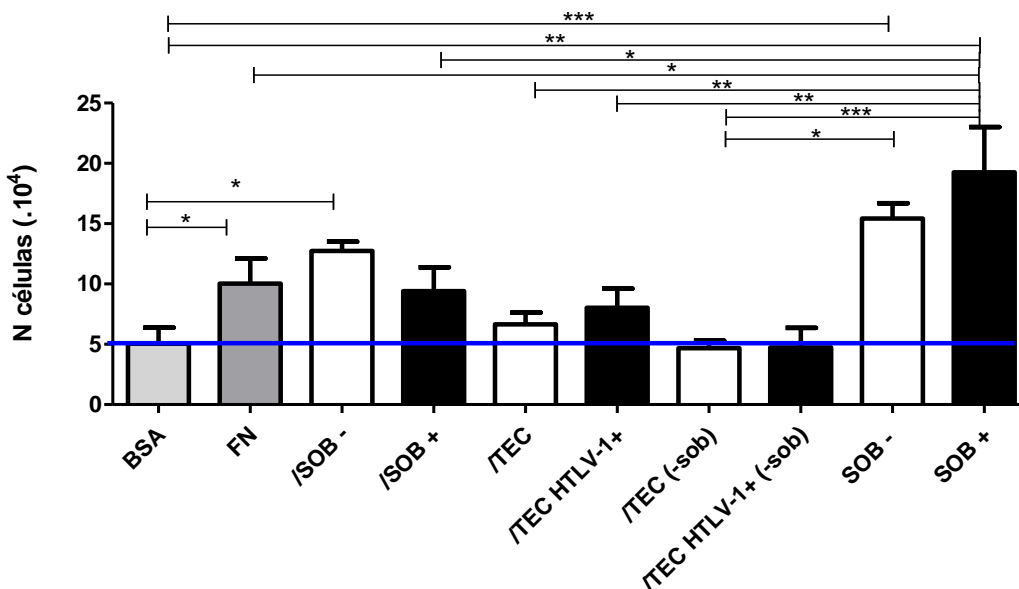
ficou abaixo do controle negativo, mas ainda não podemos descartar que um fator solúvel seja o responsável, porque as células tiveram 20 horas para migrar e nesse período pode ter sido secretado algum fator repulsivo no sobrenadante (figura 4.12 poços /TEC (-sob) e TEC HTLV-1+ (-sob)).



**Figura 4.12: Migração de linhagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, CEM, frente à diferentes estímulos de TEC.** Quinhentas mil CEM foram colocadas na câmara superior da Transwell para este ensaio de migração vertical durante 20 horas. FN: fibronectina. /SOB -: sobrenadante de cultura de TEC no poço inferior. /SOB +: sobrenadante de cultura de TEC HTLV-1+ no poço inferior. /TEC: células epiteliais do timo não-infectadas por HTLV-1 no poço inferior contendo seu sobrenadante. /TEC HTLV-1+: células epiteliais do timo infectadas com HTLV-1 no poço inferior contendo seu sobrenadante. SOB -: sobrenadante de cultura de TEC não-infectada colocado no poço superior junto com os linfócitos. SOB +: sobrenadante de cultura de TEC HTLV-1+ colocado no poço superior junto com os linfócitos. /TEC (-sob): TEC no poço inferior, mas retirado o sobrenadante no momento do início do experimento. /TEC HTLV-1+ (-sob): TEC HTLV-1+ no poço inferior, mas retirado o sobrenadante no momento do início do experimento. O gráfico é representativo de 4 experimentos para todos os poços, exceto as duas últimas colunas, que são apenas 1 experimento. O teste estatístico não foi aplicado nesses grupos. \*p<0,05. \*\*p<0,01.

Visando uma melhor forma de experimentação que refletisse o que ocorre *in vivo* repetimos o experimento de migração utilizando células mononucleares de sangue periférico de doadores saudáveis. Para nossa surpresa, o resultado foi bastante diferente do anterior. Primeiro, a migração total das células foi relativamente maior do que no controle negativo (poço com BSA), sendo esta diferença significativa quando o sobrenadante foi colocado junto com os linfócitos na câmara superior. Inclusive, a migração celular na presença do sobrenadante das TEC HTLV-1<sup>+</sup> foi maior do que frente à fibronectina. Somado a isso, a diferença entre o sobrenadante estar na

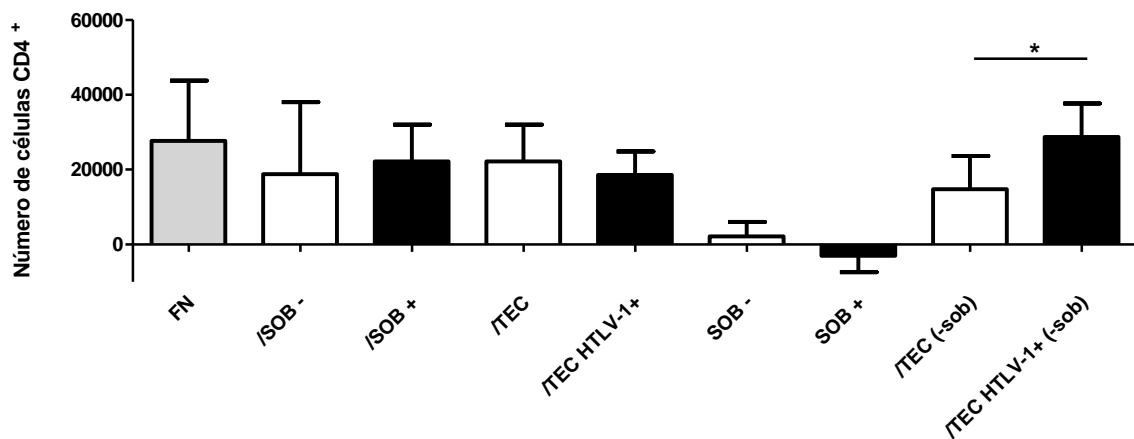
câmara inferior e na câmara superior é significativa. Esses resultados novamente sugerem que as células migram contra o gradiente de concentração de algum fator solúvel (figura 4.13). Em nenhum dos casos, utilizando linhagem ou células frescas, foram observadas diferenças significativas entre a migração frente a TEC infectada ou não-infectada nas mesmas condições.



**Figura 4.13: Migração de células mononucleares de doadores saudáveis frente à diferentes estímulos de TEC.** Um milhão de células mononucleares de sangue periférico foram colocadas na câmara superior da Transwell para este ensaio de migração vertical durante 20 horas. FN: fibronectina. /SOB -: sobrenadante de cultura de TEC no poço inferior. /SOB +: sobrenadante de cultura de TEC HTLV-1+ no poço inferior. /TEC: células epiteliais do timo não-infectadas por HTLV-1 no poço inferior contendo seu sobrenadante. /TEC HTLV-1+: células epiteliais do timo infectadas com HTLV-1 no poço inferior contendo seu sobrenadante. SOB -: sobrenadante de cultura de TEC não-infectada colocado no poço superior junto com os linfócitos. SOB +: sobrenadante de cultura de TEC HTLV-1+ colocado no poço superior junto com os linfócitos. /TEC (-sob): TEC no poço inferior, mas retirado o sobrenadante no momento do início do experimento. /TEC HTLV-1+ (-sob): TEC HTLV-1+ no poço inferior, mas retirado o sobrenadante no momento do início do experimento. O gráfico é representativo de 3 experimentos para todos os poços, exceto as duas últimas colunas, que são apenas 1 experimento. \* $p < 0,05$ . \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

Após os ensaios de migração com célula mononuclear de sangue periférico, o número de células que migraram foi contado e as células marcadas com anticorpos monoclonais e analisados em citometria de fluxo, conforme descrito em Materiais e

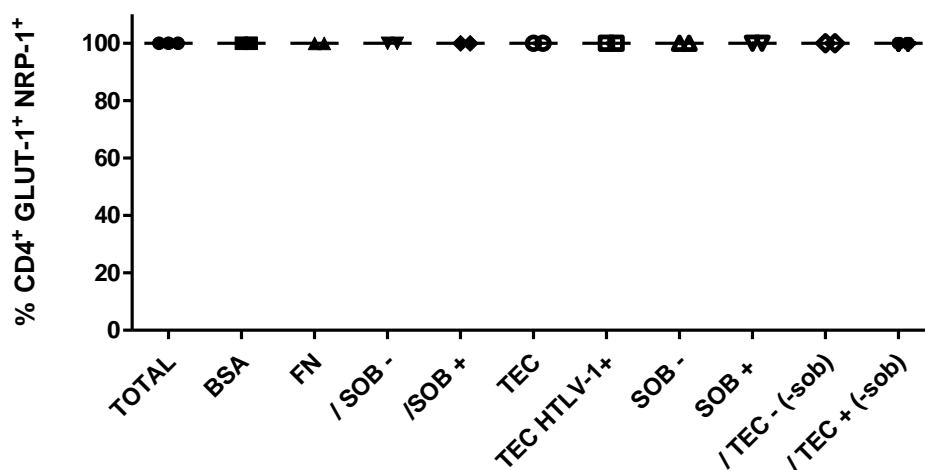
Métodos. O número absoluto de linfócitos T CD4<sup>+</sup> que migraram frente aos diferentes estímulos foi maior do que no BSA, exceto quando o sobrenadante da cultura de TEC HTLV-1+ foi colocado junto com os linfócitos (figura 4.14). Nesse caso, parece que o sobrenadante manteve os linfócitos na câmara superior do inserto e que a repulsão observada na linhagem CEM, não havia mais. Provavelmente, a CEM tem algum receptor que não está presente nos linfócitos T de sangue periférico saudáveis ou então, os linfócitos T CD4<sup>+</sup> tem algum receptor para um fator solúvel que aumenta sua migração, mesmo na presença de um fator inibitório. A soma dos fatores inibitórios e indutores presentes no sobrenadante é diferente para essas células. O valor das linhagens celulares imortalizadas é inestimável, mas nesse caso é muito diferente dos linfócitos de sangue periférico frescos. O número de células CD4<sup>+</sup> que migraram de forma específica frente a TEC HTLV-1+ foi maior do que frente a célula não-infectada. Este fato só ocorreu quando o sobrenadante da cultura foi retirado no momento da migração. Parece que o fator solúvel que inibia a migração foi diminuído após a retirada do sobrenadante. Esses resultados sugerem que o tempo de cultivo influencia na concentração de diversos fatores solúveis que induzem ou inibem a migração e a soma deles influencia o comportamento dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>.



**Figura 4.14: Maior migração de linfócitos T CD4<sup>+</sup> de doadores saudáveis frente à TEC HTLV-1<sup>+</sup> sem a presença do sobrenadante.** Após a contagem do número de células que migraram, as células CD4<sup>+</sup> foram marcadas com anticorpos anti-CD4 e adquiridas em citômetro de fluxo. Após a análise, foi calculado o número absoluto de células CD4<sup>+</sup> após a migração em todos os poços. Considerando que a migração frente à BSA é inespecífica e que essa molécula seja neutra, nós calculamos o número de células CD4<sup>+</sup> que migraram de forma específica ao estímulo, descontando do número absoluto de células CD4<sup>+</sup> de cada tratamento do número absoluto de células CD4<sup>+</sup> que migraram frente ao BSA. Este é o valor que está descrito no eixo y do gráfico acima. FN: fibronectina. /SOB -: sobrenadante de cultura de TEC no poço inferior. /SOB +: sobrenadante de cultura de TEC HTLV-1+ no poço inferior. /TEC: células epiteliais do timo não-infectadas por HTLV-1 no poço inferior contendo seu sobrenadante. /TEC HTLV-1+: células epiteliais do timo infectadas com HTLV-1 no poço inferior contendo seu sobrenadante. SOB -: sobrenadante de cultura de TEC não-infectada colocado no poço superior junto com os linfócitos. SOB +: sobrenadante de cultura de TEC HTLV-1+ colocado no poço superior junto com os linfócitos. /TEC (-sob): TEC no poço inferior, mas retirado o sobrenadante no momento do início do experimento. /TEC HTLV-1+ (-sob): TEC HTLV-1+ no poço inferior, mas retirado o sobrenadante no momento do início do experimento. O gráfico é representativo de 3 experimentos para todos os poços, exceto as duas últimas colunas, que são apenas 1 experimento. \*p<0,05.

A migração celular é direcionada por um gradiente de citocinas, quimiocinas e outros fatores solúveis, além de moléculas de adesão na membrana celular ou o somatório desses fatores combinados. Os receptores de quimiocinas são essenciais para a migração, assim como moléculas de adesão celular, integrinas e selectinas. Mesmo que os linfócitos T CD4<sup>+</sup> sejam atraídos pelas células epiteliais infectadas

dentro do timo, a expressão de GLUT-1 e NRP-1 é essencial para o sucesso da infecção. Avaliamos a co-expressão dos receptores GLUT-1 e NRP-1 nos linfócitos CD4<sup>+</sup> antes e após a migração. Na figura 4.15 podemos observar que praticamente 100% dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> dos 3 indivíduos analisados eram NRP-1<sup>+</sup>/GLUT-1<sup>+</sup> antes e após a migração frente aos diferentes estímulos. Então uma vez migrando até a célula epitelial infectada, eles são alvo em potencial para a transmissão viral, como veremos a seguir.

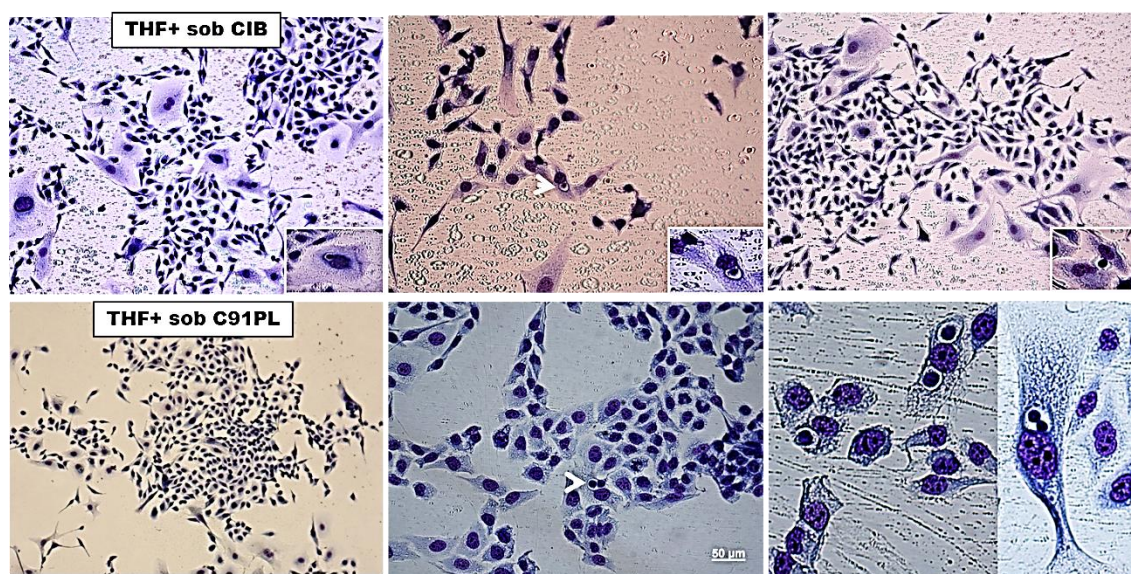


**Figura 4.15. Expressão concomitante de NRP-1 e GLUT-1 em linfócitos T CD4<sup>+</sup> antes e após a migração se mantém.** As células mononucleares de sangue periférico foram marcadas com anticorpos monoclonais para detecção por citometria de fluxo antes e após a migração. A expressão de NRP-1 e GLUT-1 nos linfócitos CD4<sup>+</sup> foi mantida após a migração frente aos diferentes estímulos.

#### 4.9 Células epiteliais tímicas HTLV-1<sup>+</sup> são capazes de infectar linfócitos T

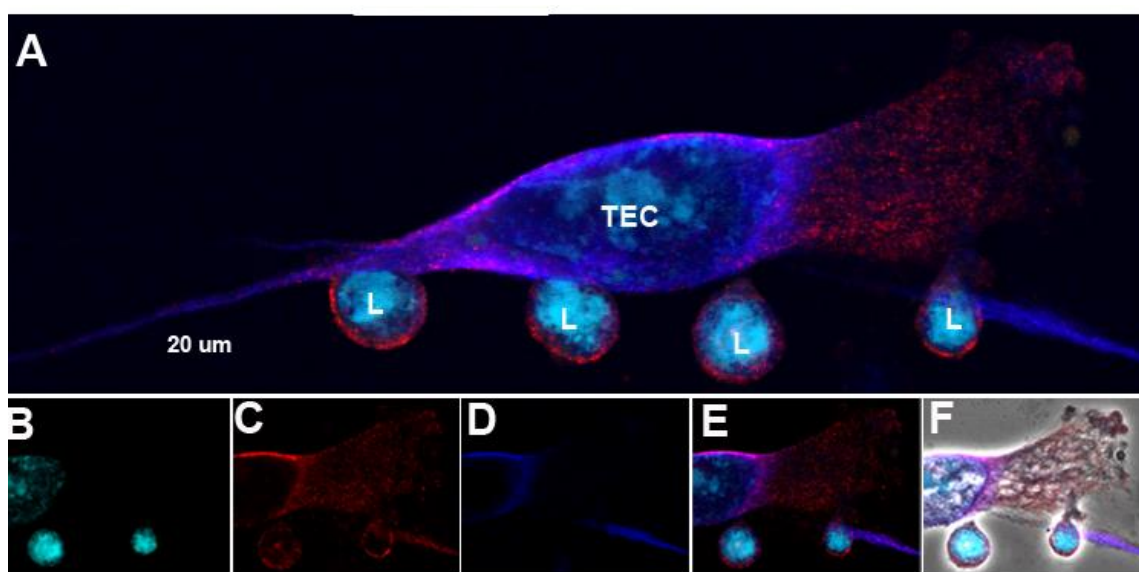
No conjunto dos resultados demonstrados até agora, vimos que as células epiteliais do timo têm os receptores necessários para a entrada do HTLV-1, de fato são infectadas, ocorre modulação da expressão gênica e do receptor CCR4 na membrana, além da infecção exercer influência sobre a atração de linfócitos T CD4<sup>+</sup> para as células infectadas. Resta-nos saber se uma vez infectada, a TEC é capaz de transmitir o HTLV-1 para linfócitos T CD4<sup>+</sup>.

Em experimentos de co-cultivo entre linfócitos T CD4<sup>+</sup> HTLV-1<sup>+</sup> e diversos tipos celulares, é comum a formação de sincícios *in vitro* [29], [41], [44], [54], [55], [57], [79]. Inclusive, nosso grupo já observou anteriormente essa formação quando co-cultivou C91/PL e TEC [79], mas não se a TEC uma vez infectada formaria sincício com linfócitos T não infectados. A figura 4.16 mostra que a TEC tratada tanto com o sobrenadante de CIB quanto de C91/PL forma sincício com linfócitos T CD4<sup>+</sup> não infectados da linhagem CEM após 24 horas de co-cultivo. Entretanto, não foi observada a formação de sincícios entre as células epiteliais do timo.



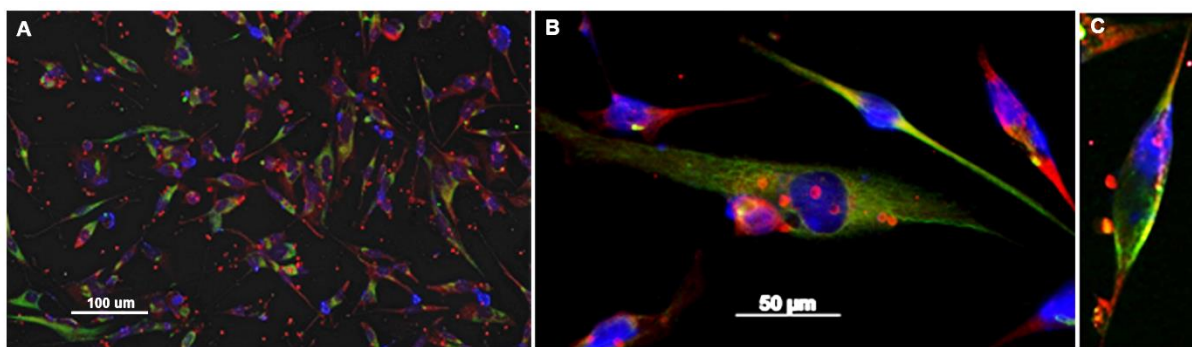
**Figura 4.16: Formação de sincício entre as células epiteliais tímicas tratadas com os sobrenadantes de CIB e C91/PL após co-cultivo com CEM.** Células epiteliais do timo da linhagem THF tratada por 1 hora e 30 minutos com o sobrenadante de CIB ou C91/PL foram co-cultivadas com CEM por 24 horas. As lâminas foram fixadas, coradas e observadas em microscópio óptico. É possível visualizar linfócitos (CEM) dentro de estruturas como vesículas no citoplasma das TEC. Não houve formação de sincício entre TEC. Fotografias representativas de 4 experimentos independentes.

A formação de sincício frequentemente observada *in vitro* ainda não foi vista *in vivo* em diversos tipos celulares. Entretanto, no córtex do timo existe um complexo de células chamadas células “Nurse” tímicas (TNC) que parecem formar estruturas como as observadas em nossa cultura durante o processo de maturação dos timócitos *in vitro* e *in vivo* [6], [85]. Ainda que seja apenas uma semelhança visual, o contato íntimo entre os linfócitos T e as TEC aumentam a possibilidade da transmissão do HTLV-1. Para confirmar se ocorre a transmissão viral, fizemos o co-cultivo novamente e marcamos a proteína viral P19 (p19) (figura 4.17).



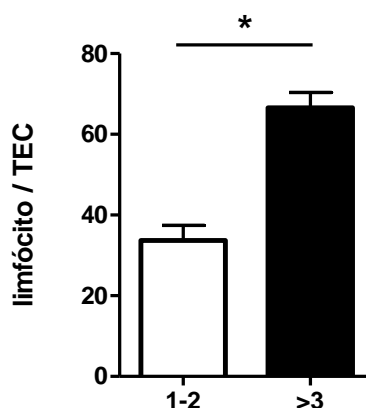
**Figura 4.17: Células epiteliais tímicas transmitem HTLV-1 para linfócitos T CD4<sup>+</sup> *in vitro*.** **A)** Após 48 horas de co-cultura é evidente a marcação da proteína viral P19 (p19) do HTLV-1 nos linfócitos T da linhagem CEM. Em roxo, citoqueratina, em vermelho, P19 e em azul, núcleo. **B - D)** mesma célula de A mostrando cada marcador separadamente. **B)** DAPI. **C)** P19. **D)** citoqueratina. **E)** sobreposição dos marcadores. **F)** sobreposição dos marcadores com o contraste de fase evidenciando o contorno das células. Representativo de 3 experimentos independentes.

A infecção de linfócitos T de linhagem foi evidente após 48 horas de co-cultura, mas para nos aproximarmos dos eventos que acontecem *in vivo*, repetimos o experimentos com linfócitos T CD4<sup>+</sup> purificados de sangue periférico. Após 48 horas de co-cultivo, virtualmente todas os linfócitos da cultura estavam infectados pelo HTLV-1 através do contato célula-célula com a TEC. Inclusive a marcação da proteína viral P19, mostrada em vermelho na figura 4.18, é muito mais intensa nos linfócitos T CD4<sup>+</sup>.



**Figura 4.18: Células epiteliais do timo infectadas pelo HTLV-1 são capazes de transmitir a infecção para linfócitos T CD4<sup>+</sup> de sangue periférico. A)** fotografia mostrando o aspecto geral da co-cultura entre linfócitos T CD4<sup>+</sup> e TEC HTLV-1<sup>+</sup>. **B)** em maior aumento, o detalhe de uma TEC com vários linfócitos aparentemente aderidos sobre ela. **C)** Outro detalhe de TEC com linfócitos T CD4<sup>+</sup> aderidos na lateral. Em verde, citoqueratina, em vermelho P19, em azul núcleo. Fotografias representativas de 3 experimentos.

Observando a cultura, também ficou evidente o grande número de linfócito T aderidos nas TEC infectadas pelo HTLV-1. Nós fizemos a quantificação do número de linfócitos T CD4<sup>+</sup> aderidos a cada TEC na cultura através das imagens de imunofluorescência. É possível ver que por volta de 70% das TEC tinham mais de 3 linfócitos aderidos, sendo que esse número chegou a 10 linfócitos T por TEC (figura 4.19). Esse número de linfócitos aderidos em cada TEC representa uma adesão específica e provavelmente prolongada. Esses devem ter sido fatores cruciais para tamanho sucesso na infecção dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> de sangue periférico, já que o HTLV-1 é transmitido preferencialmente via contato célula-célula.



**Figura 4.19: Mais de 70% das TEC apresentaram mais de três linfócitos aderidos a sua membrana.** Foram quantificados a quantidade de linfócitos aderidos por TEC e as TEC sem linfócitos aderidos não estão sendo representadas neste gráfico. Foram contadas fotografias de três experimentos independentes.

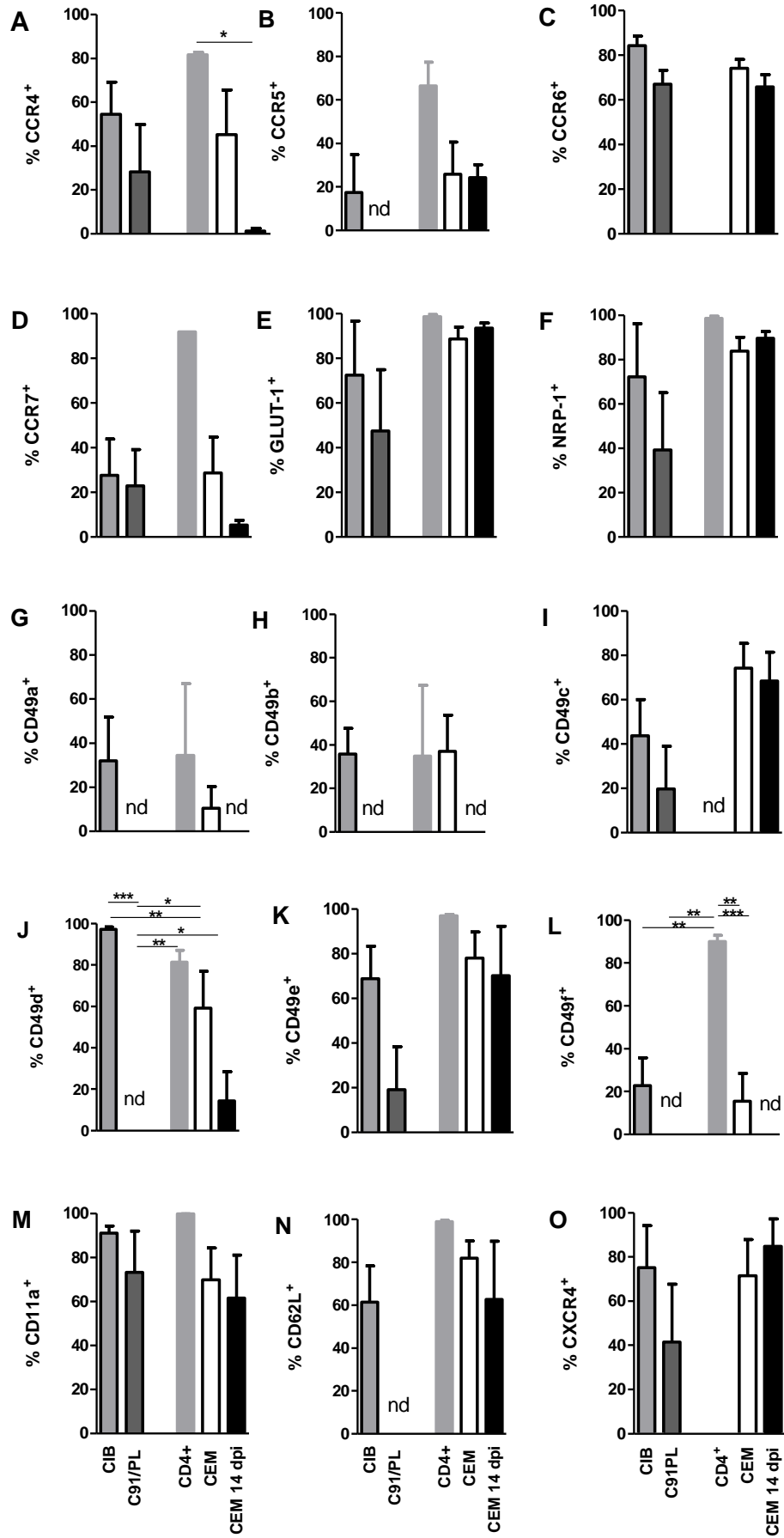


#### **4.10 Não há modulação de receptores de entrada do vírus e quimiocinas em linhagens de linfócitos T após infecção por HTLV-1**

Na busca por melhor compreender os fenômenos apresentamos, marcamos os linfócitos T CD4<sup>+</sup> de sangue periférico, da CEM antes e após 14 dias de infecção pelo HTLV-1 e as células provenientes de pacientes HTLV-1, CIB e C91/PL, para os receptores de entrada do vírus, receptores de quimiocinas e moléculas de adesão sabidamente envolvidas na migração dessas células pelo timo e outros órgãos linfoides (figura 4.20). Apenas a expressão de dois receptores do tipo integrina, VLA-4 (CD29/CD49d) e VLA-6 (CD29/CD49f) foi diferente entre as células analisadas. CIB e linfócitos T de sangue periférico tem o mesmo percentual de células positivas para VLA-4, enquanto C91/PL não expressa. A linhagem CEM expressa VLA-4, mas o número de células positivas após a infecção tende a diminuir, mas ainda não de forma significativa. A expressão de outros receptores do tipo integrina também tende a ser diferente entre as linhagens provenientes de pacientes, CIB e C91/PL (figura 4.20, G, H, I, L). C91/PL também não expressa as integrinas VLA-1, VLA-2, VLA-3 e VLA-6, apenas algumas células positivas para VLA-5 (figura 4.20 K). Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> de sangue periférico expressam VLA-4, mas o número de células positivas nas linhagens é bem menor (figura 4.20 L). Outra molécula envolvida em eventos migratórios, CD62L (ou L-selectina), também não foi detectada em C91/PL, enquanto CIB apresentou níveis comparáveis com linfócitos T de sangue e CEM (figura 4.20 N). outra integrina importante para a migração de linfócitos, LFA-1 (CD11a/CD18) foi expressa em todas as populações analisadas, inclusive C91/PL. A expressão dos receptores para entrada do vírus, NRP-1 e GLUT-1, apesar de bastante variável durante o cultivo de C91/PL, é similar nas células avaliadas (figura 4.20 E, F). Quanto aos receptores de quimiocinas, parece que a expressão de CCR4 diminui após infecção da CEM pelo HTLV-1, quando comparada com a mesma linhagem antes da infecção (figura 4.20 A). A expressão de CCR5 não foi detectada em C91/PL, mas sim nas outras linhagens em níveis variáveis. A expressão de CCR6 foi similar nos grupos analisados, com exceção das células de sangue periférico que não foram avaliadas (figura 4.20 C). A expressão de CCR7 foi mais presente nos linfócitos T CD4<sup>+</sup> de sangue periférico do que nas linhagens, possivelmente porque o(s) clone(s) selecionados nas linhagens (figura 4.20 D). Já CXCR4, receptor de 8, importante para a migração direcionada ao timo, visto que células epiteliais do timo são grandes fontes dessa quimiocina, estava expresso por todas as linhagens, mesmo que em níveis variáveis em C91/PL. Vale ressaltar nesta tese que a cultura de C91/PL é extremamente vulnerável a variações

na concentração de CO<sub>2</sub> e alterações no pH do meio de cultivo, podendo essas variações serem ocasionados por pequenas alterações que possam ter ocorrido mesmo com todo os cuidados durante a execução do experimento.

**Figura 4.20. Fenótipo das linhagens infectadas provenientes de pacientes HTLV-1, CIB e C91/PL, de linfócitos T CD4<sup>+</sup> de sangue periférico e de CEM antes e após a infecção pelo HTLV-1. A) percentual de células CCR4<sup>+</sup>. B) CCR5 C) CCR6 D) CCR7 E) GLUT-1 F) NRP-1 G) CD49a H) CD49b I) CD49c J) CD49b K) CD49e L) CD49f M) CD11a N) CD62L O) CXCR4. \*p<0,05. \*\*p<0,01. \*\*\*p<0,001. O número de experimentos independentes foi CIB e C91/PL n=4, CEM n=6, CEM 14 dpi n=3, CD4<sup>+</sup> n=3.**



## 5 Discussão

O timo é um órgão alvo de doenças infecciosas [95]. Anteriormente nosso grupo mostrou que o HTLV-1 é capaz de infectar as TEC, que expressam os receptores para a entrada do vírus *in vivo* [51], [54], [55], [79], [85], [96]. No presente trabalho, nós mostramos a expressão dos receptores de entrada do vírus, GLUT-1 e NRP-1 nas TEC também *in vitro*, na linhagem de TEC fetal chamada THF [80] que utilizamos durante todo o estudo. Além da infecção via contato célula-célula, via clássica de infecção pelo HTLV-1, mostramos que o sobrenadante de uma das linhagens de linfócitos T CD4<sup>+</sup> derivada de paciente com ATL, C91/PL [97], continha partículas virais capazes de infectar as TEC *in vitro*. Entretanto, com o sobrenadante da linhagem CIB [81], proveniente de paciente HAM/TSP não foi observado o mesmo efeito. Esse fato foi bastante surpreendente, porque um dos marcadores de prognóstico para a HAM/TSP é a alta carga viral em linfócitos [46], [98], [99]. Todavia, como utilizamos somente essa linhagem de linfócitos T provenientes de paciente HAM/TSP, não podemos assumir que outras linhagens não produzam partículas virais livres capazes de infectar outras células. O primeiro trabalho mostrando a infecção eficiente do HTLV-1 por vírus livre foi publicado em 2008 [45] e utilizou vírus do sobrenadante de células MT-2, também derivadas de células leucêmicas, incubando as células dendríticas durante 3 horas com o vírus e depois observada a cultura para a presença de proteínas virais após 3 dias. Naquele trabalho a concentração viral foi medida e utilizada 100ng de p19 (P19). No nosso trabalho, o contato das TEC com o sobrenadante contendo o vírus foi de apenas 1,5 hora e depois mantidas em cultura por períodos variados. Não avaliamos a concentração viral, mas mantivemos o número de células C91/PL e o tempo de cultivo constantes. Podemos observar que um pequeno número de células foi infectado por vírus livres, aproximadamente 20%. Acreditamos que esse número não é baixo, comparado as descrições na literatura para a capacidade de infecção do HTLV-1 [64]. Inicialmente, apenas um quinto das foram infectadas por vírus livres, mas a infecção se espalha entre as células da cultura rapidamente, chegando a mais de 50% em 48 horas e em 10 dias, 95% da cultura está infectada. O crescente número de células infectadas mostra que o HTLV-1 foi capaz de inserir seu material genético no genoma da TEC e de transcrever as proteínas virais, formando partículas maduras e infectando outras células nos pontos de contato célula-célula. Talvez o número de células infectadas por sobrenadante seja maior, mas não há expressão de proteínas virais suficientes para a detecção por

imunofluorescência em 24 horas. Todavia, em 48 horas, a cultura está contaminada e a expressão das proteínas virais é mais evidente, sendo a intensidade de fluorescência mais forte. Também observamos por imunofluorescência que as proteínas virais P19 se concentram nas extremidades da TEC infectada e formam estruturas como filopódios. As fotografias foram tiradas de cultivos com densidade em torno de 50% para melhor visualização, mas na cultura habitual e no próprio microambiente tímico, as TEC estão em contato com outras em todos os planos, o que facilitaria ainda mais a transmissão viral por contato.

Após a infecção não houve alteração na proliferação das TEC, mas o percentual de células mortas aumentou consideravelmente, chegando a 10%. Apesar de não termos evidências, provavelmente a infecção viral aumenta a morte celular por utilização da maquinaria celular para a produção de proteínas virais, pelo brotamento de partículas, entre outros fatores. Em linfócitos T, a proteína Tax do HTLV-1 induz a ativação de NF- $\kappa$ B via interação com IKK $\gamma$ , resultando na transformação, proliferação e sobrevivência dos linfócitos T [88]. Parece que o mesmo não ocorre nas TEC, mas não temos mais evidências que suportem essa hipótese. Em outras infecções de TEC com vírus do sarampo e HIV, há modificações profundas na diferenciação das TEC, que inclusive induzindo apoptose nos timócitos. A infecção pelo HIV causa dano severo no epitélio tímico [100] e a infecção pelo vírus do sarampo causa aparecimento de células epiteliais com fenótipo cortical na medula e de medula no córtex [101]. Todas essas modificações podem afetar os processos de diferenciação dos timócitos, seleção positiva e negativa, além da tolerância imunológica. Já foi visto que se um antígeno proveniente de patógenos é apresentado no timo, acaba sendo apresentado no mesmo microambiente que induz tolerância e os clones que responderiam àquele antígeno são deletados durante a seleção negativa [102][103]. Dessa forma, podemos imaginar que o controle da infecção é prejudicado nos pacientes com HTLV-1, que uma vez os linfócitos T recirculantes levam o vírus para o timo, as TEC são infectadas e passam a apresentar os antígenos virais como próprios e os clones respondedores seriam deletados. Alguns dados suportam essa hipótese, como o desenvolvimento da HAM/TSP ou ATL por uma resposta citotóxica de linfócitos T CD8<sup>+</sup> insuficiente, ou de qualidade baixa, talvez porque o número de células respondedoras seja insuficiente, já que os clones reativos foram deletados no timo. O fato da infecção demorar tantos anos para se desenvolver também pode ser uma evidência de que o timo esteja selecionando negativamente os clones respondedores. O número de linfócitos recirculantes é pequeno, então o vírus demoraria algum tempo para chegar ao timo.

Uma vez que um linfócito infectado chegue ao timo e que produza partículas virais infectivas o suficiente para transmiti-las às TEC e que o número de TEC infectadas, que não sofreram apoptose por conta da infecção, seja alto o suficiente para produzir um efeito significativo sobre os processos de seleção intratímicos levariam anos para ocorrer. Além disso, os linfócitos infectados *in vivo* têm baixa expressão de proteínas virais e há diversos fatores na periferia que inibem a expressão dessas proteínas e do brotamento da partícula viral, além da própria interação das proteínas celulares e virais que discutiremos mais adiante.

Até hoje, dois grupos se preocuparam em descrever estudos ultraestruturais das TEC, separando-as em 10 grupos morfolologicamente distintos principais. A classificação foi baseada na densidade eletrônica do núcleo e do citoplasma. Os tipos I e II do córtex compartilham diversas características. As TEC do tipo I são as mais abundantes e são formadas por células com muitos vacúolos através do citoplasma. No timo, elas apresentam um variado número de timócitos aderidos, de 1 a quase 100. Esses complexos contêm grandes células, algumas delas com sinais de divisão celular e apoptose. O tipo II é formado por células com o citoplasma mais eletrondenso devido ao grande número de ribossomos e numerosos feixes longos de tonofilamentos. O núcleo dessas células contém vacúolos, que podem ser eletron lucentes ou conter grânulos densos. O tipo III não é frequente e são formados por células individuais que são morfolologicamente distintas dos tipos I e II e estão presentes na medula. A disposição das organelas nessas células é polarizada, sendo o núcleo posicionado num dos polos do citoplasma. Essas células contêm muitas estruturas no citoplasma como mitocôndrias, grânulos eletrondensos, vesículas eletron lúcidas de diversos tamanhos e vacúolos com paredes delgadas. As TEC formam complexos e/ou complexos tipo roseta com os timócitos e também se associam com outros tipos celulares não-linfoides como células dentríticas. Em todas as formas de TEC, o retículo endoplasmático é irregular numa maneira única. Acreditamos que temos células com essas características na nossa cultura de TEC [1]. Acreditamos que nossa cultura contém os tipos I e II de TEC, sendo o tipo I localizado na região subcapsular, formando camadas contínuas abaixo da capsula. O tipo II é mais claro visualmente, localizado no córtex, com predominância na região mais externa do córtex. O tipo III tem o núcleo com formato irregular heterocromático e é localizados no meio do córtex [1]. É difícil distinguir as células corticais e medulares após sua remoção do timo.

Através das microfotografias de microscopia eletrônica de transmissão, observamos grandes vesículas contendo material circular eletrondenso nas células infectadas. Não podemos afirmar que são partículas virais em processo de formação ou de alguma forma acúmulo, porque não fizemos qualquer tipo de marcação com anticorpos. Em outras vesículas nestas células infectadas, é possível observar formas circulares com núcleo mais eletrondenso, com formato bastante similar a partículas virais de HTLV-1. Às vezes essas grandes vesículas contendo essas partículas estavam localizadas próximas à membrana plasmática outras vezes não. É possível que a TEC acumule vírus no citoplasma, nestas vesículas como os macrófagos acumulam grandes vesículas contendo HIV-1, sendo esta célula caracterizada como reservatório do HIV-1 [104]. Nos macrófagos essas vesículas são conhecidas como corpos multi-vesiculares (do inglês, "multi-vesicular bodies"). Entretanto, parece que os macrófagos apresentam mais vesículas contendo essas partículas e maior número de partículas dentro de cada vesícula. Algumas dessas vesículas contendo vírus formam estruturas como túneis até a membrana plasmática, onde essas partículas são liberadas. Dentro dos corpos multi-vesiculares estão presentes partículas em brotamento, imaturas e maduras [104]. Nas TEC é evidente que algumas partículas apareceram brotando para o interior de vesículas e também parece que as vesículas contêm partículas virais imaturas, com núcleo pouco eletrondenso e partículas virais maduras, com core viral eletrondenso e esférico. O conjunto desses experimentos, além de mostrar que as TEC são, de fato, infectadas por partículas livres de HTLV-1 presentes no sobrenadante de linfócitos T CD4<sup>+</sup> provenientes de paciente com ATL, também apontam para um segundo mas não menos importante papel da TEC, como reservatório da infecção pelo HTLV-1.

Tax, proteína transativadora do HTLV-1, capaz de ativar NF- $\kappa$ B e outros genes celulares estão presentes nos sobrenadantes de diversas linhagens infectadas pelo HTLV-1 [68], no soro [88] e no tecido muscular de pacientes com HAM/TSP [105]. A presença de Tax no meio de cultura de mioblastos causa efeito citopático após 24 horas de contato [105]. Os pacientes com HTLV-1, tanto ATL, HAM/TSP e portadores assintomáticos também apresentam títulos elevados de anticorpos anti-Tax no soro, mostrando que essa proteína é expressa pelas células infectadas e é alvo da resposta imune *in vivo* [25], [94]. Como Tax pode gerar efeitos antes que o HTLV-1 infecte a célula alvo, avaliamos a modulação gênica após 1,5 horas de contato com o sobrenadante das linhagens CEM, CIB e C91/PL. Diversas quimiocinas foram diferencialmente expressas, sobretudo CCL2 ou MPC-1, CXCL3 e IL-8 ou CXCL8. O

aumento da expressão de MCP-1 é muito interessante porque recentemente foi publicado um estudo mostrando que essa quimiocina direciona a migração de linfócitos T e B para o timo durante processos inflamatórios ou infecciosos agudos como o tratamento com LPS, infecção por *Candida albicans* e por *Trypanosoma cruzi* em camundongos [106]. Nesse trabalho, os autores mostraram que um grande número de linfócitos ativados migra para o timo e que o MCP-1 é responsável pela infiltração de células da periferia nessas situações [106]. A produção de MCP-1 por TEC após a infecção por HTLV-1 poderia atrair linfócitos T e B maduros da periferia para o timo também em pacientes infectados pelo HTLV-1, potencializando a disseminação da infecção. Em outro estudo, camundongos infectados com *Mycobacterium tuberculosis* ou *M avium* no timo atraíram linfócitos T da periferia para combater a infecção. Nesse caso, os autores encontraram células T CXCR3<sup>+</sup> específicas contra a micobactéria. Também foi visto aumento de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  no timo, além das quimiocinas CXCL9, CXCL10 e CCL4 [107]. Em outro trabalho foi visto que IFN- $\gamma$  é majoritariamente produzido pelos linfócitos T recirculantes [107]. Mesmo que as quimiocinas encontradas nesse último estudo citado sejam diferentes dos outros estudos e do nosso, a migração de linfócitos T e B para o timo parece ser um fenômeno recorrente em casos de infecção e inflamação. Ainda é discutido o número de células que retornam ao timo e a razão para o retorno [95][108]. Os linfócitos T que reentram no timo o fazem pela vênulas pós-capilares na junção córtex-medular e persistem na medula, com poucos relatos no córtex [103]. Alguns autores sugerem que o timo e a medula óssea seriam repositórios de células de memória, mantendo-as num ambiente com citocinas, mantendo a proliferação homeostática e/ou participando da seleção negativa [103].

Sobre a expressão aumentada de ICAM-1 já foi vista em linfócitos T infectados pelo HTLV-1. A interação entre ICAM-1 e LFA-1 contribui para a passagem de partículas virais durante a sinapse virológica, já que essas moléculas de adesão prolonga o contato entre as células [53], [64], [109]. A proteína Tax e ICAM-1 agem na via de sinalização da célula T durante a sinapse virológica e induz polarização do centro organizador de microtúbulos para o sítio da sinapse, facilitando a transmissão viral [53]. Num estudo realizado com uma coorte brasileira de pacientes HTLV-1 com dermatite autoimune, foi observado o aumento de CCL2, CCL5, CXCL8 e CXCL10 no plasma em relação aos indivíduos saudáveis e pacientes assintomáticos [110]. O aumento de CCL2 e CXCL8 corroboram com nossos dados, mas não podemos inferir que todo o aumento observado seja pela produção no timo, mas podemos inferir que



o timo pode participar desse evento e na conseqüente atração dos linfócitos T da periferia para o timo.

As TEC tiveram diminuição da expressão gênica de IFN- $\alpha$  até níveis indetectáveis após 10 dias de cultivo. Entretanto, o resultado de 24 horas após a infecção deve ser analisado com cautela. Na figura 3.2 foi mostrado o percentual de TEC HTLV-1<sup>+</sup> após 24 horas, 48 horas e 10 dias do tratamento com o sobrenadante de C91/PL. Após 24 horas, em média, 30 % da cultura de TEC estava expressando a proteína viral P19 (p19). Esse fato torna a análise da expressão gênica difícil, já que nesse período há uma mistura entre células infectadas, em processo de infecção, mas sem expressão significativa de proteínas virais e não-infectadas. Considerando esses fatores, a análise da expressão gênica após 10 dias é mais confiável, pois mais de 90% das células estão expressando proteínas virais na cultura. A expressão de IFN- $\alpha$  diminuiu a níveis indetectáveis e a de IFN- $\beta$  se mantém. O balanço entre a ação das duas proteínas formadas a partir desses genes é que ditará grande parte da resposta da célula a infecção viral. Pois bem, um gene induzido por IFN do tipo I ( $\alpha$  ou  $\beta$ ), a tederina também apresenta diminuição da expressão. Esse resultado demonstra que ambos os IFNs contribuem para a indução da expressão desse gene. Alguns autores sugerem que IFN- $\alpha$  seja mais importante no controle da infecção viral, visto que quando bloqueado, a infecção viral aumenta de forma significativa, enquanto o efeito é parcial quando IFN- $\beta$  é bloqueado [65]. Já a expressão de tederina, normalmente aumentada após infecção viral via IFN tipo I [72], [73], apareceu diminuída na infecção pelo HTLV-1 nos nossos experimentos. Esse resultado é bastante interessante porque a expressão de IFN- $\alpha$  diminuiu, a expressão de tederina também diminuiu, logo não seria necessária uma proteína tipo Vpu do HIV-1 para evadir do efeito da tederina, já que parece haver algum mecanismo ainda desconhecido do HTLV-1 que diminuiu tanto IFN- $\alpha$  quanto tederina. Outros autores já observaram a co-localização de HTLV-1 e tederina, apontando que esta seria um importante fator de restrição do brotamento de partículas virais e a explicação da incapacidade do HTLV-1 de infectar via vírus livres [27], [61]. Entretanto, a quantificação da expressão de tederina nunca havia sido feita. Talvez esses resultados se explicam porque nós usamos células epiteliais do timo, não-linfóides, e os demais resultados são em células linfóides. Todavia, o papel do estroma parece ser importante para a resposta imune durante a infecção pelo HTLV-1 [65]. Os resultados do tratamento com IFN- $\alpha$  e zidovudina (AZT) nos pacientes parecem ser melhores do que os resultados *in vitro* tratando-se somente os linfócitos T, sinalizando que há outros componentes envolvidos na regulação da resposta

antiviral [68], sendo um deles a modulação da resposta das células T após o tratamento das células estromais com IFN- $\alpha$  [65].

A neuropilina-1 (NRP-1) e o GLUT-1 são expressos pelas TEC no timo mesmo na ausência de patologias. A expressão de NRP-1 e GLUT-1 não foi alterada após a infecção pelo HTLV-1 nas TEC. A expressão de HLA DR também não foi significativamente aumentada após a infecção. O percentual de células com expressão de ICAM-1 não foi modificado após a infecção, mas já era alto, em torno de 80% antes da infecção. CD80, uma molécula coestimulatória também não foi diferente após a infecção. Somente o percentual de células CCR4<sup>+</sup> foi diminuído. Outros autores mostraram que as células T CCR4<sup>+</sup> eram preferencialmente infectadas pelo HTLV-1, mas que isso se deve, pelo menos em parte, a atração dessas células pela quimiocina CCL22, induzida por Tax nas células infectadas. Nós não observamos o aumento da expressão de CCL22 nas TEC, nem foi observado esse aumento no plasma dos pacientes [48]. Ainda não se sabemos porque o percentual de células CCR4<sup>+</sup> foi menor após a infecção.

Buscando evidências da atração dos linfócitos T para o timo, após a infecção pelo HTLV-1, fizemos ensaios de migração *in vitro* nos quais utilizamos albumina como controle negativo de migração e fibronectina como controle positivo, pois já sabíamos que esta molécula de matriz extracelular induz migração em linfócitos T através de dados do próprio laboratório. Quando comparamos a migração induzida pelo sobrenadante das TEC e pelas TEC com e sem seu próprio sobrenadante, vimos que a migração foi menor do que o controle negativo, apontando para uma quimiorrepulsão dos linfócitos T de linhagem (CEM) frente a TEC. Ao contrário, quando adicionamos o sobrenadante infectado ou não junto com os linfócitos T de linhagem na câmara superior, a migração foi igual ao controle positivo, corroborando com a hipótese de quimiorrepulsão dos linfócitos T pelas TEC. Vários fatores são responsáveis pela migração dos timócitos no timo [6], mas não são conhecidos fatores que induzam a migração de linfócitos T para o timo, com exceção do CXCR3 presente nos linfócitos T [107]. Como as células T de linhagem podem ter um padrão de expressão de receptores diferente daquelas não oncogênicas, repetimos o experimento de migração com células mononucleares provenientes de doadores saudáveis. O padrão de migração do número total de células foi diferente daquele observado na linhagem com todos os grupos com migração igual ou maior do que o controle negativo. A migração foi significativamente maior quando o sobrenadante não-infectado estava na câmara inferior, mas não quando esse era o sobrenadante

proveniente das TEC infectadas. Ao contrário, quando o sobrenadante acumulado por 48 horas estava na câmara superior, junto com os linfócitos, a migração foi maior, mas sem diferenças significativas em relação ao sobrenadante da TEC não-infectada. Parece que o sobrenadante de 48 horas tem algum fator que inibe a migração das células mononucleares, tanto quanto da linhagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Como utilizamos células mononucleares fizemos uma marcação para CD4<sup>+</sup> nas células após a migração e o padrão da migração dessa população foi bastante diferente. Quando o sobrenadante foi colocado na câmara superior, o número de células que migraram foi muito baixo, sobretudo no poço com sobrenadante proveniente das TEC infectadas foi menor do que o controle negativo com albumina. Nos outros poços a migração foi similar ao controle positivo, fibronectina e entre si, com exceção da maior migração frente à TEC infectada sem o sobrenadante acumulado. Esse resultado foi surpreendente, porque mostrou que as TEC infectadas atraem os linfócitos T CD4<sup>+</sup> de forma seletiva. Ao mesmo tempo, apontou novamente para algum fator presente no sobrenadante que contribua para a repulsão dos linfócitos T e das outras células. Acreditamos que esse fator possa ser a semaforina-3A que é secretada pelas TEC no timo e é responsável pela saída de linfócitos T maduros para a periferia [6]. A quimiorrepulsão por semaforina-3A é mediada pela NRP-1. A NRP-1 é aumentada em linfócitos T após a ativação do TCR ou após adesão a TEC. A semaforina-3A diminui a capacidade de adesão dos timócitos e induz a migração deles contra o gradiente de concentração [85], mecanismo que parece estar operando nos nossos experimentos de migração *in vitro*. Ainda sobre os experimentos de migração, a coexpressão dos receptores de entrada viral, NRP-1 e GLUT-1 em linfócitos T CD4<sup>+</sup> estão presentes em todas as células antes e após a migração, independente do estímulo.

Um evento frequentemente reportado em estudos *in vitro*, a formação de sincício por células infectadas com HTLV-1 também foi observado em nossos experimentos. Em nossas mãos, os linfócitos T não formavam sincícios com outros linfócitos T, nem as TEC infectadas entre si. Porém, quando os linfócitos T infectados ficavam em contato com as TEC, havia formação de sincício em menos de 24 horas. Quando as TEC foram previamente infectadas com vírus livres e posteriormente co-cultivadas com linfócitos T não infectados, também havia formação de sincício. A transmissão viral das TEC para os linfócitos T tanto de linhagem quanto linfócitos T CD4<sup>+</sup> provenientes de sangue periférico de doadores saudáveis, ativados com PHA por 48 horas, ocorreu bastante rápido. Após 24 horas de co-cultivo, a marcação de proteínas virais nos linfócitos T CD4<sup>+</sup> foi muito evidente, sobretudo nas células frescas. A

intensidade de fluorescência era muito maior nos linfócitos T CD4<sup>+</sup> do que nas TEC, dificultando até a captação de uma boa imagem. Mesmo que as TEC sejam infectadas, parece que os linfócitos T CD4<sup>+</sup> são realmente o alvo do vírus, mas a transmissão rápida indica uma rápida disseminação da infecção de um tipo celular para outro. *In vivo*, uma rápida transmissão das TEC para os linfócitos T garantiria que o pouco tempo de contato entre as células seria suficiente e que os linfócitos T maduros infectados migrariam para a periferia e seria disseminadores da infecção nos órgãos linfoides secundários. A expressão de receptores de quimiocinas e de moléculas de adesão nos linfócitos T cronicamente infectadas pelo HTLV-1 e da linhagem de linfócitos após a infecção é bastante diferente daquela dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> não infectados, revelando um possível padrão de circulação diferente após a infecção.

Ao final desta tese apontamos um novo personagem com um importante papel na infecção pelo HTLV-1 e no seu desfecho que contribui para o melhor entendimento da fisiopatologia das doenças associadas ao HTLV-1, num dos órgãos menos explorados por especialistas, o timo e na população negligenciada pelos autores, as células epiteliais tímicas.

## **6. CONCLUSÃO**

Esta tese demonstra que as células epiteliais do timo podem ser infectadas pelo HTLV-1, a infecção modifica a expressão de seus genes, e que a transmissão da infecção para linfócitos T CD4<sup>+</sup>, pode contribuir para o desfecho das patologias associadas ao HTLV-1.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] R. Rezzani, F. Bonomini, and L. F. Rodella, *Histochemical and molecular overview of the thymus as site for T-cells development.*, vol. 43, no. 2. 2008, pp. 73–120.
- [2] C. Silvia, V. Fausto, M. C. Chammas, O. D. C. Saito, M. Ricardo, T. Garcia, A. G. Juliano, C. A. Simões, and G. G. Cerri, “TIMO : CARACTERIZAÇÃO ULTRASONOGRÁFICA \*,” vol. 37, no. 3, pp. 207–210, 2004.
- [3] Y. Takahama, “Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection.,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 6, no. 2, pp. 127–35, Feb. 2006.
- [4] Janeway, Charles A Jr, P. Travers, M. Walport, and M. J. Shlomchik., *Immunobiology: The Immune System in Healthy and Disease. 6th edition.* 2005, pp. 1–823.
- [5] G. Anderson and Y. Takahama, “Thymic epithelial cells: working class heroes for T cell development and repertoire selection.,” *Trends Immunol.*, vol. 33, no. 6, pp. 256–63, Jun. 2012.
- [6] W. Savino, “Intrathymic T cell migration is a multivectorial process under a complex neuroendocrine control.,” *Neuroimmunomodulation*, vol. 17, no. 3, pp. 142–5, Jan. 2010.
- [7] N. L. Alves, Y. Takahama, I. Ohigashi, A. R. Ribeiro, S. Baik, G. Anderson, and W. E. Jenkinson, “Serial progression of cortical and medullary thymic epithelial microenvironments.,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 44, no. 1, pp. 16–22, Jan. 2014.
- [8] M. P. Felli, M. Maroder, T. A. Mitsiadis, A. F. Campese, D. Bellavia, A. Vacca, R. S. Mann, L. Frati, U. Lendahl, A. Gulino, and I. Screpanti, “Expression pattern of Notch1 , 2 and 3 and Jagged1 and 2 in lymphoid and stromal thymus components: distinct ligand – receptor interactions in intrathymic T cell development,” vol. 11, no. 7, pp. 1017–1025, 1999.
- [9] A. Wilson, H. R. Macdonald, and F. Radtke, “Notch 1 – deficient Common Lymphoid Precursors Adopt a B Cell Fate in the Thymus,” *J. Exp. Med.*, vol. 194, no. 7, pp. 1003–1012, 2001.
- [10] J. Hou, P. Wang, L. Lin, X. Liu, and F. Ma, “MicroRNA-146a Feedback Inhibits RIG-I-Dependent Type I IFN Production in Macrophages by Targeting TRAF6, IRAK1, and IRAK2,” 2014.
- [11] D. J. Izon, J. A. Punt, L. Xu, F. G. Karnell, D. Allman, P. S. Myung, N. J. Boerth, J. C. Pui, G. A. Koretzky, and W. S. Pear, “Notch1 Regulates Maturation by Modulating TCR Signal Strength,” *Immunity*, vol. 14, pp. 253–264, 2001.
- [12] A. Punctum, “Thymic epithelial cells use macroautophagy to turn their inside out for CD4 T cell tolerance,” no. June, pp. 931–932, 2013.

- [13] M. Aichinger, C. Wu, J. Nedjic, and L. Klein, "Macroautophagy substrates are loaded onto MHC class II of medullary thymic epithelial cells for central tolerance.," *J. Exp. Med.*, vol. 210, no. 2, pp. 287–300, Feb. 2013.
- [14] J. Nedjic, M. Aichinger, J. Emmerich, N. Mizushima, and L. Klein, "Autophagy in thymic epithelium shapes the T-cell repertoire and is essential for tolerance.," *Nature*, vol. 455, no. 7211, pp. 396–400, Sep. 2008.
- [15] J. a Williams, J. Zhang, H. Jeon, T. Nitta, I. Ohigashi, D. Klug, M. J. Kruhlak, B. Choudhury, S. O. Sharrow, L. Granger, A. Adams, M. a Eckhaus, S. R. Jenkinson, E. R. Richie, R. E. Gress, Y. Takahama, and R. J. Hodes, "Thymic Medullary Epithelium and Thymocyte Self-Tolerance Require Cooperation between CD28-CD80/86 and CD40-CD40L Costimulatory Pathways.," *J. Immunol.*, vol. 192, no. 2, pp. 630–40, Jan. 2014.
- [16] M. Nehls, B. Kyewski, M. Messerle, R. Waldschutz, K. Schoddekopf, A. J. H. Smith, T. Boehmil, S. Higgs, A. Powers, and K. Olson, "Two Genetically Separable Steps in the Differentiation of Thymic Epithelium," vol. 37, no. January, pp. 2–5, 1996.
- [17] M. Irla, J. Guenot, G. Sealy, W. Reith, B. a Imhof, and A. Sergé, "Three-dimensional visualization of the mouse thymus organization in health and immunodeficiency.," *J. Immunol.*, vol. 190, no. 2, pp. 586–96, Jan. 2013.
- [18] M. Irla, L. Guerri, J. Guenot, A. Sergé, O. Lantz, A. Liston, B. a Imhof, E. Palmer, and W. Reith, "Antigen recognition by autoreactive CD4<sup>+</sup> thymocytes drives homeostasis of the thymic medulla.," *PLoS One*, vol. 7, no. 12, p. e52591, Jan. 2012.
- [19] M. Matsumoto, "Contrasting models for the roles of Aire in the differentiation program of epithelial cells in the thymic medulla.," *Eur. J. Immunol.*, vol. 41, no. 1, pp. 12–7, Jan. 2011.
- [20] A. Vahlne, "A historical reflection on the discovery of human retroviruses.," *Retrovirology*, vol. 6, p. 40, Jan. 2009.
- [21] B. J. Poiesz, F. W. Ruscetti, a F. Gazdar, P. a Bunn, J. D. Minna, and R. C. Gallo, "Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 77, no. 12, pp. 7415–9, Dec. 1980.
- [22] B. J. Poiesz, F. W. Ruscetti, J. W. Mier, a M. Woods, and R. C. Gallo, "T-cell lines established from human T-lymphocytic neoplasias by direct response to T-cell growth factor.," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 77, no. 11, pp. 6815–6819, Nov. 1980.
- [23] Y. Hinuma, K. Nagata, M. Hanaoka, M. Nakai, T. Matsumoto, K. I. Kinoshita, S. Shirakawa, and I. Miyoshi, "Adult T-cell leukemia: antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 78, no. 10, pp. 6476–80, Oct. 1981.

- [24] M. T. Pinto, E. S. Rodrigues, T. M. Malta, R. Azevedo, O. M. Takayanagui, V. B. Valente, E. M. A. Ubiali, D. T. Covas, and S. Kashima, "HTLV-1/2 seroprevalence and coinfection rate in Brazilian first-time blood donors: an 11-year follow-up," *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, vol. 54, no. 3, pp. 123–130, Jun. 2012.
- [25] F. Martin, C. R. M. Bangham, V. Ciminale, M. D. Lairmore, E. L. Murphy, W. M. Switzer, and R. Mahieux, "Conference highlights of the 15th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and related retroviruses, 4-8 June 2011, Leuven, Gembloux, Belgium.," *Retrovirology*, vol. 8, no. 1, p. 86, Jan. 2011.
- [26] S. Tattermusch and C. R. M. Bangham, "HTLV-1 infection: what determines the risk of inflammatory disease?," *Trends Microbiol.*, vol. 20, no. 10, pp. 494–500, Oct. 2012.
- [27] A.-M. Pais-Correia, M. Sachse, S. Guadagnini, V. Robbiati, R. Lasserre, A. Gessain, O. Gout, A. Alcover, and M.-I. Thoulouze, "Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses.," *Nat. Med.*, vol. 16, no. 1, pp. 83–9, Jan. 2010.
- [28] J. Overbaugh, "HTLV-1 sweet-talks its way into cells.," *Nat. Med.*, vol. 10, no. 1, pp. 20–1, Jan. 2004.
- [29] H. Hoshino, "Cellular Factors Involved in HTLV-1 Entry and Pathogenicity.," *Front. Microbiol.*, vol. 3, no. June, p. 222, Jan. 2012.
- [30] I. Leclercq, F. Mortreux, M. Cavrois, a Leroy, a Gessain, S. Wain-Hobson, and E. Wattel, "Host sequences flanking the human T-cell leukemia virus type 1 provirus in vivo.," *J. Virol.*, vol. 74, no. 5, pp. 2305–12, Mar. 2000.
- [31] S. Motoharu, H. Seisuke, H. Yoko, and Y. Mitsuaki, "Human adult T-cell leukemia virus: Complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 80, no. June, pp. 3618–3622, 1983.
- [32] Y. Wano, M. Feinberg, J. B. Hosking, H. Bogerd, and W. C. Greene, "Stable expression of the tax gene of type I human T-cell leukemia virus in human T cells activates specific cellular genes involved in growth.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 85, no. 24, pp. 9733–7, Dec. 1988.
- [33] G. Franchini, "Molecular mechanisms of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I infection.," *Blood*, vol. 86, no. 10, pp. 3619–39, Nov. 1995.
- [34] M. Matsuoka and K.-T. Jeang, "Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation.," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 7, no. 4, pp. 270–80, Apr. 2007.
- [35] V. Maguer, H. Cassé-Ripoll, L. Gazzolo, and M. D. Dodon, "Human T-cell leukemia virus type I-induced proliferation of human immature CD2+CD3-thymocytes.," *J. Virol.*, vol. 67, no. 9, pp. 5529–37, Sep. 1993.



- [36] G. P. Taylor and M. Matsuoka, "Natural history of adult T-cell leukemia/lymphoma and approaches to therapy.," *Oncogene*, vol. 24, no. 39, pp. 6047–57, Sep. 2005.
- [37] A. L. B. Starling, O. A. Martins-Filho, J. R. Lambertucci, L. Labanca, S. R. de Souza Pereira, A. Teixeira-Carvalho, M. L. Martins, J. G. Ribas, A. B. F. Carneiro-Proietti, and D. U. Gonçalves, "Proviral load and the balance of serum cytokines in HTLV-1-asymptomatic infection and in HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP).," *Acta Trop.*, vol. 125, no. 1, pp. 75–81, Jan. 2013.
- [38] A. Gessain, A. Louie, O. Gout, R. C. Gallo, and G. Franchini, "Human T-Cell Leukemia-Lymphoma Virus Type I (HTLV-I) Expression in Fresh Peripheral Blood Mononuclear Cells from Patients with Tropical Spastic Paraparesis/HTLV-I-Associated Myelopathy," *J. Virol.*, vol. 65, no. 3, pp. 1628–1633, 1991.
- [39] G. M. Castro, M. C. Balangero, E. Maturano, A. Mangeaud, and S. V Gallego, "Development and validation of a real-time PCR assay for a novel HTLV-1 tax sequence detection and proviral load quantitation.," *J. Virol. Methods*, vol. 189, no. 2, pp. 383–7, May 2013.
- [40] M. Setoyama, F. a Kerdel, G. Elgart, T. Kanzaki, and J. J. Byrnes, "Detection of HTLV-1 by polymerase chain reaction in situ hybridization in adult T-cell leukemia/lymphoma.," *Am. J. Pathol.*, vol. 152, no. 3, pp. 683–9, Mar. 1998.
- [41] N. Mor-Vaknin, H. Turgeman, a Torgeman, M. Wolfson, M. Huleihel, and M. Aboud, "Rapid syncytium formation between human T-cell leukaemia virus type-I (HTLV-I)-infected T-cells and human nervous system cells: a possible implication for tropical spastic paraparesis/HTLV-I associated myelopathy.," *Cell Biol. Int.*, vol. 22, no. 2, pp. 95–103, Jan. 1998.
- [42] V. Maguer-Satta, L. Gazzolo, and M. D. Dodon, "Human immature thymocytes as target cells of the leukemogenic activity of human T-cell leukemia virus type I.," *Blood*, vol. 86, no. 4, pp. 1444–52, Aug. 1995.
- [43] M. Wencker, C. Sausse, D. Derse, L. Gazzolo, and M. Duc Dodon, "Human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein down-regulates pre-T-cell receptor alpha gene transcription in human immature thymocytes.," *J. Virol.*, vol. 81, no. 1, pp. 301–8, Jan. 2007.
- [44] P. Jain, S. L. Manuel, Z. K. Khan, J. Ahuja, K. Quann, and B. Wigdahl, "DC-SIGN mediates cell-free infection and transmission of human T-cell lymphotropic virus type 1 by dendritic cells.," *J. Virol.*, vol. 83, no. 21, pp. 10908–21, Nov. 2009.
- [45] K. S. Jones, C. Petrow-Sadowski, Y. K. Huang, D. C. Bertolette, and F. W. Ruscetti, "Cell-free HTLV-1 infects dendritic cells leading to transmission and transformation of CD4(+) T cells.," *Nat. Med.*, vol. 14, no. 4, pp. 429–36, Apr. 2008.
- [46] K. N. Meekings, J. Leipzig, F. D. Bushman, G. P. Taylor, and C. R. M. Bangham, "HTLV-1 integration into transcriptionally active genomic regions is associated

- with proviral expression and with HAM/TSP.,” *PLoS Pathog.*, vol. 4, no. 3, p. e1000027, Mar. 2008.
- [47] T. Kattan, A. MacNamara, A. G. Rowan, H. Nose, A. J. Mosley, Y. Tanaka, G. P. Taylor, B. Asquith, and C. R. M. Bangham, “The avidity and lytic efficiency of the CTL response to HTLV-1.,” *J. Immunol.*, vol. 182, no. 9, pp. 5723–9, May 2009.
- [48] K. Hieshima, D. Nagakubo, T. Nakayama, A.-K. Shirakawa, Z. Jin, and O. Yoshie, “Tax-Inducible Production of CC Chemokine Ligand 22 by Human T Cell Leukemia Virus Type 1 (HTLV-1)-Infected T Cells Promotes Preferential Transmission of HTLV-1 to CCR4-Expressing CD4+ Cells,” *J. Immunol.*, vol. 180, pp. 931–939, 2013.
- [49] F. Toulza, K. Nosaka, Y. Tanaka, T. Schioppa, F. Balkwill, G. P. Taylor, and C. R. M. Bangham, “Human T-lymphotropic virus type 1-induced CC chemokine ligand 22 maintains a high frequency of functional FoxP3+ regulatory T cells.,” *J. Immunol.*, vol. 185, no. 1, pp. 183–9, Jul. 2010.
- [50] Q. Jin, B. Alkhatib, K. Cornetta, and G. Alkhatib, “Alternate receptor usage of neuropilin-1 and glucose transporter protein 1 by the human T cell leukemia virus type 1.,” *Virology*, vol. 396, no. 2, pp. 203–12, Jan. 2010.
- [51] D. Ghez, Y. Lepelletier, S. Lambert, J.-M. Fourneau, V. Blot, S. Janvier, B. Arnulf, P. M. van Ender, N. Heveker, C. Pique, and O. Hermine, “Neuropilin-1 is involved in human T-cell lymphotropic virus type 1 entry.,” *J. Virol.*, vol. 80, no. 14, pp. 6844–54, Jul. 2006.
- [52] B. Chaudhary, Y. S. Khaled, and B. J. Ammori, “Neuropilin 1 : function and therapeutic potential in cancer,” vol. 1, 2013.
- [53] M. Nejmeddine, V. S. Negi, S. Mukherjee, Y. Tanaka, K. Orth, G. P. Taylor, and C. R. M. Bangham, “HTLV-1-Tax and ICAM-1 act on T-cell signal pathways to polarize the microtubule-organizing center at the virological synapse.,” *Blood*, vol. 114, no. 5, pp. 1016–25, Jul. 2009.
- [54] N. Manel, F. J. Kim, S. Kinet, N. Taylor, M. Sitbon, and J.-L. Battini, “The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV.,” *Cell*, vol. 115, no. 4, pp. 449–59, Nov. 2003.
- [55] K. S. Jones, C. Petrow-sadowski, D. C. Bertolette, Y. Huang, and F. W. Ruscetti, “Heparan Sulfate Proteoglycans Mediate Attachment and Entry of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Virions into,” *J. Virol.*, vol. 79, no. 20, pp. 12692–12702, 2005.
- [56] J. R. Bishop, M. Schuksz, and J. D. Esko, “Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology.,” *Nature*, vol. 446, no. 7139, pp. 1030–7, Apr. 2007.
- [57] D. Ghez, Y. Lepelletier, K. S. Jones, C. Pique, and O. Hermine, “Current concepts regarding the HTLV-1 receptor complex,” *Retrovirology*, vol. 7, no. 1, p. 99, 2010.

- [58] T. Igakura, Y. Tanaka, M. Osame, and C. R. M. Bangham, "Spread of HTLV-I Between Lymphocytes by Virus-Induced Polarization of the Cytoskeleton," vol. 1713, no. 2003, 2014.
- [59] E. Majorovits, M. Nejmeddine, Y. Tanaka, G. P. Taylor, S. D. Fuller, and C. R. M. Bangham, "Human T-lymphotropic virus-1 visualized at the virological synapse by electron tomography.," *PLoS One*, vol. 3, no. 5, p. e2251, Jan. 2008.
- [60] S. Venkatesh and P. D. Bieniasz, "Mechanism of HIV-1 Virion Entrapment by Tetherin," vol. 9, no. 7, 2013.
- [61] A. Ilinskaya, D. Derse, S. Hill, G. Princler, and G. Heidecker, "Cell – cell transmission allows human T-lymphotropic virus 1 to circumvent tetherin restriction," *Virology*, vol. 436, no. 1, pp. 201–209, 2013.
- [62] N. Van Prooyen, H. Gold, V. Andresen, O. Schwartz, K. Jones, and F. Ruscetti, "Human T-cell leukemia virus type 1 p8 protein increases cellular conduits and virus transmission," 2010.
- [63] N. Van Prooyen, V. Andresen, H. Gold, I. Bialuk, C. Pise-Masison, and G. Franchini, "Hijacking the T-cell communication network by the human T-cell leukemia/lymphoma virus type 1 (HTLV-1) p12 and p8 proteins.," *Mol. Aspects Med.*, vol. 31, no. 5, pp. 333–43, Oct. 2010.
- [64] C. Pique and K. S. Jones, "Pathways of cell-cell transmission of HTLV-1.," *Front. Microbiol.*, vol. 3, no. October, p. 378, Jan. 2012.
- [65] S. Kinpara, A. Hasegawa, A. Utsunomiya, H. Nishitsuji, H. Furukawa, T. Masuda, and M. Kannagi, "Stromal cell-mediated suppression of human T-cell leukemia virus type 1 expression in vitro and in vivo by type I interferon.," *J. Virol.*, vol. 83, no. 10, pp. 5101–8, May 2009.
- [66] A. J. Sadler and B. R. G. Williams, "Interferon-inducible antiviral effectors," vol. 8, no. july, pp. 559–568, 2008.
- [67] L. M. Sedger, "microRNA control of interferons and interferon induced anti-viral activity," *Mol. Immunol.*, vol. 56, no. 4, pp. 781–793, 2013.
- [68] S. Kinpara, M. Kijiyama, A. Takamori, A. Hasegawa, A. Sasada, T. Masuda, Y. Tanaka, A. Utsunomiya, and M. Kannagi, "Interferon-  $\alpha$  ( IFN-  $\alpha$  ) suppresses HTLV-1 gene expression and cell cycling , while IFN-  $\alpha$  combined with zidovudin induces p53 signaling and apoptosis in HTLV-1-infected cells," *Retrovirology*, vol. 10, no. 1, p. 1, 2013.
- [69] N. Van Damme and J. Guatelli, "HIV-1 Vpu inhibits accumulation of the envelope glycoprotein within clathrin-coated, Gag-containing endosomes.," *Cell. Microbiol.*, vol. 10, no. 5, pp. 1040–57, May 2008.
- [70] S. J. D. Neil, T. Zang, and P. D. Bieniasz, "Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu," vol. 451, no. January, 2008.

- [71] D. Perez-caballero, T. Zang, A. Ebrahimi, M. W. McNatt, D. A. Gregory, M. C. Johnson, and P. D. Bieniasz, "Tetherin Inhibits HIV-1 Release by Directly Tethering Virions to Cells," *Cell*, vol. 139, no. 3, pp. 499–511, 2009.
- [72] B. D. Kuhl, R. D. Sloan, D. A. Donahue, T. Bar-magen, C. Liang, and M. A. Wainberg, "Tetherin restricts direct cell-to-cell infection of HIV-1," *Retrovirology*, vol. 7, no. 1, p. 115, 2010.
- [73] N. Casartelli, M. Sourisseau, J. Feldmann, F. Guivel-benhassine, J. Guatelli, and O. Schwartz, "Tetherin Restricts Productive HIV-1 Cell-to-Cell Transmission," vol. 6, no. 6, 2010.
- [74] N. Van Damme, D. Goff, C. Katsura, R. L. Jorgenson, M. Johnson, E. B. Stephens, and J. Guatelli, "The interferon-induced protein BST2/CD317 restricts release of virions from infected cells and is down-regulated from the cell surface by Vpu," *Cell Host Microbe*, vol. 3, no. 4, pp. 245–252, 2008.
- [75] E. Miyagi, A. J. Andrew, S. Kao, and K. Strebel, "Vpu enhances HIV-1 virus release in the absence of Bst-2 cell surface down-modulation and intracellular depletion," pp. 2–7, 2009.
- [76] M. W. McNatt, T. Zang, and P. D. Bieniasz, "Vpu Binds Directly to Tetherin and Displaces It from Nascent Virions," vol. 9, no. 4, pp. 40–44, 2013.
- [77] R. Serra-moreno, K. Zimmermann, L. J. Stern, and D. T. Evans, "Tetherin / BST-2 Antagonism by Nef Depends on a Direct Physical Interaction between Nef and Tetherin , and on Clathrin-mediated Endocytosis," vol. 9, no. 7, 2013.
- [78] N. Manca, F. Perandin, N. de Simone, F. Giannini, D. Bonifati, and C. Angelini, "Detection of HTLV I tax rex and pol Gene Sequences of Thymus Gland in a Large Group of Patients with Myasthenia Gravis," *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, pp. 300–306, 2002.
- [79] K. Moreira-Ramos, F. M. M. De Castro, L. Linhares-Lacerda, and W. Savino, "Can thymic epithelial cells be infected by human T-lymphotropic virus type 1?," *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, vol. 106, no. 6, pp. 759–62, Sep. 2011.
- [80] E. Fernández, a Vicente, a Zapata, B. Brera, J. J. Lozano, C. Martínez, and M. L. Toribio, "Establishment and characterization of cloned human thymic epithelial cell lines. Analysis of adhesion molecule expression and cytokine production.," *Blood*, vol. 83, no. 11, pp. 3245–54, Jun. 1994.
- [81] V. Blot, L. Delamarre, F. Perugi, D. Pham, S. Bénichou, R. Benarous, T. Hanada, A. H. Chishti, M.-C. Dokh lar, and C. Pique, "Human Dlg protein binds to the envelope glycoproteins of human T-cell leukemia virus type 1 and regulates envelope mediated cell-cell fusion in T lymphocytes.," *J. Cell Sci.*, vol. 117, no. Pt 17, pp. 3983–93, Aug. 2004.
- [82] D. D. Ho, T. R. Rota, and M. S. Hirsch, "Infection of human endothelial cells by human T-lymphotropic virus type I.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 81, no. 23, pp. 7588–90, Dec. 1984.

- [83] D. Schachtschabel, H. Lazarus, S. Farber, and G. E. Foley, "Sensitivity of Cultured Human Lymphoblasts (CCRF-CEM cells) to Inhibition by Thymidine," *Exp. Cell Res.*, vol. 43, no. 2, pp. 512–514, 1966.
- [84] K. S. Jones, S. Lambert, M. Bouttier, L. Bénit, F. W. Ruscetti, O. Hermine, and C. Pique, "Molecular Aspects of HTLV-1 Entry: Functional Domains of the HTLV-1 Surface Subunit (SU) and Their Relationships to the Entry Receptors," *Viruses*, vol. 1, pp. 794–810, 2011.
- [85] Y. Lepelletier, S. Smaniotto, R. Hadj-Slimane, D. M. S. Villa-verde, A. C. Nogueira, M. Dardenne, O. Hermine, and W. Savino, "Control of human thymocyte migration by Neuropilin-1 / Semaphorin-3A-mediated interactions," vol. 104, no. 13, pp. 5545–5550, 2007.
- [86] Y. Plumelle, "HTLV-1-associated myelopathy / tropical spastic paraparesis (HAM / TSP) pathogenesis hypothesis," vol. 52, pp. 595–604, 1999.
- [87] A. Melamed, D. J. Laydon, N. a Gillet, Y. Tanaka, G. P. Taylor, and C. R. M. Bangham, "Genome-wide determinants of proviral targeting, clonal abundance and expression in natural HTLV-1 infection.," *PLoS Pathog.*, vol. 9, no. 3, p. e1003271, Mar. 2013.
- [88] R. Curren, R. Van Duyne, E. Jaworski, I. Guendel, G. Sampey, R. Das, A. Narayanan, and F. Kashanchi, "HTLV tax: a fascinating multifunctional co-regulator of viral and cellular pathways.," *Front. Microbiol.*, vol. 3, no. November, p. 406, Jan. 2012.
- [89] K. Moreira-Ramos, "AS INTERAÇÕES ENTRE CÉLULAS EPITELIAIS TÍMICAS HUMANAS E LINFÓCITOS T INFECTADOS PELO VÍRUS LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T HUMANAS TIPO 1 (HTLV-1)," 2011.
- [90] S. Oliére, E. Hernandez, A. Lézin, M. Arguello, R. Douville, T. L.-A. Nguyen, S. Olindo, G. Panelatti, M. Kazanji, P. Wilkinson, R.-P. Sékaly, R. Césaire, and J. Hiscott, "HTLV-1 evades type I interferon antiviral signaling by inducing the suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1).," *PLoS Pathog.*, vol. 6, no. 11, p. e1001177, Jan. 2010.
- [91] A. Cachat, S. A. Chevalier, S. Alais, N. L. Ko, L. Ratner, C. Journo, H. Dutartre, and R. Mahieux, "Alpha interferon restricts human T-lymphotropic virus type 1 and 2 de novo infection through PKR activation.," *J. Virol.*, vol. 87, no. 24, pp. 13386–96, Dec. 2013.
- [92] H. Chu, J. Wang, M. Qi, J. Yoon, X. Chen, X. Wen, and J. Hammonds, "Article Tetherin / BST-2 Is Essential for the Formation of the Intracellular Virus-Containing Compartment in HIV-Infected Macrophages," *Cell Host Microbe*, vol. 12, no. 3, pp. 360–372, 2012.
- [93] J. Jin, N. Sherer, and W. Mothes, "Surface Transmission or Polarized Egress? Lessons Learned from HTLV Cell-to-Cell Transmission.," *Viruses*, vol. 2, no. 2, pp. 601–5, Feb. 2010.

- [94] a Okayama, B. Korber, Y. M. Chen, J. Allan, T. H. Lee, S. Shioiri, N. Tachibana, K. Tsuda, N. Mueller, and M. F. McLane, "Unusual pattern of antibodies to human T-cell leukemia virus type-I in family members of adult T-cell leukemia patients.," *Blood*, vol. 78, no. 12, pp. 3323–9, Dec. 1991.
- [95] W. Savino, "The thymus is a common target organ in infectious diseases.," *PLoS Pathog.*, vol. 2, no. 6, p. e62, Jun. 2006.
- [96] M. Kojika, G. Ishii, J. Yoshida, M. Nishimura, T. Hishida, S. Ota, Y. Murata, K. Nagai, and A. Ochiai, "Immunohistochemical differential diagnosis between thymic carcinoma and type B3 thymoma: diagnostic utility of hypoxic marker, GLUT-1, in thymic epithelial neoplasms.," *Mod. Pathol.*, vol. 22, no. 10, pp. 1341–50, Oct. 2009.
- [97] M. Popovic, P. S. Sarin, M. Robert-Gurroff, V. S. Kalyanaraman, D. Mann, J. Minowada, and R. C. Gallo, "Isolation and transmission of human retrovirus (human t-cell leukemia virus).," *Science*, vol. 219, no. 4586, pp. 856–9, Feb. 1983.
- [98] M. Nagai and M. Osame, "Human T-cell lymphotropic virus type I and neurological diseases.," *J. Neurovirol.*, vol. 9, no. 2, pp. 228–35, Apr. 2003.
- [99] M. Saito, M. Nakagawa, S. Kaseda, T. Matsuzaki, M. Jonosono, N. Eiraku, R. Kubota, N. Takenouchi, M. Nagai, Y. Furukawa, K. Usuku, S. Izumo, and M. Osame, "Decreased human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) provirus load and alteration in T cell phenotype after interferon-alpha therapy for HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis.," *J. Infect. Dis.*, vol. 189, no. 1, pp. 29–40, Jan. 2004.
- [100] W. Savino, M. Dardenne, C. Marche, D. Trophilme, J.-M. Dupuy, N. Lapointe, and J.-F. Bach, "Thymic Epithelium in AIDS," *Am. J. Pathol.*, vol. 122, no. 2, pp. 302–307, 1986.
- [101] H. Valentin, O. Azocar, B. Horvat, R. Garrone, A. Evlashev, M. L. Toribio, and C. Rabourdin-combe, "Measles Virus Infection Induces Terminal Differentiation of Human Thymic Epithelial Cells Measles Virus Infection Induces Terminal Differentiation of Human Thymic Epithelial Cells," 1999.
- [102] C. Nobrega, S. Roque, C. Nunes-Alves, A. Coelho, I. Medeiros, A. G. Castro, R. Appelberg, and M. Correia-Neves, "Dissemination of mycobacteria to the thymus renders newly generated T cells tolerant to the invading pathogen.," *J. Immunol.*, vol. 184, no. 1, pp. 351–8, Jan. 2010.
- [103] J. S. Hale and P. J. Fink, "Back to the Thymus: Peripheral T Cells Come Home," *Immunol. cell Biol.*, vol. 87, no. 1, pp. 58–64, 2009.
- [104] A. E. Bennett, K. Narayan, D. Shi, L. M. Hartnell, K. Gousset, H. He, B. C. Lowekamp, T. S. Yoo, D. Bliss, E. O. Freed, and S. Subramaniam, "Ion-abrasion scanning electron microscopy reveals surface-connected tubular conduits in HIV-infected macrophages.," *PLoS Pathog.*, vol. 5, no. 9, p. e1000591, Sep. 2009.

- [105] S. Ozden, V. Mouly, M. Prevost, A. Gessain, G. Butler-browne, and P. Ceccaldi, "Muscle Wasting Induced by HTLV-1 Tax-1 Protein An in Vitro and in Vivo Study," vol. 167, no. 6, pp. 1609–1619, 2005.
- [106] D. L. Hodge, D. Reynolds, F. M. Cerbán, S. G. Correa, N. S. Baez, H. a Young, and M. C. Rodriguez-Galan, "MCP-1/CCR2 interactions direct migration of peripheral B and T lymphocytes to the thymus during acute infectious/inflammatory processes.," *Eur. J. Immunol.*, vol. 42, no. 10, pp. 2644–54, Oct. 2012.
- [107] C. Nobrega, C. Nunes-Alves, B. Cerqueira-Rodrigues, S. Roque, P. Barreira-Silva, S. M. Behar, and M. Correia-Neves, "T cells home to the thymus and control infection.," *J. Immunol.*, vol. 190, no. 4, pp. 1646–58, Feb. 2013.
- [108] J. de Meis and W. Savino, "Mature peripheral T cells are important to preserve thymus function and selection of thymocytes during Mycobacterium tuberculosis infection," *Immunotherapy*, vol. 5, no. 6, pp. 573–576, 2013.
- [109] H. Teruya, M. Tomita, M. Senba, C. Ishikawa, M. Tamayose, A. Miyazato, S. Yara, Y. Tanaka, Y. Iwakura, J. Fujita, and N. Mori, "Human T-cell leukemia virus type I infects human lung epithelial cells and induces gene expression of cytokines , chemokines and cell adhesion molecules," vol. 10, pp. 1–10.
- [110] J. G. A. Coelho-dos-Reis, L. Passos, M. C. Duarte, M. G. Araújo, A. C. Campi-Azevedo, A. Teixeira-Carvalho, V. Peruhype-Magalhães, B. C. Trindade, R. Dos Santos Dias, M. L. Martins, A. B. D. F. Carneiro-Proietti, A. C. Guedes, D. U. Gonçalves, and O. A. Martins-Filho, "Immunological profile of HTLV-1-infected patients associated with infectious or autoimmune dermatological disorders.," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 7, no. 7, p. e2328, Jan. 2013.