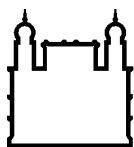


FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

PERFIL DE EXPRESSÃO DE INTEGRINAS EM LINFÓCITOS T DE PACIENTES EM
DIFERENTES FASES DE INFECÇÃO POR HTLV-1

LILA TEIXEIRA DE ARAÚJO JANAHÚ

Rio de Janeiro
Agosto de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

LILA TEIXEIRA DE ARAÚJO JANAHÚ

Perfil de expressão de integrinas em linfócitos T de pacientes em diferentes fases de infecção por HTLV-1

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Medicina Tropical

Orientadores: Adriano Gomes da Silva
Alda Maria Da-Cruz
Wilson Savino

RIO DE JANEIRO
Agosto de 2017

TEIXEIRA DE ARAUJO JANAHU, LILA.

PERFIL DE EXPRESSÃO DE INTEGRINAS EM LINFÓCITOS T DE
PACIENTES EM DIFERENTES FASES DE INFECÇÃO POR HTLV-1 / LILA
TEIXEIRA DE ARAUJO JANAHU. - Rio de janeiro, 2017.
144 f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina
Tropical, 2017.

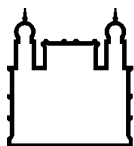
Orientador: ADRIANO GOMES DA SILVA.

Co-orientadora: ALDA MARIA DA-CRUZ.

Co-orientador: WILSON SAVINO.

Bibliografia: f. 118-141

1. integrina alfa4. 2. HTLV-1. 3. citometria de fluxo. 4. Linfócitos T. I.
Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

AUTOR: LILA TEIXEIRA DE ARAÚJO JANAHÚ

PERFIL DE EXPRESSÃO DE INTEGRINAS EM LINFÓCITOS T DE PACIENTES EM DIFERENTES FASES DE INFECCÃO POR HTLV-1

ORIENTADORES: Adriano Gomes da Silva

Alda Maria Da-Cruz

Wilson Savino

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

PROF. DRA. MARTHA CECÍLIA SUAREZ MUTIS (**Presidente**)

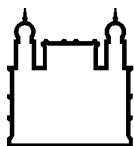
PROF. DR. VINICIUS COTTA DE ALMEIDA

PROFA. DRA. LUCIMAR GONÇALVES MILAGRES

PROF. DR. RENATO SANTANA AGUIAR

PROFA. DRA. SILVIA AMARAL GONÇALVES DA SILVA

Rio de Janeiro, 23 de Agosto de 2017.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente à Artur e Lia, por compreenderem amorosamente às minhas ausências.

À minha mãe, Léia, pelo apoio e incentivo, quando pensei em desistir.

Aos pacientes voluntários da pesquisa, sem sua confiança e colaboração nada faria sentido.

À Dra. Alda Maria Da-Cruz, por acreditar em mim; por todos os ensinamentos, apoio imensurável e exemplo de ética profissional.

Ao Dr. Wilson Savino, pelo desafio de me lançar a um novo escopo da ciência e ultrapassar as barreiras do conhecimento, pelos ensinamentos, pelo apoio incondicional.

Ao Dr. Adriano Gomes da Silva, pelo exemplo de liderança e comprometimento com a pesquisa, por sua dedicação em ensinar e fazer aprender.

À Dra Joanna Reis, pela gentileza infindável em todos os momentos, dedicação e comprometimento com a pesquisa.

A toda a equipe do Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas (IOC), pelo acolhimento, amizade e espírito de colaboração, o que ajudou muito na execução do estudo.

À equipe do Laboratório de Pesquisas sobre o Timo (IOC), que me acolheu tão bem no início da pesquisa, sempre com muita receptividade e disponibilidade. Especiais agradecimentos aos doutores Wilson Savino e Juliana Demeis.

À equipe do Laboratório de Imunoparasitologia (IOC), apoiadores e colaboradores deste estudo.

Ao Dr. Carlos Araújo da Costa, pela confiança no meu trabalho, pelo cuidado, dedicação e humanidade com os nossos pacientes.

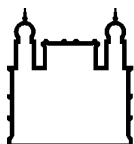
Ao Dr. Antonio Carlos Vallinoto, por ceder gentilmente a estrutura do Laboratório de Virologia (UFPA) para a preparação e armazenamento das amostras biológicas, pela colaboração com todo o processo de trabalho durante todos esses anos.

À equipe do Laboratório de Virologia (UFPA), por todas as horas juntos e sempre com momentos alegres, apesar das dificuldades na construção de nossas pesquisas.

À equipe do Núcleo de Medicina Tropical (UFPA), de valor inestimável para a execução deste estudo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo auxílio financeiro.

À FIOCRUZ, por todas as oportunidades vividas na minha trajetória em pesquisa.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

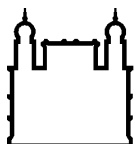
PERFIL DE EXPRESSÃO DE INTEGRINAS EM LINFÓCITOS T DE PACIENTES EM DIFERENTES FASES DE INFECÇÃO POR HTLV-1

TESE DE DOUTORADO EM MEDICINA TROPICAL

Lila Teixeira de Araújo Janahú

O HTLV-1 tem sido fortemente relacionado há décadas a uma doença neurológica, Mielopatia associada ao HTLV-1/Paraparesia Espástica Tropical (HAM/TSP), uma neuropatia crônica progressiva caracterizada por envolvimento bilateral do trato piramidal e inflamação crônica da medula espinhal, com comprometimento perivascular e infiltração parenquimatosa de células mononucleares. Células infectadas pelo HTLV-1 migram através da camada endotelial por indução da expressão do receptor de adesão e seus ligantes, afetando tanto a migração celular como a proliferação. A detecção viral no SNC dos pacientes HAM/TSP demonstra a capacidade do HTLV-1 em atravessar a barreira hemato-encefálica, e seu provável envolvimento na patogênese da doença. A importância desses mecanismos, no entanto, permanece pouco esclarecida. **Objetivos:** foram analisadas a expressão de integrinas da cadeia alfa (CD49d, CD49e e CD49f) na superfície de subpopulações de células T de pacientes infectados por HTLV-1. **Métodos:** 82 indivíduos, sendo 67 portadores de HTLV-1 (18 HAM/TSP e 49 oligoassintomáticos) mais 15 controles saudáveis de áreas endêmicas do Pará (Brasil) foram investigados clínica e imunologicamente. Para análise das integrinas foram utilizados anticorpos monoclonais humanos (CD3-V500, CD4-APC-Cy7, CD8-APC, CD49d-PeCy5, CD49e-PE, CD49f-FITC) (BD Biosciences) para Citometria de Fluxo (Cytotflex Flow Cytometer, Beckman Coulter inc, CA, EUA). Além disso foram realizadas dosagem de citocinas inflamatórias e análise de células T regulatórias. **Resultados:** Nos aspectos clínicos, o grupo oligoassintomático apresentou várias manifestações, com distúrbios urinários predominantes. Nos achados imunológicos, $CD4^+CD49d^{hi}$ e $CD8^+CD49d^{hi}$ encontravam-se hiper expressos em ambos os grupos de indivíduos infectados quando comparados ao grupo controle. **Conclusão:** integrinas estão hiper expressas na infecção por HTLV-1 tanto em indivíduos oligoassintomáticos quanto nos portadores HAM/TSP e com isso modificam a permeabilidade da membrana. Nossos resultados sugerem que este aumento de expressão pode estar diretamente associado com a habilidade dos linfócitos T em infiltrar o tecido nervoso, tanto em indivíduos oligo/assintomáticos quanto em HAM/TSP, função esta possivelmente relacionada ao desenvolvimento das manifestações neurológicas. Tais resultados apontam para o potencial uso da integrina CD49d como alvo para desenvolvimento de estratégias terapêuticas de indivíduos infectados por HTLV-1, com objetivo de bloquear a migração de linfócitos T ativados para o sistema nervoso central e impedir a progressão para HAM/TSP.

Palavras-chave: HTLV-1, linfócitos, integrinas, VLA-4, CD49d



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

INTEGRINS EXPRESSION PROFILE ON T LYMPHOCYTES FROM HTLV-1 INFECTED SUBJECTS IN DISTINCT INFECTION PHASES

ABSTRACT

PHD THESIS IN TROPICAL MEDICINE

Lila Teixeira de Araújo Janahú

HTLV-1 is a retrovirus transmitted via cell-to-cell contact through body fluids, such as blood products, semen and breast milk. It has been strongly related to a neurological disease, Myelopathy associated with HTLV-1 / Tropical Spastic Paraparesis (HAM / TSP), which is a chronic progressive myelopathy characterized by bilateral involvement of the pyramidal tract with sphincter disorders and chronic inflammation of the spinal cord, perivascular and parenchymatous infiltration of mononuclear cells. Cells infected by HTLV-1 migrate through the endothelial layer by inducing the expression of the adhesion receptor and its ligands, affecting both cell migration and proliferation. SNC viral detection of HAM/TSP patients demonstrates the ability of HTLV-1 to cross the blood-brain barrier, thus such damage is likely to be involved in the pathogenesis of the disease. The importance of these mechanisms, however, remains unclear. **Objectives:** We studied the expression of alpha chain integrins (CD49d, CD49e and CD49f) on the surface of T-cell subpopulations of HTLV-1 infected patients. **Methods:** 82 subjects, of whom 67 were seropositive to HTLV-1 (18 HAM / TSP and 49 oligo-symptomatic) and 15 healthy controls from the endemic areas of Pará (Brazil) were clinically and immunologically investigated. To analyze integrins we used human monoclonal antibodies (CD3-V500, CD4-APC-Cy7, CD8-APC, CD49d-PeCy5, CD49e-PE, CD49f-FITC) (BD Biosciences) for Flow Cytometry (Cytoflex Flow Cytometer, Beckman Coulter Inc., CA, USA). In addition, inflammatory cytokine dosing and regulatory T cell analysis were performed. **Results:** In the clinical aspects, the oligo-symptomatic group presented several manifestations, with predominant urinary disorders. In the immunological findings, CD4⁺CD49d^{hi} and CD8⁺CD49d^{hi} were over expressed in both groups of infected individuals when compared to the control group. **Conclusion:** Integrins are over expressed in HTLV-1 infection in both oligo-symptomatic individuals and HAM/TSP carriers and thereby modify the transmembrane potential. Our results suggest that this increase in expression may be directly associated with the ability of T lymphocytes to infiltrate nervous tissue, both in oligo/asymptomatic individuals and in HAM/TSP, a function that is likely related to the development of neurological manifestations. These results point to the potential use of the CD49d integrin as a target for the development of therapeutic strategies for individuals infected with HTLV-1, in order to block the migration of activated T lymphocytes to the central nervous system and to prevent the progression to HAM / TSP.

Key words: HTLV-1, lymphocytes, integrins, VLA-4, CD49d

ÍNDICE

RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Histórico	22
1.2 Epidemiologia da infecção pelo HTLV-1	23
1.2.1 HTLV No Brasil.....	24
1.2.2 Rotas de Transmissão.....	25
1.3 Eventos determinantes da infecção pelo HTLV-1	26
1.4 Morfologia, estrutura e características biológicas do vírus	28
1.4.1 Estrutura da Partícula Viral.....	29
1.4.2 Características Morfológicas e Taxonômicas.....	29
1.5 Imunopatogênese	30
1.5.1 Proteínas Virais.....	33
1.5.2 Migração Celular e Moléculas de Adesão.....	35
1.5.3 Citocinas Inflamatórias e Regulatórias.....	39
1.5.4 Carga Proviral.....	41
1.5.5 Fatores Genéticos e imunofenotípicos.....	45
1.5.6 Expansão Clonal.....	46
1.6 A barreira hematoencefálica no processo de lesão do SNC pelo HTLV-1	46
1.7 Doenças Associadas	48
1.7.1 HAM/TSP.....	49
1.7.2 Uveíte Associada ao HTLV (HUA).....	53
1.7.3 Alterações Dermatológicas Relacionadas ao HTLV-1.....	54
1.7.4 Disfunções Urinárias.....	54
1.7.5 Outras manifestações.....	56
1.8 Aspectos relacionados a transmissão familiar do HTLV-1	56
1.9 Tratamento e prognóstico da infecção pelo HTLV-1	57
1.10 Aspectos sociais relacionados a infecção	58

2. JUSTIFICATIVA.....	60
3. OBJETIVOS.....	61
3.1 Objetivo Geral	61
3.2 Objetivos Específicos.....	61
4. MATERIAL E MÉTODOS	62
4.1 Delineamento do estudo.....	62
4.2 Seleção dos pacientes.....	62
4.2.1 Critérios de Inclusão.....	62
4.2.2 Critérios de Exclusão.....	62
4.3 Coleta de Dados.....	63
4.4 Tamanho da Amostra.....	63
4.5 Procedimentos Metodológicos.....	65
4.5.1 Coleta de Amostras de Sangue.....	65
4.5.2 Obtenção de Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSP) e Amostras De Plasma.....	65
4.5.3 Criopreservação.....	66
4.5.4 Transporte de Material Biológico.....	67
4.5.5 Descongelamento das Amostras.....	67
4.5.6 Avaliação Fenotípica das Células Mononucleares do Sangue Periférico.....	68
4.5.7 Citometria de Fluxo.....	68
4.5.8 Quantificação de Citocinas Plasmáticas.....	71
4.5.9 Quantificação da Carga Proviral.....	72
4.5.10 Riscos.....	73
4.6 Análise Estatística.....	73
4.7 Comparação dos grupos.....	74
4.8 Considerações éticas.....	74

5	RESULTADOS.....	75
5.1	Características clínicas, demográficas e epidemiológicas de pacientes infectados pelo HTLV-1, sintomáticos e oligo/assintomáticos.....	75
5.2	Resposta imunológica de indivíduos infectados pelo HTLV1/2 e não infectados.....	81
	Artigo.....	83
5.2.2	Resultados complementares.....	108
5.2.2.1	Análise de Citocinas.....	108
5.2.2.2	Análise de células T regulatórias.....	108
6	VIESES DA PESQUISA E DIFULDADES ENCONTRADAS.....	111
7	DISCUSSÃO.....	111
8	CONCLUSÕES.....	117
9	BIBLIOGRAFIA.....	119

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Distribuição geográfica da infecção pelo HTLV-1 em países onde a doença é considerada endêmica.....(Página 24)
- Figura 2. Eventos determinantes da infecção pelo HTLV-1. Desfecho da infecção, com desencadeamento ou não de doença.....(Página 27)
- Figura 3. A infectividade do HTLV e o mecanismo célula-a-célula.....(Página 31)
- Figura 4. Modelo de evolução da carga proviral do HTLV-1 no curso da infecção. Enquanto a carga proviral se mantém estável no sangue periférico (SP) ao longo da infecção, sua elevação no Sistema Nervoso Central (SNC) pode desencadear como desfecho a HAM/TSP.....(Página 42)
- Figura 5. Mecanismos celulares relacionados à patogênese da HAM/TSP.....(Página 31)
- Figura 6. Modelo de Patogênese da HAM/TSP. Desencadeamento de resposta inflamatória mediada pela migração de linfócitos T infectados e CTLs anti-Tax para o SNC com liberação de citocinas pró-inflamatórias.....(Página 50)
- Figura 7. Fluxograma representativo da coleta de dados desde a captação de pacientes até triagem das amostras divididas em subgrupos.....(Página 64)
- Figura 8. Protocolo de análise citofluorimétrica de integrinas.....(Página 70)
- Figura 9. Protocolo de análise citofluorimétrica de Tregs.....(Página 71)
- Figura 10. Heredograma das famílias infectadas pelo HTLV-1.....(Página 79)
- Figura 11. Análise de células T regulatórias em indivíduos não infectados e infectados pelo HTLV-1.....(Página 110)

LISTA DE QUADROS, TABELAS E ANEXOS

QUADRO 1. Sequência nucleotídica de iniciadores e sondas utilizadas na PCR em tempo real para quantificação de carga proviral de pacientes com HTLV-1.....(Página 73)

TABELA 1. Características clínico-epidemiológicas de pacientes infectados pelo HTLV-1 com (HAM/TSP) e oligo/assintomáticos).....(Página 77)

TABELA 2. Percentual de linfócitos T do sangue periférico de indivíduos infectados (oligo/assintomáticos e HAM/TSP) e não infectados pelo HTLV-1 expressando integrinas.....(Página 82)

| TABELA 3. Níveis plasmáticos de citocinas em indivíduos infectados pelo HTLV-1 (oligo/assintomáticos HAM/TSP) e controles.....(Página107)

ANEXO I. Ficha de Avaliação e acompanhamento de Portadores de HTLV-1 e 2.....(Página 142)

ANEXO II. Termo de Consentimento Livre e esclarecido.....(Página 143)

ANEXO III. Parecer consubstanciado do CEP/NMT e número CAAEE.....(Página 144)

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATL- *Adult T cell Leukemia*

APC- Célula apresentadora de antígeno

BBB- *Blood brain barrier*

CD- *Cluster of differentiation*

CNS- *Central Nervous System*

CTL- Linfócitos T citotóxicos

DNA- Ácido desoxirribonucleico

ELA- Esclerose Lateral Amiotrófica

ELISA- *Enzyme linked immunosorbent assay*

FCE- Fluido cerebro-espinhal

FoxP3- *Forkhead boxp3*

HUA- Uveíte pelo HTLV-1

HLA- Antígeno leucocitário humano

HAM/TSP- *HTLV adult myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis*

IL-2 – Interleucina 2

IL-4- Interleucina 4

IL-6- Interleucina 6

IL-10- Interleucina 10

IL-12 p70- Interleucina 12p-70

ILR-2-Receptor da Interleucina 2

IFN Interferon

LFA-1 – Antígeno associado a função de linfócito

LTA- Leucemia de células T do Adulto

PET/MAH- Paraparesia Espástica Tropical/ mielopatia associada ao HTLV

PBMC- *Peripheral blood mononuclear cells*

STLV - *Simian T-cell Lymphotropic Virus*

SNC- Sistema nervoso central

TReg- células T regulatórias

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

TR- Transcriptase Reversa

UDI - Usuários de drogas injetáveis

1. INTRODUÇÃO

As retrovirose são importantes causas de morbidade e mortalidade humana, tornando-se pandemias nas últimas três décadas. Dentre essas retrovirose, o vírus Linfotrópico de células T Humano - HTLV, o qual possui características micro e macro epidemiológicas, pode apresentar um caráter de persistência viral e existir, no hospedeiro, na forma silenciosa, durante várias décadas (Casseb, 2013). É reconhecido atualmente como um problema de saúde pública, com disseminação em vários países, e cerca de 20 milhões de indivíduos estão infectados no mundo; no cenário mundial da disseminação e transmissão endêmica, o Brasil é o país com maior número absoluto de portadores, atingindo cerca de 2 milhões de brasileiros (Edlich *et al.*, 2000; Gessain *et al.*, 2012; Carneiro-Proietti *et al.*, 2012; Brasil, 2013; Proietti, 2015). O estado do Pará destaca-se como o terceiro em prevalência do HTLV-1 no Brasil. É o segundo maior estado brasileiro, com um território de 1. 247. 954, 666 km² uma população de 8. 272. 724 habitantes. Etnologicamente, possui 240 comunidades quilombolas e a terceira maior colônia japonesa do Brasil. Quanto à exposição sexual, é o segundo estado brasileiro com maior número de pontos de prostituição infantil nas estradas, de acordo com pesquisa do Departamento Nacional de Polícia Rodoviária Federal em parceria com a Secretaria de Direitos Humanos da Presidência da República.

O HTLV-1 pertence à família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae*, caracterizada por possuir duas fitas simples de RNA, transcriptase reversa (enzima capaz de transcrever RNA em DNA viral) e inserção no genoma do hospedeiro, constituindo o provírus, que se incorpora ao DNA estabelecendo ou não a expressão de doenças (Dorner & Coffin, 1986; Cann e Chen, 1996).

Além do subtipo 1, mais outros 3 foram isolados, os dois últimos (HTLV-3 e 4) foram descobertos mais de duas décadas depois (Wolfe *et al.*, 2005); o subtipo 2 é mais encontrado entre índios na América do Sul, e no contexto brasileiro se destaca o estado do Pará. O HTLV-2 também é mais frequente em usuários de drogas em alguns países europeus. Este subtipo tem sido associado a doenças neurológicas e respiratórias, porém sem grande expressão sobre os sistemas (Forlani 2013; Melamed 2014; Viana et al 2015; Paiva & Casseb, 2015). Mais amplamente estudados e conhecidos, HTLV-1 e HTLV-2 compartilham entre si amplas características de sua organização genética e padrões de expressão, como a estrutura genômica, replicação, propriedades de proteínas regulatórias, estruturais e acessórias,

alcançando até 65% de homologia em suas sequências de nucleotídeos, dependendo da região analisada, o que determina a codificação e a síntese de diversos produtos gênicos semelhantes (Bergeron, 1992). Mesmo com todas essas semelhanças, se diferenciam substancialmente em suas propriedades patogênicas (Casseb, 2013; Ciminale, 2014). Os subtipos 3 e 4 foram isolados em populações do sul de Camarões, os quais tiveram contato com primatas não humanos, onde o HTLV-3 apresenta origem recente a partir do vírus linfotrópico de células T em símios tipo 3 (STLV), e o HTLV-4 não apresenta equivalência ao vírus símio. Até o momento, não há estudos que comprovem a transmissão de ambos entre seres humanos, assim como não há registros de doenças associadas a eles (Calattini *et al.*, 2005; Wolfe *et al.*, 2005).

O HTLV-1 tem sido associado a várias doenças, sendo que a Paraparesia Espástica Tropical (HAM/TSP) é forma conhecida mais deletéria para o Sistema Nervoso, cursando com comprometimento motor grave, progressivo e irreversível, onde estão presentes: espasticidade, paraparesia crural, parestesia e alterações esfínterianas, dentre outras. Por sua característica viral de latência prolongada e baixa patogenicidade, apenas 2%-5% dos portadores evoluem para formas graves, e vários indivíduos apresentam outras diferentes manifestações, porém que não se enquadram nos critérios de HAM/TSP (Osame, 2002; ASIA, 1984; WHO, 1989), considerados aqui para uma melhor dicotomização do quadro clínico, como oligossintomáticos.

Apesar de ser fato que a maioria dos portadores permaneça no estado indefinido, várias outras disfunções sensitivo-motoras tem sido associadas ao HTLV-1. Além de paraparesias de membros superiores e inferiores (MMSS/MMII), tem-se encontrado hiperreflexia, espasticidade, clônus, parestesias diversas, distúrbios urinários, constipação intestinal, disfunção erétil e dor lombar, sem associação de outros sintomas que possam definir o diagnóstico de HAM/TSP. Alguns estudos tem indicado um modelo patogênico extrapiramidal (Kuate, 2006). Imagens de lesões subcorticais e periventriculares da massa branca tem sido encontradas em exames de Ressonância Magnética do encéfalo, motivo pelo qual alguns autores têm proposto a mudança do nome de “Mielopatia associada ao HTLV” para “Mieloneuroencefalopatia relacionada ao HTLV” (Dimber, 2016). Além do citado, outros distúrbios neurológicos têm sido associados ao vírus, como a neuropatia periférica e uma condição semelhante à Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) (Adry, 2012).

As habilidades do HTLV-1 em causar neuropatias estão bem reconhecidas e iniciam com o percurso através da barreira hematoencefálica (BHE), onde pode então penetrar no Sistema Nervoso Central (SNC). Estudos anteriores mostram que células podem ser infectadas pelo vírus nas formas *in vitro* e *in vivo* (Hoxie, 1984; Romero, 2000; Ho, 2012),

apresentando a capacidade de migrar através da camada endotelial por meio da indução da expressão de moléculas de adesão e seus ligantes (Romero, 2000). As interações entre os linfócitos infectados pelo HTLV-1 e as células endoteliais (CE) cerebrais infectadas podem levar a danos na BHE, sendo portanto um importante determinante na progressão da doença neurológica precedendo o desenvolvimento da inflamação do SNC (Al-Fahim, 1999).

Além disso, pesquisadores há duas décadas notaram uma aderência aumentada de linfócitos T de pacientes com HAM/TSP à células endoteliais e também presença de anticorpos anti-virais nas células endoteliais cerebrais e no soro de pacientes com doença neurológica (Ichinose *et al*, 1994). Tais estudos sugerem fortemente uma alteração da função de células endoteliais na neuropatologia associada ao HTLV-1 e atribuem a elas um papel importante na patogênese da HAM/TSP. Como consequência da invasão viral, os neurônios são infectados e os linfócitos tendem a produzir citocinas pró-inflamatórias, como TNF, IL-1 β e IL-6, que rompem as barreiras permitindo o desenvolvimento da doença neurológica devido à infiltração de linfócitos infectados no SNC, principalmente na região torácico espinhal (Curis, 2016; Kahn, 2017). Esses componentes, assim como as moléculas co-estimulatórias ligadas à membrana desenvolvem um papel relevante no aumento da adesão celular através da suprarregulação da expressão ou aumento da afinidade de certas moléculas de adesão a seus ligantes, como VLA-4/VCAM-1, cuja interação na superfície de células endoteliais é importante para transmigração de células T do sangue para outros sítios, assim como a interação VLA-4/fibronectina é importante para a migração celular dentro dos tecidos (Pinto-Mariz, 2015).

Dentre os elementos envolvidos no processo neuroinflamatório, as integrinas desenvolvem um papel importante na patogênese de danos inflamatórios musculares em decorrência do seu envolvimento na sobrevivência e proliferação de leucócitos (Rampoldi, 1986; Masumoto *et al*. 1999; Arao, 2000; Pinto-Mariz 2010, 2015). Um estudo recente registrou uma maior adesão em camadas de miotubos humanos de células CD49d^{hi}CD4⁺ e CD49d^{hi}CD8⁺ derivadas de doença de Duchenne (Pinto-Mariz, 2015). Assim, as células T CD49d^{hi} circulantes podem ser utilizadas como biomarcadores para a progressão da doença em pacientes com Distrofia Muscular de Duchenne (DMD). Sendo o HTLV um patógeno causador de doença do SNC com resultados para o músculo voluntário, entende-se que alguns dos mecanismos imunológicos causadores possam ter caminhos semelhantes, sendo parte deles objeto deste estudo.

Considerando a disseminação do HTLV-1 e fatores imunes que corroboram com este desfecho, as integrinas tem grande participação através das sinapses virológicas, as quais são compostas de moléculas de adesão e seus ligantes. Esta função é considerada uma outra forma de infecção viral, além da anteriormente conhecida transmissão célula-a-célula (Igakura, 2003; Fukushima, 2008). Estudos anteriores evidenciaram uma atividade elevada de aderência e transmigração através das células endoteliais (CE) de células T CD4⁺ ativadas com hiper expressão de LFA-1 (antígeno associado à função de linfócito) em células T do sangue periférico de pacientes com HAM/TSP (Ichinose 1994, 1996). Além disso, a interrupção da sinalização de integrinas/ligantes em linhagens de células T infectadas pelo HTLV-1 por meio de anticorpos bloqueadores anti-integrinas suprimiu significativamente a produção do vírus, o que é sugestivo da importância dessas moléculas no desenvolvimento da doença neurológica associada ao HTLV-1 (Fukushima, 2008). A molécula VLA-4 melhora o rolamento e leva ao agrupamento das células, integrando também a ativação do citoesqueleto com a matriz extracelular através da transdução de mensagens por meio de vias de sinalização clássicas, e tem extrema importância em processos celulares, como proliferação, apoptose e diferenciação (Arao *et al.*, 2000; Masumoto *et al.*, 1999). Sua interação com a fibronectina induz a proliferação linfocitária tecidual (Pinto-Mariz, 2015).

Na última década tem-se buscado respostas quanto à progressão ou não de portadores oligossintomáticos para a disfunção neuro-motora permanente e se essa evolução maligna está associada a respostas imunes, de tal forma que o estudo de fatores imunológicos interferenciais torna-se muito importante para a compreensão dos mecanismos que levam à doença do neurônio motor e servirão como auxiliares no prognóstico precoce, atuando como marcadores da HAM/TSP.

1.1 Histórico

Nas Américas, o HTLV-1 tem mais de uma origem. Foi trazido por imigrantes no período do Paleolítico através do Estreito de Bering, de outra forma através do tráfico de escravos durante o período colonial e também juntamente com a imigração japonesa do início do século 20, enquanto o HTLV-2 era apenas trazido por imigrantes através do estreito de Bering (Casseb 2015).

Em 1908, Ellerman e Beng constataram a probabilidade da origem viral de alguns cânceres, quando em seus experimentos notaram que a leucemia de galinhas poderia ser transmitida a aves da mesma espécie através da inoculação de filtrados de células tumorais. Três anos depois, Rous constatou que o sarcoma de galinhas também poderia ter a mesma forma de transmissão que o experimento anterior de Ellerman e Beng, pesquisa esta que lhe contemplou com o Premio Nobel, em 1966 (Brasil, 2013; Santos, 2015). Nas décadas seguintes, outros pesquisadores desenvolveram estudos corroborando com a ideia de característica oncogênica dos vírus, como Bittner (1936) mostrando o carcinoma mamário em camundongos transmitido de forma vertical; Friend (1957), com a descoberta de dois outros vírus relacionados à leucemia em camundongos; e Vogt & Dubecco (1954) demonstrando que células normais poderiam ser transformadas em células cancerosas quando expostas a um determinado vírus.

A década de 70 foi precursora na descoberta de vários aspectos relacionados ao HTLV. Baltimore e colaboradores (1970) descobriram uma enzima que apresentava uma função (até então desconhecida na biologia celular) de leitura de um molde de RNA viral, intermediando a partir daí a síntese de uma molécula de DNA. Em decorrência dessa função, essa enzima (DNA polimerase dependente de RNA) recebeu a denominação genérica de Transcriptase Reversa (TR), por subverter a direção usual da transferência de informação de DNA – RNA para RNA- DNA. A TR é sintetizada nos vírions em brotamento a partir das células infectadas, de modo que recuperá-la a partir de um meio de células cultivadas implicaria a presença de infecção ativa por retrovírus (Brasil 2013; Santos, 2008). Ainda no mesmo ano, Todaro trouxe para a ciência o conceito de oncogene, que foi então comprovada experimentalmente pelo grupo de pesquisa de Stehelin. Casos de leucemia de células T humanas (ATL) em indivíduos supostamente infectados por um novo retrovírus foram reportados nesta mesma década (Takatsumi & Uchiyama, 1977). No início da década de 80, o vírus linfotrópico de células T humana do tipo 1 (HTLV-1) foi caracterizado como o primeiro

retrovírus identificado em humanos, e ainda neste período, pesquisadores japoneses conseguiram fazer seu isolamento a partir de linhagem celular de linfócitos T periféricos e de células do linfonodo de um paciente portador do linfoma cutâneo de célula T, estabelecendo assim uma correlação do HTLV-1 com a Leucemia e sua característica oncogênica (Poiesz *et al.*, 1980; Hinuma *et al.*, 1981; Yoshida *et al.*, 1982). Em 1982, um segundo tipo de HTLV foi descoberto, isolado de uma linhagem de células T derivadas do baço de um indivíduo com uma forma rara de leucemia, sendo este retrovírus denominado de HTLV-2.

Em 1986, a partir de estudos soropidemiológicos, a infecção pelo HTLV-1 foi associada a uma encefalomielopatia endêmica na região do Caribe, de evolução progressiva, com perda da função motora irreversível denominada de Paraparesia Espástica Tropical (PET), e quase que simultaneamente foi associada também a uma doença neurológica prevalente em japoneses designada de Mielopatia associada ao HTLV-1 (MAH). Posteriormente, estudiosos reconheceram ambas como sendo a mesma doença devido às suas características homólogas, pelo que desde então ficou reconhecida cientificamente como PET/MAH ou, devido ao fato de que grande parte dos artigos bem avaliados são publicados na língua inglesa, tem-se utilizado com grande frequência a sigla HAM/TSP (HTLV-1 Associated Mielopathy/ Tropical Spastic Paraparesis) (Poiesz, 1980; Kron & Proietti, 2015).

Em 2005, dois novos tipos de HTLV, designados conseqüentemente de HTLV-3 e 4, foram identificados em indivíduos africanos da República de Camarões, que haviam feito contato anterior com primatas não humanos. Estes dois novos tipos apresentam diferenças estruturais entre si, onde o HTLV-3 é geneticamente semelhante ao vírus Linfotrópico de símios também do tipo 3, denominado de STVL-3, enquanto que HTLV-4 não apresenta nenhuma correspondência com os outros delta-retrovírus linfotrópicos humanos, tampouco com os símios. Ambos HTLV-3 e 4 são conhecidos através da definição da sequência do seu genoma por reação em cadeia da polimerase (PCR), tendo sua biologia, estrutura e associação a doenças ainda pouco esclarecidas (Santos, 2008).

1. 2 Epidemiologia da infecção por HTLV-1

Nas últimas três décadas, vários conhecimentos têm sido acumulados acerca da infecção pelo vírus linfotrópico de células T humano tipo 1 (HTLV-1), e dentre esses conhecimentos científicos, os epidemiológicos estão bem definidos: sua distribuição

geográfica, principais modos de transmissão, papel causal para a ocorrência de formas graves e outras doenças relacionadas; porém novas informações quanto a associação de patologias e suscetibilidade têm surgido, necessitando de estudos mais aprofundados (Proietti, 2010).

Estima-se que 15 a 20 milhões de pessoas estejam infectadas pelo HTLV-1 no mundo. Entretanto, esses resultados foram baseados em dados disponíveis de indivíduos residentes em regiões endêmicas, portanto, supõe-se que esses valores podem estar subestimados (Costa, 2014; Proietti, 2010; Romanelli, 2010; Santos, 2008).

O vírus está presente em várias regiões do mundo, tendo como característica uma alta endemicidade em determinados *clusters* populacionais (Nozuma, 2014). As taxas de soroprevalência mundial diferem, considerando a área geográfica, a composição sociodemográfica da população estudada e os comportamentos de risco individuais. A maioria dos dados sobre soroprevalência prova que estudos conduzidos em populações pouco vulneráveis, como doadores de sangue e grupos selecionados certamente não são representativos da população em geral (Ferreira, 1997; Manns, 1999). Como aproximadamente 90% dos portadores são assintomáticos e suas complicações mais conhecidas e estudadas ocorrem em cerca de apenas 5% dos infectados, a infecção é tradicionalmente relacionada a uma baixa morbidade (Gessain, 2012; Saito, 2012; Brasil, 2013).

As taxas de prevalência do HTLV-1 tem sido estratificadas em 3 níveis: alta (mais que 5% da população testada), média (5% a 1%), e baixa (menos que 1%) (Gonçalves, 2010). As principais regiões endêmicas são o sudeste do Japão, que apresenta taxas muito altas de prevalência (37%), e outros países com taxas mais baixas, porém considerados altamente endêmicos, como África Sub-saariana (5%), Caribe (6%), parte do Oriente Médio e Australo-Melanésia (menos de 5%) (Proietti, 2005, 2010; Santos, 2008; Brasil, 2013). Não há até o momento estudos que esclareçam o motivo de existirem áreas de alta prevalência junto a regiões que apresentam baixa prevalência, às vezes no mesmo país, mas há suposições de que a origem deste “quebra-cabeça geográfico” ou segmentação étnica esteja provavelmente ligada a uma ocorrência em alguns grupos onde há uma alta taxa de persistência na transmissão (Gonçalves, 2010; Gessain, 2012; Brasil, 2013). Taxas de prevalência um pouco mais baixas são encontradas em países da América do Sul. Dados da Argentina, Peru, Colômbia e Brasil são em sua maior parte, restritos a públicos selecionados, como doadores de sangue, grávidas, usuários de drogas injetáveis (UDI) e populações nativas de algumas regiões, variando em torno de 1% a 2% (Galvão–Castro, 1997; Kazanji, 2003; Leon, 2003;

Gastaldello, 2004). Em regiões não endêmicas como América do Norte e Europa, a infecção é encontrada principalmente entre imigrantes provenientes de áreas endêmicas, seus filhos e contatos sexuais, entre trabalhadores do sexo e UDI (Proietti, 2013). É interessante que independente de fatores ambientais, culturais e sócio-econômicos, a soroprevalência de HTLV-1 aumenta gradualmente com a idade, especialmente em mulheres, residentes de áreas altamente endêmicas. O crescimento global que ocorre com aumento da idade pode estar relacionado a um efeito coorte, enquanto o aumento relacionado ao sexo pode ser consequente de um acúmulo de exposições sexuais que ocorrem com a idade (Gessain, 2012).

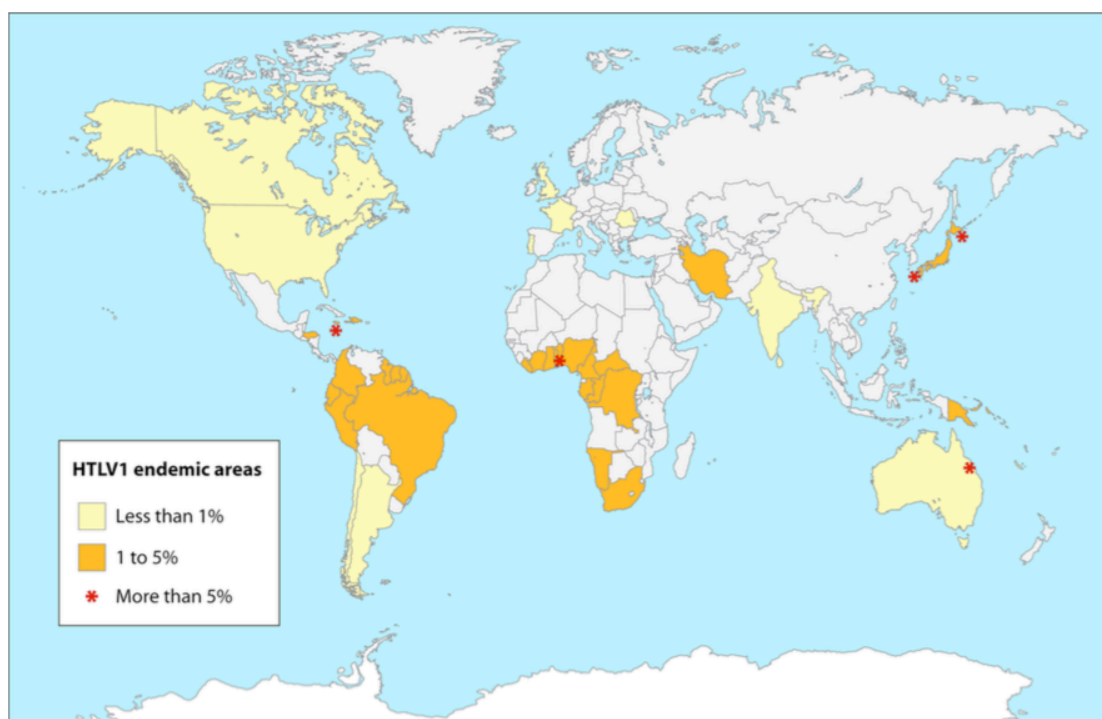


Figura 1. Distribuição geográfica da infecção pelo HTLV-1 em países onde a doença é considerada endêmica. As estrelas vermelhas definem as áreas de alta prevalência; os limites dos países mostrados no mapa não coincidem com as áreas de endemicidade, refletindo a real distribuição em clusters populacionais da infecção (Gonçalves, 2010).

1.2.1 HTLV No Brasil

O HTLV pode ser encontrado em todas as regiões brasileiras. Estima-se que haja aproximadamente 2,5 milhões de pessoas infectadas e em termos absolutos, o Brasil pode ter o maior número de soropositivos do mundo (Catalan-Soares, 2005; Romanelli, 2010). Considerando o subtipo 1, acredita-se que sua entrada no país tenha ocorrido de duas formas

principais: por meio do tráfico de escravos vindos da África; e pela imigração japonesa, que há algumas décadas foi mais intensa e é provável que tenha contribuído para o aumento da prevalência. Quanto ao HTLV-2, sua origem ocorreu de forma mais remota, e o mesmo tem sido associado à imigração de asiáticos em tempos pré-colombianos (Proietti, 2010).

Destacam-se como estados de maior prevalência do vírus, o qual tem sido encontrado principalmente nas capitais, já que ainda não sofreu interiorização: Bahia, Pernambuco, Pará e Maranhão, nesta ordem, variando de 6,7 a 10 casos para cada 1000 habitantes (Romanelli, 2010). Apesar da interiorização ocorrida com o HIV no decorrer das décadas, semelhante desencadeamento geográfico não ocorreu com o HTLV, e não foram descritas até o momento justificativas científicas para tal apresentação; é provável que as formas predominantes de transmissão sejam um fator interferencial importante. No Brasil, a soroprevalência média encontrada entre doadores aptos é cerca de 20 a 100 vezes maior do que aquela relatada para os Estados Unidos e Europa (Proietti, 2010).

O HTLV-1 tem forte associação a duas doenças consideradas graves e de comprometimento da qualidade e sobrevida: uma neuroinflamatória chamada de Mielopatia/Paraparesia Espástica Tropical (HAM-TSP) e a oncogênica denominada Leucemia de Células T do adulto (LTA/ATL) (Araya, 2014). Estudos mostram que HAM-TSP ocorre geralmente após longos períodos de incubação e é caracterizada por uma paraparesia espástica progressiva, com presença de distúrbios urinários, perda sensorial e lombalgia na ausência de compressão, injúria ou inflamação da medula espinhal, e soropositividade para anticorpos HTLV-1 (Casseb, 2008). Vários casos de HAM/TSP e ATL foram identificados no Brasil e registrados através de estudos brasileiros confiáveis. Os primeiros casos de HAM/TSP no país foram descritos em 1989 no Ceará e em São Paulo, sendo posteriormente descritos em outras regiões (Castro-Costa, 1989).

Há duas décadas várias outras doenças e eventos inflamatórios de diferentes sistemas têm sido associados ao vírus, como doenças dermatológicas, reumatológicas, oftalmológicas, respiratórias, oncológicas e mais recentemente, as autoimunes (Casseb 2008; Castro-Costa 2012; Ciminale 2014; Quaresma 2016). Uma ampla série de casos de dermatite infectiva foi descrita em pacientes brasileiros (Pombo de Oliveira, 1996; Bittencourt, 2009).

1. 2. 2 Rotas de Transmissão

Como descrito anteriormente, estima-se que cerca de 20 milhões de pessoas no mundo estejam infectadas pelo HTLV-1. Deste universo, aproximadamente 90% permanecerão assintomáticas ao longo de suas vidas. Esses indivíduos mantêm uma rede de transmissão silenciosa, onde vários comportamentos e exposições tem sido associados à soropositividade, pelas vias sexual, sanguínea e vertical. Assim, o HTLV-1 pode ser transmitido por relações sexuais, agulhas ou seringas contaminadas, pelo leite materno e pela transfusão de sangue e seus derivados (Brasil, 2013).

A forma mais frequente de transmissão do vírus em regiões endêmicas é a vertical, e desta, a amamentação tem grande impacto, devido a alta concentração de linfócitos no leite materno (Carneiro-Proietti, 2002; Mendes, 2016); nos casos onde a duração da amamentação é superior a 6 meses, estudos têm evidenciado sua associação com um maior risco de infecção, quando comparada a outras formas de transmissão (Cavalcanti, 1993; Bittencourt, 2010; Romanelli 2010).

Baseado nesta informação, entende-se que a prevenção da transmissão materno-infantil terá grande impacto na redução das doenças associadas ao HTLV-1. A triagem para HTLV-1 no pré-natal deve ser implantada em áreas geográficas específicas, combinada com aconselhamento à mães soropositivas em relação à transmissão do vírus por meio da amamentação natural (Brasil, 2013). Entretanto, em muitas áreas endêmicas, a interrupção da amamentação natural pode ter impacto na saúde pessoal e coletiva, tais como ocorrência de desnutrição e mortalidade infantil. Políticas de saúde pública devem considerar esses efeitos adversos em países menos desenvolvidos e recomendar alimentação alternativa para crianças sob risco de adquirir a infecção pelo leite materno (American Academy of pediatrics, 2012).

1. 3 Eventos determinantes da infecção pelo HTLV-1

Entende-se que o desfecho da infecção pelo HTLV- 1 não depende tão somente da porta de entrada do vírus, mas também de fatores ambientais e principalmente de fatores relacionados ao hospedeiro (Grant *et al*, 2002). Estudos mostram que quando a transmissão viral ocorre via mucosa, a população alvo é composta principalmente de células apresentadoras de antígenos (APC); por mucosa, consideramos a transmissão por aleitamento

materno e o contato via sexual, sendo tanto a mucosa gástrica quanto a mucosa genital de grande vulnerabilidade e absorção. Nas APCs, a expressão de genes virais ocorre em baixos níveis, induzindo uma fraca resposta imune do hospedeiro. Porém, quando a transmissão viral tem como porta de entrada o sangue periférico, a população alvo de infecção é constituída de células T CD4⁺ e T CD8⁺, as quais têm uma expressão elevada de genes virais, e portanto induzem uma forte resposta imune anti-HTLV, o que nos sugere que a gravidade da evolução da infecção quanto à exacerbação do sistema imune pode ser influenciada pela forma de transmissão (Figura 2). Como parte do sistema de vigilância imune, os linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ migram naturalmente para a medula óssea, podendo levar a uma invasão de células infectadas e conseqüentemente infecção de outras células, inclusive células progenitoras CD34⁺ (Martins, 2015).

Fatores socioambientais, virais e do hospedeiro são importantes para a manutenção da latência clínica. Dependendo da eficácia da resposta imune específica para o vírus em controlar a carga proviral e mantê-la num estado de equilíbrio, o portador mantém-se assintomático ou o que é mais comumente encontrado, oligossintomático. Caso o equilíbrio esperado não ocorra, as chances para o desenvolvimento de ATL ou HAM/TSP aumentam (Grant, 2002). Uma das diferenças entre ATL e HAM/TSP está na indução de uma resposta imune fraca ou forte, e o controle da carga proviral no período de latência clínica seria primordial na determinação do rumo das doenças associadas ao HTLV. Na doença leucêmica, uma resposta imune menos agressiva permite a expansão clonal das células infectadas, com acúmulo de mutações e transformação celular. Na doença inflamatória neurológica, a resposta imune seria mais exacerbada, porém incapaz de controlar a carga proviral, e desta forma, não é considerada eficaz. Com a continuidade desse perfil de resposta, aumentam as chances para o desenvolvimento da HAM/TSP (Martins, 2015).

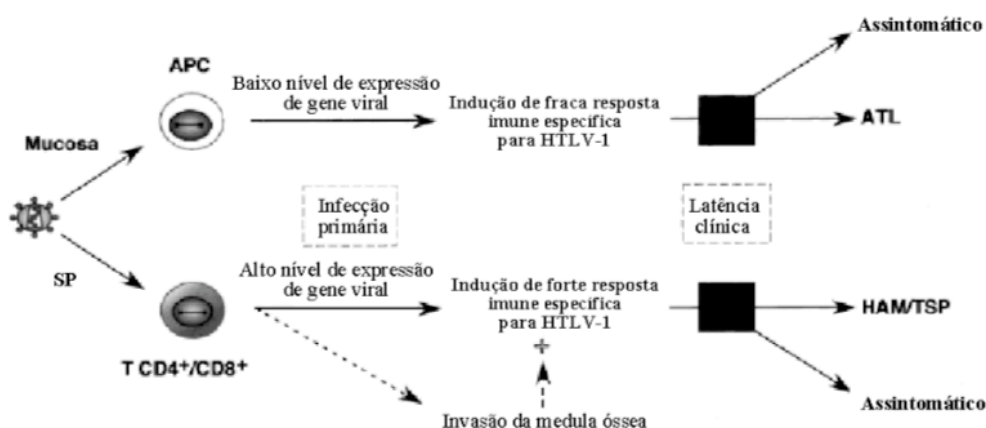


Figura 2. Eventos determinantes da infecção pelo HTLV-1. Desfecho da infecção, com desencadeamento ou não de doença. Fonte: Martins, 2015.

Em estudos sobre populações migratórias mostram que infecção pelo HTLV-1 adquirida precocemente pode ser levada por portadoras assintomáticas para uma área não – endêmica (Blattner et al, 1986; Meytes, 1990). A introdução do HTLV no Brasil ocorreu com a vinda de navios da África com pessoas escravizadas e através da imigração japonesa, advindos do sudeste do país. As comunidades escravas remanescentes no Brasil foram organizadas por escravos africanos que se mudaram para lugares remotos e estabeleceram sociedades alternativas conhecidas como quilombos. No Pará, estado que se destaca como o terceiro na prevalência brasileira de HTLV-1, assume-se que o número expressivo de japoneses e remanescentes de comunidades africanas que vivem no estado pode influenciar esses números (Edlich et al., 2000; Vallinoto, 2004; Carneiro-Proietti *et al*, 2012; Brasil, 2013, Proietti, 2015). Tais fatores socioambientais são influenciadores da manutenção do vírus em áreas pré-determinadas.

1.4 Morfologia, estrutura e características biológicas do vírus

1.4.1 Estrutura da Partícula Viral

O HTLV-1 apresenta uma construção complexa, contendo envelope, ácido ribonucleico e nucleocapsídeo. É constituído de partículas virais esféricas a pleomórficas (vírions), e sua organização genômica é composta por um core central eletrodense, que contém duas cópias de ácido ribonucleico (RNA) de fita única + enzima transcriptase reversa (RT). O envelope contém uma proteína de superfície extracelular e uma proteína

transmembrana, a qual atravessa esta estrutura e ancora na proteína de superfície (glicoproteínas). Junto à membrana do envelope, existe uma matriz protéica. A proteína Gag está adicionada de um ácido graxo. O capsídeo, de simetria icosaédrica, é composto pelas proteínas codificadoras do gene *Gag* e constitui o cerne da partícula viral (Franchini 1995; Wycuff 2001) A glicoproteína viral externa (gp 46), projeta-se na superfície viral sob a forma de 72 espículas, que se ancoram nas demais estruturas virais por meio da glicoproteína transmembrânica (gp 21) (Schupbach 1989).

O HTLV-1 é um retrovírus do tipo C e as partículas virais de HTLV-1 e HTLV-2 podem ser visualizadas somente pela ultramicroscopia. Diferentemente da infecção pelo HIV-1, não são detectadas com facilidade partículas virais, livres, de HTLV-1/2 no sangue ou em outros fluidos biológicos de indivíduos infectados, acreditando-se, assim, que as partículas virais sejam, exclusivamente, associadas aos linfócitos infectados.

1.4.2 Características Morfológicas e Taxonômicas

O HTLV, agente viral pertencente ao gênero Deltaretrovirus, da família *Retroviridae*, é envelopado, apresenta tamanho médio de 100 a 140 nm de diâmetro, com um core central denso, medindo 80 a 100 nm. Ele possui a morfologia de uma partícula viral semelhante àquela encontrada nos retrovírus tipo C de mamíferos.

Como citado acima, o HTLV, juntamente com o STLV (Simian T-cell Lymphotropic Virus), é classificado como um deltarretrovírus. Estudos filogenéticos mostraram grande similaridade entre os dois vírus e a ampla distribuição geográfica do STLV contribui para a hipótese de que este último tenha sido introduzido em humanos em múltiplas ocasiões no passado (Brasil 2013).

Seu core constitui o núcleocapsídeo, que contém no seu interior duas cópias de RNA, sendo portanto um genoma do tipo diplóide, de fita simples e polaridade positiva, associadas a uma molécula de RNA transportador (RNAt), que é responsável por iniciar a síntese de DNA. O nucleocapsídeo contém, além das estruturas citadas, 3 enzimas importantes para o processo da replicação viral e da infectividade, que são protease, integrase e transcriptase reversa, codificadas por uma região que compreende parte da extremidade 3' da região *Gag* e parte da extremidade 5' da região *Pol*, gerando o precursor *Gag-Pol*. A protease sofre autoativação e autoclivagem, gerando a molécula ativa, responsável pelo processamento dos produtos do gene *Gag* e *Gag-Pol*; a integrase é responsável pela catalisação e integração do DNA viral ao

genoma da célula hospedeira permitindo então a produção de proteínas virais; a transcriptase reversa já é trazida pelo retrovírus pronta para dar início ao processo infeccioso, sendo responsável pela transcrição do RNA viral de fita simples em DNA de dupla fita para ser integrado ao genoma celular, originando o genoma viral ao qual denominamos de provírus (Santos, 2008).

Os retrovírus apresentam uma estrutura genômica com LTR-gag-pol-env-LTR ou LTR- δ gag-onc- δ env-LTR, enquanto que o HTLV apresenta uma estrutura genômica com LTR-gag-pol-env-pX-LTR. Além dos genes estruturais comuns aos retrovírus (gag, pro, env e pol), o HTLV possui uma região denominada de pX, possivelmente um gene transformador que seria responsável pela oncogênese, o qual exibe áreas de leitura chamadas de *open reading frames* (ORF), codificadoras de proteínas como as reguladoras Tax, Rex e HBZ, além de outras com função ainda não totalmente definidas. O genoma viral ainda apresenta, em suas extremidades, duas regiões denominadas de LTR (Long Terminal Repeats), que constituem sequências repetitivas, sem função de codificação (Santos 2008; Brasil 2013). Tais sequências terminais estão localizadas nas extremidades 5'e 3'do genoma viral, e ambas contêm os promotores virais e outros elementos regulatórios para que a replicação viral e a infecção ocorram. A extremidade 3' do provírus, conhecida como região pX citada acima, codifica a fosfoproteína Tax, denominada como p40 para o HTLV-1 e como p37 para o HTLV-2, a qual serve como transativadora da transcrição viral. A proteína Rex, designada como p27 para HTLV-1 e p26 para HTLV-2, é também uma fosfoproteína e atua como reguladora pós-transcricional do genoma do HTLV ao controlar o *splicing* do RNAm viral. Tanto Tax quanto Rex são responsáveis pela alteração nas funções celulares ocorridas após a infecção viral. HBZ é reconhecida como peça-chave na patogênese de HTLV-1, pois sua expressão em células infectadas parece ser fundamental para a progressão ATL e HAM/TSP (Murphy, 2016).

O HTLV-1 apresenta 6 subtipos reconhecidos (subtipos de A a F). Diversos estudos têm sido desenvolvidos em relação ao HTLV-1, porém a maioria de suas variantes apresenta um papel minoritário sobre o estado epidemiológico do vírus. A grande maioria das infecções são causadas pelo subtipo A - cosmopolita, e não há registros da influência de um subtipo sobre o potencial patogênico do HTLV-1 (Gonçalves, 2010).

1.5 Imunopatogênese

A patogênese da infecção causada pelo HTLV-1 tem sido associada a uma elevada carga viral e a uma ativação intensa da resposta imune tipo 1 conforme pode se constatar nos pacientes com HAM/TSP e ATL, embora a história natural da doença ainda não tenha sido totalmente esclarecida (Brasil 2013). O vírus infecta, preferencialmente, células linfóides periféricas, predominantemente linfócitos T CD4⁺ de memória (CD45RO⁺) e com uma menor frequência linfócitos T CD8⁺, observando-se inicialmente um padrão policlonal de integração proviral onde as células infectadas são transformadas e imortalizadas pelo vírus *in vitro*, tornando-se capazes de proliferar independentemente do estímulo de IL-2 exógena na cultura (Chen, 1983). A infecção de células dendríticas e gliais tem sido demonstrada, porém o mecanismo de participação na propagação da infecção não foi plenamente esclarecido (Santos, 2008). Estudos demonstraram recentemente uma dissociação entre a resposta inflamatória e a habilidade microbicida de macrófagos em indivíduos infectados pelo HTLV-1, secretando grande quantidade de quimiocinas, mesmo em culturas sem estímulo (Amorim, 2014).

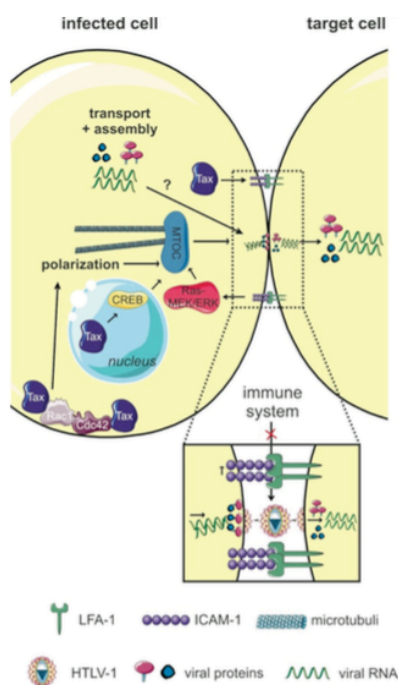


Figura 3. A infectividade do HTLV ocorrendo pelo mecanismo célula-a-célula. Fonte: Santos, 2008.

Até o momento, não há estudos que mostrem a detecção de partículas virais no soro humano de indivíduos infectados. Justifica-se que a infectividade de partículas livres é muito

pequena em comparação a de células infectadas; como o HTLV infecta principalmente células T CD4⁺ *in vivo*, tem se estabelecido que para uma infectividade eficaz de células T CD4⁺, é necessário um contato célula-a-célula (Figura 3), já que a transmissão viral livre é ineficiente (Gross, 2016). No entanto, outras células vêm sendo descritas como alvo da infecção pelo HTLV como, células dendríticas e mielóides. Modelos de patogênese atuais consideram que a via de penetração do HTLV possa ser um evento importante na determinação do desfecho da infecção viral, por causa da população alvo na infecção primária e consequente tipo de resposta imune que seria desencadeada (Kroon & Proietti, 2015).

O DNA proviral pode ser transmitido de uma célula a outra por proliferação da célula infectada, mas também por um mecanismo de “sinapse viral”, quando o vírus induz eventos de polarização das células e facilita a junção de células infectadas àquelas não infectadas, facilitando a passagem viral (Bangham, 2005). Portanto, dois tipos de contatos célula-a-célula têm sido reconhecidos de grande relevância para a transmissão do HTLV-1, que são: as junções oclusivas (*tight junctions*) e os condutos celulares (*cell conducts*). Mais dois mecanismos não exclusivos de transmissão viral por contato celular têm sido propostos: (1) brotamento polarizado do vírus em fendas sinápticas; e (2) transferência de superfície celular de biofilmes virais em sinapses virológicas (Gross, 2016). Além da transmissão por contato célula-a-célula, a disseminação do HTLV-1 para as células pode ainda ocorrer por meio da sinapse virológica, que é composta de moléculas de adesão, como integrinas e seus ligantes (Igakura, 2003).

Em contraste às células T CD4⁺, as células dendríticas podem ser infectadas livremente e, de uma forma mais ampla, via biofilmes virais *in vitro*. A transmissão célula-a-célula do HTLV-1 exige uma ação coordenada de passos durante o ciclo infeccioso viral com eventos no processo de adesão célula-a-célula; portanto, a propagação do vírus depende de interações específicas entre as proteínas celular e viral (Gross, 2016).

Após a transmissão do vírus, a transcriptase reversa gera um DNA proviral originado de um RNA viral genômico, e o provírus passa a ser integrado ao genoma do hospedeiro via integrase viral. A incorporação do HTLV-1 no genoma de células T CD4⁺ pode resultar em uma infecção silenciosa, em que, apesar de sequências do HTLV-1 estarem presentes na célula hospedeira, os RNAs mensageiros (RNAm) virais não são detectáveis. Nesse caso, se o genoma não é inserido em genes críticos, a célula infectada é funcionalmente indistinguível da célula normal.

Após essa fase, a infecção pelo HTLV-1 passa a se disseminar por divisão celular, com produção mínima de partículas. Portanto, a quantificação do provírus reflete o número de células infectadas, o que se traduz na carga proviral (CPV). Os resultados de Western Blot classificados como indeterminados, mas que posteriormente são confirmados como soropositivos, estão associados a baixas cargas provirais. Além dessa associação, foi encontrada forte correlação entre a carga proviral e o gênero, com níveis mais elevados de CPV em homens (Vakili 2013; Canepa, 2015).

Apesar do tropismo do vírus pelas células T CD4⁺ e T CD8⁺, para que ocorra algum tipo de lesão, é preciso que haja susceptibilidade e permissividade celular. Contudo, ainda que a célula esteja suscetível e permissiva, a infecção pode não ocorrer em virtude da dificuldade do HTLV-1 em interagir com o tecido – alvo, o que chamamos de acessibilidade. Finalmente, a infecção ainda assim pode não ocorrer mesmo que a célula seja acessível, permissiva e suscetível, devido às defesas imunológicas presentes no local da infecção (Santos, 2008).

1.5.1 Proteínas Virais

a) Proteína Tax

A fosfoproteína Tax tem sido reconhecida como a mais importante no processo regulatório e de replicação viral, funcionando como um agente principal no desenvolvimento das diferentes doenças e como peça chave para a transformação celular HTLV-1-induzida, que é suficiente para imortalizar as células T *in vitro* (Martins *et al.*, 2015; Gross, 2016). Além das funções descritas, ela desenvolve outros papéis importantes para a perpetuação da infecção, como a regulação na expressão de genes virais; interação com fatores de transcrição celulares e moléculas de sinalização; indução no aumento da expressão de várias citocinas e receptores envolvidos no crescimento e proliferação de células T; e inibição de reparos do DNA e dos eventos de morte celular programada (Ferreira, 1997; Martins, 2015). A proteína Tax também é conhecida como modulador da expressão genética celular envolvida na proliferação de linfócitos T principalmente através da ativação de vias NFκB e AP-1, e ainda tem como propriedade a capacidade de desviar a célula dos check points do ciclo celular, afetar a resposta do DNA ao dano e vias de apoptose, estando associada ao acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas e modificações na estabilidade do RNA (Matsuoka, 2011; Peres, 2015).

Um aumento do número de células infectadas pelo HTLV-1 por meio da divisão celular, utilizando ações de genes virais acessórios, especialmente a proteína Tax, podem levar a um aumento na infectividade (Gonçalves, 2010). No comprometimento neurológico, estudiosos mostraram que a patogênese está diretamente relacionada com a invasão de linfócitos infectados no SNC, ocorrendo como consequência uma resposta inflamatória local crônica (Afonso, 2008; Miller, 2012). A proteína Tax participa ativamente desse processo, capacitando as células infectadas em transpor a barreira hematoencefálica, e simultaneamente desempenha o papel de alvo da resposta imune (Martins, 2015).

A proteína Tax-1 também induz à senescência celular. Sua potente ativação crônica de IKK/NF- κ B tem sido frequentemente relacionada à transformação celular e ao desenvolvimento da leucemia. Paradoxalmente, a expressão da Tax leva rapidamente a suprarregulação dos inibidores de CDK, p21 and p27, e o aumento exacerbado dessas proteínas induz a uma senescência celular conhecida como “senescência rápida Tax-induzida” (Tax-IRS). Estudos demonstraram recentemente que Tax-IRS é uma resposta celular desencadeada por uma hiperativação de NF- κ B Tax-mediada. A intensa suprarregulação de p27 e p21 que leva a senescência é, portanto, o efeito *down-stream* NF- κ B hiperativado (Ho, 2012).

b) Proteína Rex

Outra proteína viral regulatória considerada essencial para a replicação do HTLV é a proteína Rex, a qual tem a função de regular a expressão de genes virais com eventos pós-transcricionais (Chen, 1983). Ela possui importante papel na patogênese viral, tanto para o HTLV-1 quanto para o HTLV-2, uma vez que reconhece um elemento de resposta específico em RNAs mensageiros parcialmente processados. A proteína Rex estabiliza estes mensageiros, inibindo o seu processamento completo e degradação, e utiliza um sistema celular (CRM-1) para exportá-los do núcleo ao citoplasma. É considerada indispensável para os processos de multiplicação, infecção e disseminação viral, pois regula a indução das fases latente e produtiva do ciclo celular do HTLV. Na ausência desta proteína, o controle da expressão pós-transcricional de proteínas estruturais e enzimas virais seria severamente reprimido, tendo como consequência ciclos de replicação virais não produtivos (Younis & Green, 2005).

Ambas proteínas Tax e Rex são essenciais para a replicação viral. Enquanto a primeira aumenta a síntese do RNAm viral através da transativação do promotor de HTLV-1, o qual encontra-se localizado na extremidade LTR- 5', a proteína Rex controla a síntese das proteínas estruturais em nível pós-transcricional (Kashanchi, 2005), e ambas podem interferir com as funções da célula hospedeira em diferentes níveis, ao afetar a transcrição e a tradução de vários genes celulares (Martins, 2015).

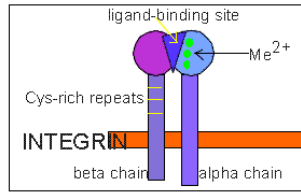
c) Proteína Hbz

A proteína fator zipper de leucina básico do HTLV-1, denominada de Hbz, é constituída de um transcrito produzido a partir do promotor 3'LTR na fita negativa do provírus, e tem despertado o interesse de estudiosos devido a sua forte correlação com a progressão da HAM/TSP. Os níveis de expressão de HBZ, mas não de Tax, tem sido associados à disfunção motora nos pacientes com a forma grave neurológica (Martins, 2015).

A análise da expressão de mRNA de Tax e HBZ em pacientes com HAM/TSP mostrou que a carga de mRNA de HBZ, mas não de Tax, foi significativamente maior em indivíduos com HAM/TSP com piores índices de incapacidade motora. Portanto, apesar de ser comprovado que a proteína Tax é um marcador de risco para HAM/TSP, os dados sugerem que HBZ poderia ser usado como um marcador de substituição para a progressão de HAM/TSP, indicando que ambos os genes tem importantes, mas distintos papéis na patogênese da HAM/TSP. No entanto, ainda não está claro qual é o papel de HBZ no comprometimento da função motora (Andrade *et al.*, 2013).

1.5.2 Migração Celular e Moléculas de Adesão

As integrinas são receptores de superfície celular que mediam a adesão à matriz extracelular (MEC) e as interações célula-célula. A maioria das células expressa várias integrinas que reconhecem uma gama de ligantes associados à superfície celular e MEC. As integrinas individuais geralmente ligam mais de um ligante e desempenham vários papéis na diferenciação e comunicação celular. Tais moléculas são heterodímeras de subunidades alfa e beta, como visualizado abaixo:



Fonte: <http://www.cryst.bbk.ac.uk>

Integrinas são moléculas de sinalização capazes de realizar a transdução de mensagens por vias de sinalização clássica, graças a sua estrutura molecular, sendo consideradas intermediadoras na comunicação entre o citoesqueleto celular e proteínas plasmáticas ou da matriz extracelular por meio da adesão célula-a-célula através de interações com outras proteínas de membrana. Devido a suas características, são consideradas moduladores-chave da proliferação, migração, longevidade e ainda, da manutenção das funções específicas de diferenciação celular (Avraamides, 2008; Ferraz, 2014).

Os processos de embriogênese, cicatrização, inflamação e câncer sofrem influência das integrinas devido às interações entre célula e matriz extracelular que atuam no controle de diferenciação celular, morfogênese, proliferação e migração. Muitas dessas interações junto à matriz extracelular são mediadas pelas integrinas, que pertencem à família de moléculas de adesão celular. Além de estarem envolvidas em processos de adesão, também participam ativamente da movimentação celular; portanto, mudanças na sinalização proporcionada pelas integrinas podem contribuir para diferentes estados patológicos, como metástase, angiogênese e doenças inflamatórias (Kumar, 1998; Jones, 1999; Chung, 2004; Mitra, 2005).

As integrinas sofrem adaptação para que ocorra a transmissão de informações do meio extracelular para dentro da célula devido a sua estrutura molecular onde os domínios citoplasmáticos são capazes de interagir com o citoesqueleto de diferentes modos, deliberando respostas celulares que poderiam ser iniciadas por meio da ligação de até mesmo um único ligante (Jones, 1999).

O papel das integrinas no sistema imune

O envolvimento das integrinas no tráfego de leucócitos da corrente sanguínea para o tecido extravascular em locais de inflamação ativa ou até mesmo durante a vigilância

imunológica tem sido amplamente reconhecido (Von Adrian, 2000; Yonekawa, 2005). Quando os leucócitos percorrem o sistema vascular por meio de uma cascata de acontecimentos que envolvem uma série de receptores de moléculas de adesão e migração, as integrinas desempenham papel fundamental nos processos inflamatórios ou infecciosos, pois moléculas medeiam a retenção destes leucócitos no endotélio inflamado, além de coordenar a transmigração através da membrana basal, permitindo o deslocamento ao local da infecção ou sítio da inflamação (Ley, 2007; Abraham, 2009). Neste processo, a interação VLA-4/VCAM-1 das células endoteliais é importante para a transmigração de células T do sangue, e a interação VLA-4/fibronectina o é para a migração dentro dos tecidos (Pinto Mariz, 2015).

Ainda durante uma resposta inflamatória, os leucócitos primeiramente rolam ao longo do endotélio de vênulas pós-capilares, prendem-se firmemente e migram ao longo da superfície do endotélio, realizando diapedese entre as junções endoteliais. Estas etapas de adesão, movimentação e migração transendotelial são resultantes da interação de receptores de leucócitos e endotélio distintos em uma cascata de adesão. Paralelamente, citocinas e quimiocinas estimulam as integrinas de modo que ocorra uma rápida conformação, tornando-as com maior afinidade ao seu ligante e possibilitando ainda uma resposta mais rápida dos leucócitos durante processos inflamatórios (Ferraz, 2014).

A importância das integrinas na infecção pelo HTLV-1

Sendo as integrinas responsáveis pela migração de linfócitos para o sítio da lesão e as células T pela interação com a matriz extracelular por meio dos receptores de integrinas, entende-se que tais interações afetam tanto a localização, quanto a proliferação celular. A importância dessas interações em doenças induzidas por retrovírus, entretanto, ainda permanece pouco esclarecida. Porém, apesar das integrinas estarem notoriamente envolvidas em vários processos infecciosos, é difícil determinar qual especificamente tem importância e seu papel determinante na patologia, já que as doenças são multifatoriais e tais moléculas são apenas um dos vários tipos de receptores envolvidos. Além disso, muitas células possuem várias integrinas que exibem propriedades de ligação complementares (Cox, 2010).

Estudos comprovam que as integrinas encontram-se supra-reguladas no endotélio da barreira hematoencefálica em doenças como a Esclerose Múltipla, promovendo intenso tráfego leucocitário para o SNC (Curis, 2016). Células T CD4⁺ e T CD8⁺ expressando níveis elevados da cadeia alpha-4 da integrina VLA-4 (CD49d^{hi}) e alpha-5 da integrina VLA-5 (CD49e^{hi}), ambas receptoras de fibronectina, foram encontradas no sangue periférico de

pacientes com Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) (Pinto Mariz, 2010). Mais recentemente, células T CD49d^{hi} foram reconhecidas como biomarcadores para progressão da perda funcional na distrofia (Pinto Mariz, 2015).

A habilidade do vírus em causar neuropatias inicia-se com o percurso através da barreira hemato-encefálica, por onde consegue então penetrar no tecido nervoso. Células infectadas pelo HTLV-1 têm maior capacidade para migrar através da camada endotelial da barreira hemato-encefálica, por induzirem a expressão de moléculas de adesão como LFA-1, ICAM-1 (molécula de adesão intracelular-1), VCAM-1 e VLA-4 (Romero et al, 2000). A Paraparesia Espástica Tropical então se desenvolve como consequência de um intenso processo inflamatório mediado pela secreção de citocinas e linfócitos T recrutados para o sítio da lesão.

Sob condições normais, a BHE é capaz de suportar um determinado volume de tráfego de linfócitos para o parênquima neural. Diante de doenças inflamatórias, entretanto, o grau de migração linfocitária através desta barreira está claramente hiperregulado. Em geral, o extravazamento de linfócitos é orquestrado por uma variedade de fatores, como o estado de ativação celular e o repertório de moléculas de adesão expressas pelo endotélio vascular local (Devine, 1996).

Ichinose em seus estudos (1994; 1996; 1997) identificou, em células T do sangue periférico de pacientes com HAM/TSP, um aumento na migração de células T CD4⁺ ativadas para o endotélio, os quais foram associados ao aumento da expressão de LFA-1 nos linfócitos. Tais achados sugerem que a sinalização induzida pela interação integrina/ligante é hiperregulada em células T CD4⁺ no sangue periférico de pacientes com HAM/TSP.

A integrina VLA-4; α 4b1 (CD49d⁺) é expressa em células T, B e outras células do sangue periférico mielóide-derivadas. Tal integrina é necessária para o fenômeno de migração através da barreira hematoencefálica, sendo demonstrada em estudos prévios sua importância para a patogênese da autoimunidade do SNC (Lehmann-Horn *et al.* 2015, 2016). A infecção pelo HTLV-1 *per se* aumenta a expressão da integrina VLA-4 nos linfócitos (Dhawan 1993; Al-Fahim *et al.* 1999). Portanto, altos níveis de frequência de CD49d⁺ indicam que essas células são preferencialmente infectadas pelo HTLV-1 e possuem maior capacidade de migrarem para o SNC.

Nos últimos anos, autores têm mostrado rotas migratórias atípicas de células imunes em direção a barreiras parenquimatosas do SNC (Engelhardt and Sorokin, 2009; Wilson *et al.*, 2010; Schneider-Hohendor, 2010; Laroche *et al.*, 2011; Engelhardt and Ransohoff, 2012; Alvarez *et al.*, 2013). Anticorpos monoclonais terapêuticos que interferem no tráfego celular

têm sido descritos, como, por exemplo, no tratamento da Esclerose Múltipla com anti-VLA-4 (Yednock et al., 1992; Polman et al., 2006). O tráfego linfocitário para o SNC diante do bloqueio VLA-4 pode ocorrer por meio de moléculas de adesão alternativas, como a glicoproteína ligante-1 P-selectina (PSGL-1) e a molécula de adesão celular de mielomas (MCAM), esta última representando uma via exclusiva para células Th17 migrarem até a BHE. Autores sugerem que um bloqueio concomitante de VLA-4 e MCAM pode ter um efeito mais potente que o bloqueio de VLA-4 isoladamente ou ainda pode ser considerado um tratamento alternativo em casos onde o bloqueio da migração de células Th1 é insuficiente para aliviar os sintomas clínicos (Varrin-Doyer *et al.*, 2012; Kieseier *et al.*, 2013).

Outras integrinas também desenvolvem papel importante na migração de linfócitos infectados. A molécula de adesão leucócito-celular ativada (ALCAM) quando apresenta-se pouco expressa em células do endotélio de vasos umbilicais primários, leva à redução da transmigração de monócitos; no caso de hiperexpressão no endotélio ou epitélio, aumenta o extravazamento celular e metástase (Curis, 2016).

A fibronectina, por suas funções adesivas, atua em diversos processos patológicos e é responsável pela orientação da migração celular na embriogênese, atuando também na homeostase. Pesquisadores na década de 90 comprovaram que a infecção aguda de linfócitos do sangue periférico aumentou a expressão das integrinas $\alpha_5\beta_1$ e $\alpha_4\beta_1$. Anticorpos utilizados para as subunidades α_4 , α_5 , e β_1 inibiram a ligação de células infectadas à fibronectina (Dhawan *et al.* 1993). A infecção pelo HTLV-1 é associada a um aumento na expressão de receptores de fibronectina em linfócitos do sangue periférico. As alterações relacionadas ao HTLV-1 que atingem moléculas de adesão da superfície celular podem contribuir para a proliferação anormal e localização atípica de células T infectadas ou ativadas, em direção ao SNC de pacientes com HAM/TSP.

1.5.3 Citocinas Inflamatórias e Regulatórias no Processo de Comprometimento Neurológico

A produção de citocinas foi atribuída principalmente aos linfócitos T CD8⁺ HTLV-1-específicos, assim como a porcentagem de proliferação de células T CD8⁺ é de duas a cinco vezes maior que o número de células T CD4⁺ (Best, 2006). Recentemente, foi evidenciado que as células T CD8⁺ desenvolvem um papel importante na progressão de doenças associadas ao HTLV-1 em termos de citotoxicidade ou liberação de fatores solúveis. Entretanto, o DNA proviral e a carga proviral têm sido apontados como fatores principais

nessa desordem (Jacobson, 2002).

Citocinas Inflamatórias

Classicamente, a infecção pelo HTLV-1 pode levar ao aumento da proliferação de células T, secreção de interleucina-2 (IL-2) e da expressão de IL-2R. A ativação mediada pelo vírus nas células T provavelmente é induzida pela proteína viral Tax, levando à ativação transcricional, vias de sinalização de transdução, controle do ciclo celular e apoptose. Estas propriedades da proteína Tax podem explicar a habilidade do vírus em se perpetuar no hospedeiro, o que os autores chamam de “imortalização das células T”.

Assim como a carga proviral, as citocinas estão envolvidas na patogênese da infecção pelo HTLV-1, principalmente na presença de HAM/TSP, como IL-2, IL-4, IL-10, IL-12 p70, IFN- γ e TNF (Montanheiro, 2009). Da literatura existente, não está claro qual desses marcadores está associado primariamente com a mielite e quais deles são secundários, refletindo a incerteza sobre a questão se a patogênese da HAM/TSP é conduzida por altas cargas provirais ou por reações pró-inflamatórias do hospedeiro contra o vírus (Best, 2006). Estudos indicam que tanto citocinas Th1 quanto Th2 estão aumentadas na infecção pelo HTLV-1 (Carvalho, 2001; Santos, 2004).

Muitas doenças estão associadas ao HTLV-1, como as desordens inflamatórias multiorgânicas, dentre elas miosites, uveítes, artrites, alveolites e dermatites, causando como consequência distúrbios no sistema imune do hospedeiro. As citocinas com maior envolvimento na patogênese do HTLV-1 são produzidas por células tipo Th1 e desenvolvem um papel crítico na imunidade celular. Níveis elevados de citocinas Th1, como IFN- γ , TNF, IL-2, e IL-6 têm sido encontrados tanto no sangue periférico quanto no líquido cefalorraquidiano de pacientes infectados (Gonçalves, 2010). Alguns estudos mostram que o IFN- γ está aumentado tanto nos assintomáticos quanto nos sintomáticos, porém de forma mais expressiva nos portadores de HAM-TSP. A citocina IL-2 mostra-se aumentada nos pacientes assintomáticos (Montanheiro, 2009).

Células T Regulatórias

As células Treg apresentam duas características que contribuem para a sobrevivência e proliferação pós-infecção pelo HTLV-1: possuem efeitos supressores imunes que se efetuam através de um contatos dependente e independente de células, fazendo com que as células Treg infectadas pelo HTLV-1 se tornem mais resistentes à morte pelas CTLs específicas para o HTLV-1 em relação às células T não regulatórias, resultando na sobrevivência preferencial de células Treg infectadas *in vivo*. A alta capacidade proliferativa das células Treg é a segunda característica importante para o HTLV-1, resultando em uma expansão de células infectadas na sua própria população (Satou & Matsuoka, 2013). Foi observado em estudo *in vivo* de linfócitos T que as células Treg FoxP3⁺ foram extremamente proliferativas com um tempo de duplicação de oito dias. Esta propriedade hiperproliferativa de T CD4⁺ FoxP3⁺ pode ser um dos mecanismos desencadeadores da expansão clonal, o que também pode justificar a inflamação crônica e/ou deficiência imunitária em indivíduos infectados assintomáticos (Martins, 2015).

A IL-2 parece ter papel importante no desenvolvimento das células Tregs. Experimentos com murinos demonstraram que a deficiência tanto da citocina quanto do receptor, resultou em defeitos graves de Tregs. Mecanismo similar também foi observado em pacientes com deficiência congênita da molécula CD25 (Piccirilo, 2008).

Outros receptores de superfície descritos nas Tregs são CD27, Fas, CD62L; e os receptores de quimiocina CCR6, CCR7, CCR8 e CD103, o que permite a migração das Tregs até o local de inflamação. Entretanto, nenhum destes marcadores é exclusivo desta subpopulação celular, uma vez que refletem também o estado de ativação do linfócito T. A descoberta do fator de transcrição FoxP3, crucial no desenvolvimento e função das Tregs, permitiu caracterizar melhor estas células. Sendo o FoxP3 um marcador nuclear, o receptor de IL-7 (CD127), que é regulado negativamente pelo FoxP3, tem sido descrito como um marcador de superfície fidedigno para selecionar as Tregs dentre a subpopulação de linfócitos T, além de caracterizar aquelas com maior função supressora (Mescouto, 2009).

1.5.4 Carga Proviral

Os parâmetros que influenciam a carga proviral e como ela se comporta ao longo da infecção pelo HTLV ainda são questões que não estão completamente resolvidas. A partir do momento em que o vírus se integra ao genoma do hospedeiro, ele passa a desenvolver um

longo período de latência. Diante disso, a carga proviral (CPV), associada a uma determinada quantidade de células infectadas e a hiperexpressão de citocinas pró-inflamatórias, podem ser bons marcadores de prognóstico e monitoramento para o desenvolvimento de doenças relacionadas ao vírus e também para a eficiência terapêutica (Furukawa, 2003). Conseqüentemente, a CPV parece um marcador virológico válido para o monitoramento da infecção e o estado assintomático ou progressivo para formas graves, entretanto o impacto desse fator isoladamente na progressão para doenças relacionadas não está plenamente esclarecido (Akbarin, 2013). Apesar da grande variedade de estudos com HIV e a influência da carga viral na progressão para AIDS, poucos estudos acerca da CPV no HTLV-1 e seus impactos clínicos têm sido publicados.

A carga proviral do HTLV-1 é medida, na maioria das vezes, em células mononucleares do sangue periférico (PBMC), e é caracteristicamente alta quando comparada à infecção por outros vírus. Embora os números variem muito de um indivíduo para outro, sua média num portador assintomático é significativamente mais baixa que em pacientes com ATL, HAM/TSP ou outras doenças de caráter inflamatório, embora alguns estudos tenham evidenciado a possibilidade de ocorrer equivalência desses valores entre esses grupos em alguns casos (Furokawa, 2003; Montanheiro, 2009; Martins, 2015). Para estabelecer um ponto de corte, Gonçalves (2008) considerou a CPV como baixa se inferior ou igual a 1%; média entre 1 a 5%; e alta, acima de 5% das células infectadas.

Recentemente foi evidenciado que as células T CD8⁺ desenvolvem um papel importante na progressão de doenças associadas ao HTLV-1 em termos de citotoxicidade ou liberação de fatores solúveis. Entretanto, o DNA proviral e a carga proviral têm sido apontados como fatores principais na evolução do quadro clínico (Jacobson, 2012).

Em muitas infecções, a CPV pode indicar o grau de replicação viral e frequentemente sugere a possibilidade de causalidade de danos para o hospedeiro ao longo dos anos de infecção (Montanheiro, 2005) (Figura 4). A carga pró-viral de indivíduos que desenvolvem ATL tende a ser mais elevada que aqueles com HAM-TSP e assintomáticos (Akbarin, 2013).

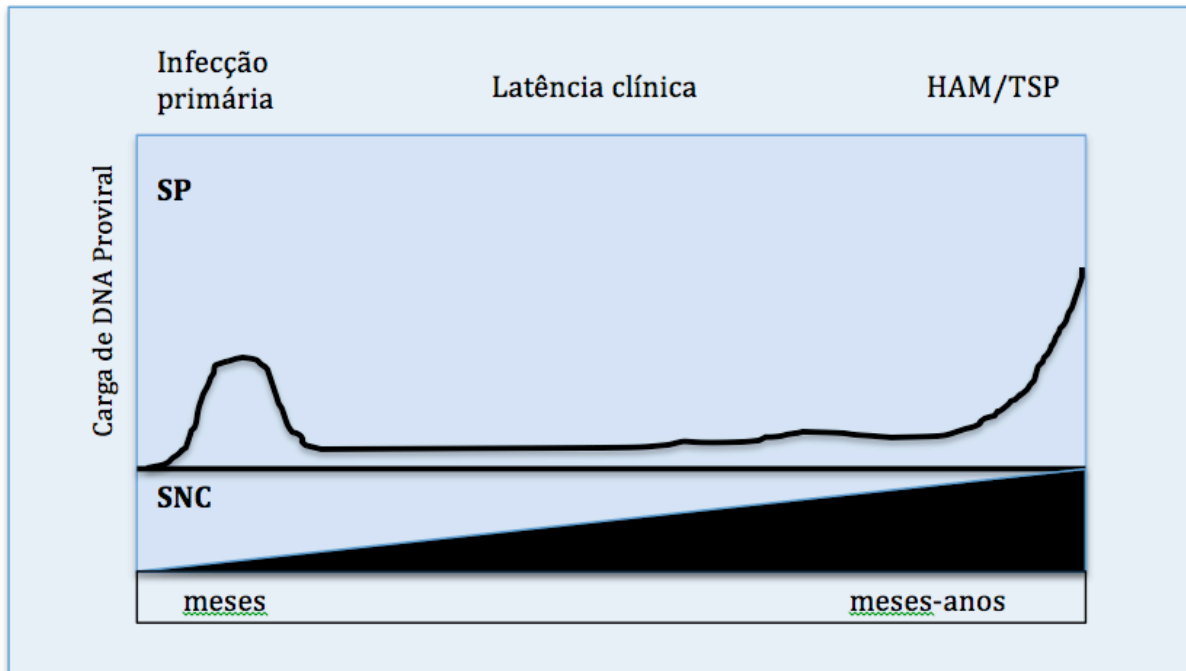


Figura 4. Modelo de evolução da carga proviral do HTLV-1 no curso da infecção. Enquanto a carga proviral se mantém estável no sangue periférico (SP) ao longo da infecção, sua elevação no Sistema Nervoso Central (SNC) pode desencadear como desfecho a HAM/TSP. Adaptado de Grant *et al*, 2002.

Um dos fatores comprovadamente associados com um maior risco de desenvolver HAM/TSP é a alta carga proviral, condição esta que se potencializa quando associada a altos títulos de anticorpos em pessoas do gênero feminino. Estudos imunogenéticos revelam que indivíduos que possuem o gene HLA-A02* têm menor carga proviral e, conseqüentemente, menor chance de desenvolver HAM/TSP (Brasil, 2013). Além disso, uma carga proviral elevada também parece ter importância no desenvolvimento da uveíte (Ono et al, 1998; Kamoi, 2012; Lima, 2016) e da artrite reumatóide (Yakova et al, 2005).

A relação entre a resposta imune celular específica, presença de doença neurológica e carga proviral ainda não foram suficientemente investigadas. Alguns estudos evidenciaram que a infecção pelo HTLV-1 *per se* não é suficiente para causar HAM-TSP, porém fatores adicionais são muito importantes na progressão da doença motora, como interação vírus-hospedeiro, carga proviral e haplótipos HLA, como o HLA-DR (Montanheiro, 2005).

Em estudo anterior sobre a carga proviral no leite materno verificou-se que esta era significativamente maior em mães que transmitiram o HTLV-1 para os seus filhos do que

naquelas que não o transmitiram, independentemente da duração da amamentação. A incidência da infecção aumenta com a carga proviral no leite materno (Brasil, 2013); portanto, uma carga proviral menor que 0,18% foi associada a uma incidência de 4,7/1.000 infecções por mês, enquanto uma carga proviral de mais de 1,5% acarretou uma incidência de 28,7/1.000 infecções por mês (Furnia, 1999).

Alguns autores têm trazido uma abordagem diferenciada da carga proviral como marcador de progressão de doença na infecção pelo HTLV-1. Estudos anteriores evidenciaram que a CPV de indivíduos infectados assintomáticos pode apresentar-se semelhante a dos pacientes com HAM-TSP; o fator diferencial entre esses grupos estava na produção aumentada de citocinas pró-inflamatórias nos indivíduos sintomáticos, principalmente nos que desenvolveram a mielopatia (Montanheiro, 2005). Em geral, até 1/3 dos pacientes assintomáticos podem apresentar altos níveis de carga proviral e um outro estudo mostrou que portadores assintomáticos com $CPV \geq 1\%$ apresentaram expressão mais elevada de $CD4^+CD25^+CD45RO^+$, $CD4^+HLA-DR^+$ e $CD4^+IFN-\gamma^+$ (Coutinho, 2015).

Há uma década os estudos já mostravam elevada produção de IFN- γ em pacientes com HAM-TSP (Furokawa, 2003; Best, 2006) e mais destacadamente em células produtoras de Tax nos pacientes com HAM-TSP, de forma mais expressiva do que a produção encontrada nos assintomáticos com elevada carga proviral (Furokawa, 2003). Um outro estudo evidenciou um expressivo aumento na produção de células T $CD4^+$ secretoras de IFN- γ HTLV-1 específicas em pacientes HAM-TSP quando comparadas aos portadores assintomáticos, porém uma correlação significativa entre a CPV e a frequência dessas células não foi encontrada (Goon, 2003).

O papel dos CTLs em controlar a infecção pelo HTLV-1 também foi demonstrado pela análise do perfil de expressão gênica nos linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$ circulantes de portadores com baixa ou alta carga proviral (Vine et al, 2004). Através de análise por microarranjo de células $CD4^+$ e $CD8^+$ de portadores assintomáticos e pacientes HAM/TSP, onde a CPV foi fracionada em baixa ($<0,1\%$ de PBMCs) e alta ($>1\%$ de PBMCs), além de indivíduos não infectados. Tais pesquisadores identificaram um pequeno grupo de genes que estavam com expressão aumentada na população de células $CD8^+$ circulantes nos indivíduos com baixa carga proviral (assintomáticos ou pacientes HAM/TSP).

Com relação a carga proviral sérica, observa-se uma sobreposição de indivíduos

assintomáticos com carga proviral alta e portadores de HAM/TSP com carga proviral baixa, apesar da grande maioria destes apresentarem carga proviral elevada. Dois estudos tentaram determinar o “cut-off” da carga proviral para o auxílio diagnóstico da HAM/TSP. Grassi et al, 2011, sugerem o valor de 49,865 cópias/10⁶ PBMC, com sensibilidade de 87% (IC 95% 74-95) e especificidade de 81% (IC 95% 75-86). Furtado e colaboradores (2012), sugerem o valor de 114 cópias/10⁴ PBMC, com sensibilidade de 78% e especificidade de 28%, IC 95%. Neste estudo constatou-se que o seguimento da carga proviral pode ser de grande ajuda. Observou-se em portadores assintomáticos que flutuações da carga proviral com diferenças superiores a 0,5 logs entre a primeira e a última amostra foram registradas em 33,3% dos indivíduos que apresentaram alta carga proviral (> cut-off) e em 27,8% dos indivíduos com baixa carga proviral (< cut-off). A diferenças entre os níveis de CPV em HAM/TSP foram significativas quando comparadas entre os que andam (mesmo com ajuda) com os que são cadeirantes devido a alta espasticidade muscular, ou seja, mostrou-se que há forte correlação com a incapacidade. Além disso, os níveis de CPV foram reduzindo ao longo do estudo de coorte.

Pesquisas mais recentes mostram que a CPV está associada à ativação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ em indivíduos assintomáticos e com altos níveis de células T CD4⁺IFN- γ ⁺ no grupo com carga proviral acima de 1% do PBMC (Coutinho et al, 2014). Entende-se que células T CD4⁺ expressando a proteína Tax têm um papel relevante no esclarecimento desses achados, visto que estas células liberam altos níveis de IFN- γ , o que poderia justificar fatores envolvidos na patogênese da doença desmielinizante. Além disso, a carga proviral pode influenciar na produção de citocinas, visto que as células infectadas pelo HTLV-1 produzem uma grande quantidade desses elementos. Esses achados indicam que ainda é necessário que a associação entre a resposta celular imune específica e a carga proviral seja melhor esclarecida.

Em relação à contagem de células T CD4⁺, não há informações sobre publicações com resultados descrevendo diferenças significativas entre pacientes sintomáticos e assintomáticos. Em estudo realizado por pesquisadores no Instituto Emílio Ribas com pacientes coinfectados HIV-HTLV, com e sem manifestações clínicas, observou-se que a contagem de células T CD4⁺ se mantinha em níveis normais, bem diferente da carga proviral, que esteve maior entre os pacientes com HAM-TSP quando comparados à carga proviral de assintomáticos, porém quando se tratava do HIV-1 a carga viral não foi afetada. Os autores afirmam ainda que os pacientes coinfectados possuem uma maior suscetibilidade para doença

neurológica ou ainda um menor tempo de incubação (Casseb, 2008).

Como em um quebra-cabeças, várias peças são necessárias para que possamos compreender a relação da CPV com o surgimento de doenças relacionadas ao vírus. Porém, sabe-se que situações e condições individuais são influenciadas pelos níveis de carga proviral, como duração do ato sexual, tempo de exposição, gênero e formas de transmissão (Martins, 2015), de modo que o tempo e até mesmo a frequência do ato sexual influenciam na infectividade. No sentido contrário, a idade do portador parece não influenciar a carga proviral, de modo que não há diferença significativa entre a carga proviral de portadores assintomáticos ou sintomáticos jovens ou idosos (Nagai et al, 1998; Matsuazaki et al, 2001; Olindo et al, 2005).

1.5.5 Fatores Genéticos e Imunofenotípicos

Um aumento na frequência de células T CD8⁺HLA-DR⁺ ativadas em associação com uma alta frequência de CD18 tem sido descrito por pesquisadores (Gonçalves, 2008). Considerando a progressão para as formas sintomáticas, polimorfismos de HLA (complexo principal de histocompatibilidade humano) podem influenciar o surgimento de HAM/TSP, e alelos como HLA-A*2 tem sido associados a neuroproteção. Estudos mostram que HAM-TSP está fortemente associada a diminuição na porcentagem das células B, com um aumento na razão entre células T/B, e ativação de células T CD8⁺. Tais parâmetros imunológicos têm sido propostos como biomarcadores para o desencadeamento da síndrome neurológica (Brito-Mello, 2007; Gonçalves, 2010).

Estudos ainda não esclarecem as causas definitivas para o estabelecimento da deterioração funcional decorrente do vírus. Porém, apesar do HTLV ser considerado geneticamente estável e não há até o momento registros científicos de mutações ou adaptações ao hospedeiro que sejam representativas, fatores genéticos associados a fatores imunológicos têm sido fortemente relacionados a comprometimentos clinico-funcionais importantes (Freitas 2015).

1.5.6 Expansão Clonal

O HTLV induz a expansão clonal de células infectadas, causando distúrbios inflamatórios de origem diferenciadas, os quais têm como característica comum a infiltração de células T para o sítio da lesão, como a dermatite, a uveíte e a HAM-TSP (Mitagami, 2015). Além do processo inflamatório, a incidência de várias doenças infecciosas como a strongiloidíase e a dermatite infectiva é bem maior em indivíduos infectados do que naqueles não infectados, sugerindo uma imunodeficiência mediada pelo retrovírus (Gonçalves, 2010).

O IFN- γ é cientificamente reconhecido como uma citocina que age na defesa do hospedeiro contra vários patógenos, sendo secretado por células T CD4⁺ ativadas, linfócitos T CD8⁺ citotóxicos e células natural killer. Possui propriedades citostáticas e citotóxicas através da indução de respostas imunes celular-mediadas (Zaidi, 2011).

1.6 A barreira hematoencefálica no processo de lesão do Sistema Nervoso Central pelo HTLV-1

A barreira hematoencefálica (BHE) constitui a interface entre o sangue e o parênquima cerebral, podendo sofrer ruptura diante de neuromielopatias retrovirais, como a HAM/TSP. A membrana basal é a essência para a BHE, que vai muito além de um simples obstáculo da estrutura vascular, sendo de fato um sistema de permeabilidade seletiva; justifica-se o termo pois em algumas áreas o epitélio capilar apresenta brechas, e a membrana basal é esparsa, sendo essas regiões altamente vascularizadas (Santos, 2008). Sob condições fisiológicas, a BHE mantém a homeostase do SNC e seletivamente regula a entrada intra e paracelular de íons, moléculas e células (Afonso, 2008).

A BHE é composta de 3 tipos celulares: células endoteliais, pericitos e astrócitos. Alguns estudos têm evidenciado que os astrócitos e as células endoteliais são infectados pelo HTLV-1, porém pouco se sabe sobre a suscetibilidade dessas células localizadas na BHE diante da infecção pelo HTLV-1, e que impacto esta infecção pode causar sobre a função desta barreira (Afonso 2008; Curis 2016).

O mecanismo de ruptura da barreira hematoencefálica no curso de patologias associadas aos retrovírus ainda não foi plenamente esclarecido. Muitos estudos focam no efeito de moléculas solúveis que são secretadas por linfócitos infectados sobre a barreira hematoencefálica e sobre a organização intercelular das “*tight junctions*”. No contexto da

infecção pelo HTLV-1, algumas hipóteses têm sido propostas para tentar explicar a inflamação crônica e a irreversível destruição do SNC pelo HTLV-1. Estudos mostram que os linfócitos T CD4⁺ infectados pelo vírus migram para o SNC, infectando a população celular local, ativando astrócitos e células da microglia, conseqüentemente levando a uma reação inflamatória local com indução de citocinas pró-inflamatórias e síntese de quimiocinas, fazendo com que células inflamatórias migrem para o SNC e culminem com desregulação da BHE, lesão da bainha de mielina e destruição axonal (Figura 5) (Santos 2008; Yamano & Saito, 2012). Com a rutura da BHE, as células ali presentes deixam de ser eficazes em formar uma barreira funcional, diante do aumento da permeabilidade e passagem de linfócitos infectados pela membrana endotelial.

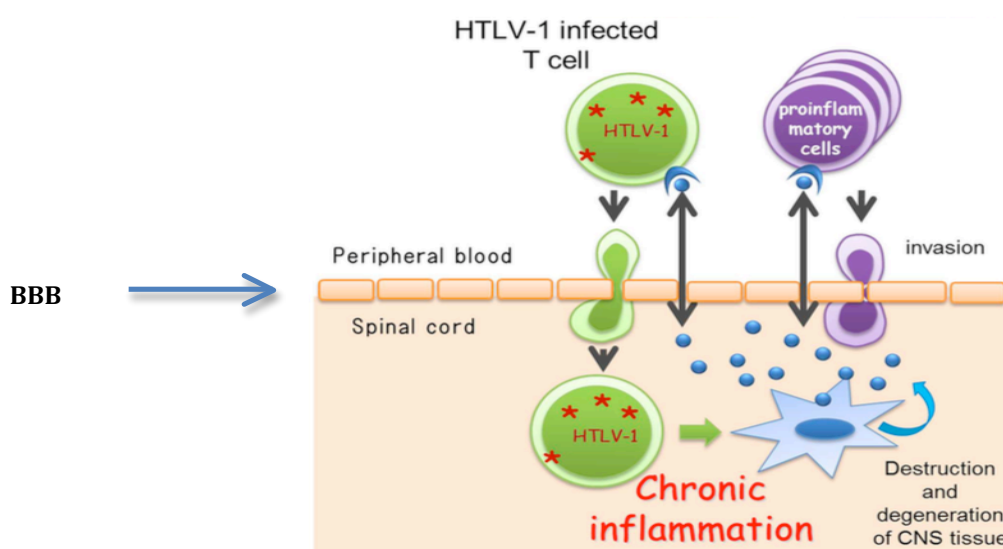


Figura 5. Mecanismos celulares relacionados à patogênese da HAM/TSP. CNS: Sistema Nervoso Central; HTLV-1: Human T cell lymphotropic virus type 1. BBB: Blood brain barrier. Fonte: Yamano & Sato, 2012.

Citocinas pró-inflamatórias como IL-1a e TNF, secretadas por linfócitos infectados, rompem as junções entre as células epiteliais, induzindo a alterações de permeabilidade. Três componentes celulares são reconhecidos como parte do complexo de entrada do vírus: proteoglicanas sulfato-heparans (HSPGs), neuropilina-1 (co-receptor para VEGF165 e semaforina 3a) e Glut-1 (transportador de glucose), expressos nas células endoteliais. Segundo alguns autores, o bloqueio desses receptores é capaz de inibir o processo de infectividade sobre as células endoteliais (Pinon 2003; Jones 2005; Afonso 2008).

1.7 Doenças Associadas

Um grande número de doenças inflamatórias é associado a infecções causadas pelo HTLV-1. A infecção pelo vírus causa supressão imune subclínica, podendo resultar em elevadas taxas de infecções oportunistas. A associação entre a ATL e HAM-TSP com a infecção pelo HTLV-1 está fortemente documentada (Proietti, 2005). Considerando o subtipo 1 do vírus, há várias doenças associadas à infecção, que tem como alvo sítios diferentes. Evidências epidemiológicas sugerem uma forte correlação entre crianças infectadas e doenças como a dermatite seborreica e a anemia grave (Santos, 2008). Manifestações neurológicas são as mais comuns, porém outras manifestações clínicas importantes têm sido registradas por pesquisadores com expertise na área, como as urológicas que atuam como marcador de progressão para formas graves (Lima, 2016). Além destas, são conhecidas as oncológicas, oftalmológicas, reumatológicas, pulmonares, psiquiátricas, infectivas e mais recentemente auto-imunes. (Gonçalves, 2010; Quaresma, 2016).

Estudos anteriores descreveram que das doenças associadas, artrite, disfunção urinária, fibromialgia, depressão, estrogiloidíase e uveíte tem sido frequentemente encontradas em populações infectadas pelo HTLV-1 (Mori, 2004; Cruz, 2006; Oliveira, 2007; Stumpf, 2008; Tanajura 2012; Lima 2016).

1.7.1 HAM/TSP

Patogênese

A paraparesia espástica é uma meningomielite crônica das substâncias branca e cinza da medula espinhal, apresentando desmielinização perivascular e degeneração axonal (Cooper, 2009). Pacientes que desenvolvem a forma grave apresentam paraparesia espástica progressiva, sem remissões, evoluindo com perdas na marcha, disfunção vesical e repercussões profundas nas atividades de vida diária e qualidade de vida. Mulheres geralmente são geralmente mais afetadas que os homens, e o início da doença ocorre, em adultos, na idade média de 40 anos (Orland, 2003). A baixa incidência de HAM/TSP (2% a 3%) nos portadores do HTLV-1 sugere que interações vírus-hospedeiro têm um papel fundamental na patogênese desta doença inflamatória que traz como característica a carga proviral (número de linfócitos infectados) e resposta imune aumentadas, na maioria dos casos.

Portanto, fatores do hospedeiro devem estar implicados na infectividade e desencadeamento de doenças relacionadas, de forma que várias pesquisas têm sido feitas na investigação de genes polimórficos em portadores assintomáticos e pacientes com HAM/TSP, particularmente sobre os haplótipos HLA. Esta investigação é baseada na hipótese de que alelos HLA controlam a carga proviral do HTLV-1 e, portanto influenciariam a susceptibilidade ou resistência à HAM/TSP (Martins *et al*, 2015).

Considerando estudos anteriores em uma análise fragmentada, há três prováveis mecanismos para explicar a patogênese da neuromielite: a da citotoxicidade direta, a da autoimunidade, e a do dano circundante (Ijichi *et al*, 1993; Osame *et al*, 2002; Levin, 2002; Santos, 2009). O primeiro mecanismo pressupõe que o HTLV-1 infecte células residentes no SNC, como astrócitos, neurônios e oligodendrócitos, os quais apresentariam antígenos virais em sua superfície celular, via MHC de classe I: células T citotóxicas CD8⁺ específicas para antígenos do HTLV-1, cruzariam a barreira hematoencefálica e destruiriam, por mecanismos citotóxicos diretos ou via produção de citocinas, as células da glia infectadas pelo vírus (Nakamura, 1993; Furukawa, 2003). O segundo mecanismo sugere que o mimetismo molecular de auto-antígenos com proteínas virais levariam a um estado de autoimunidade, em que a semelhança entre uma proteína neuronal, a ribonucleoproteína nuclear heterogênea (hnRNP-A1) do hospedeiro e a mais importante proteína do vírus, o antígeno Tax, acarretariam um processo inflamatório de auto-imunidade com lesão neuronal (Levin, 2002). No terceiro mecanismo, células T CD4⁺ infectadas com HTLV-1 e linfócitos T CD8⁺ específicos anti-HTLV-1 migrariam através da barreira hemato-encefálica, se encontrariam no sistema nervoso central e as células da glia seriam destruídas pelos componentes indutores de apoptose liberados pelos linfócitos T citotóxicos (CTLs) contra as células CD4⁺ infectadas (Figura 6), levando a um processo de intensa inflamação e destruição tecidual (Santos, 2009; Martins *et al*, 2015).

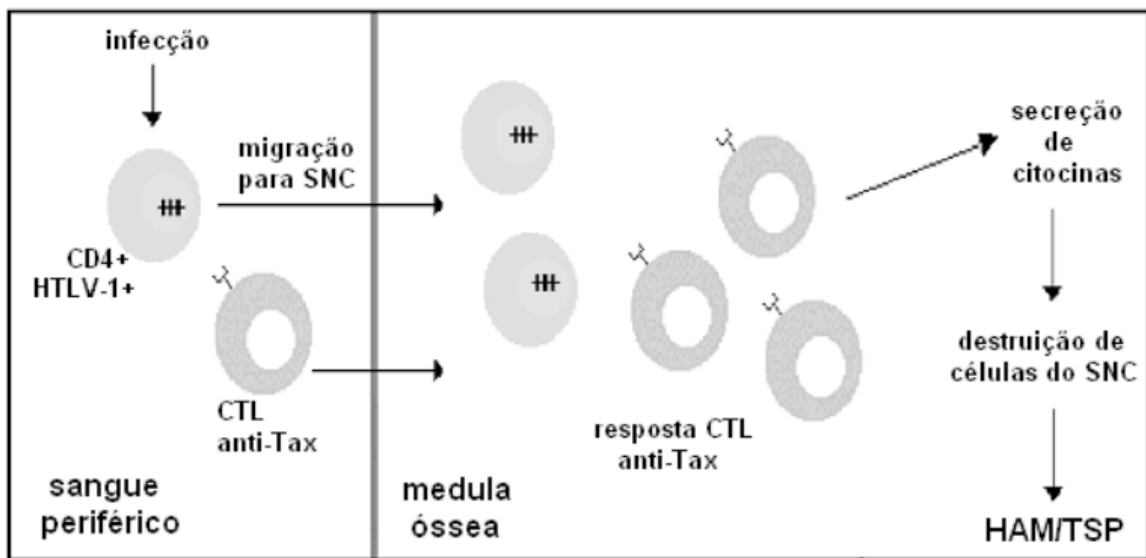


Figura 6. Modelo de Patogênese da HAM/TSP. Desencadeamento de resposta inflamatória mediada pela migração de linfócitos T infectados e CTLs anti-Tax para o SNC com liberação de citocinas pró-inflamatórias. Fonte: Martins *et al*, 2015.

No fluido cérebro-espinhal (FCE) de pacientes com HAM/TSP, linfócitos T CD4⁺ infiltrantes parecem ser o principal reservatório para o vírus, o qual atravessa a barreira hemato-encefálica por meio da migração dos linfócitos infectados (Cavrois *et al*, 2000).

Características clínicas da Mielopatia

Em áreas endêmicas da infecção pelo HTLV-1, o diagnóstico diferencial entre as mielopatias de causa desconhecida e a HAM/TSP pode ser bem difícil, especialmente nos casos de mielopatia crônica progressiva, como a esclerose múltipla. Os sintomas iniciais são fraqueza de membros inferiores e lombalgia, porém as primeiras queixas podem ser sensoriais, como formigamento, queimação ou agulhadas. Em outros portadores, problemas sexuais e urinários podem também fazer parte do início da doença. Tonturas ocorrem na fase precoce, precedendo anormalidades do exame neurológico, e estão relacionadas a um distúrbio funcional no trato vestibulo-espinhal e no trato motor (Felipe, 2008); fraqueza de membros inferiores está associada à espasticidade, seja moderada ou severa, ao sinal de Babinski e à hiperreflexia (Casseb, 2008).

As alterações sensoriais são moderadas, a sensibilidade vibratória está frequentemente diminuída e a propriocepção é menos afetada. Nos membros superiores, ocorre hiperreflexia, porém sem perda de força muscular. Com a progressão da doença, a fraqueza e a espasticidade aumentam, e a marcha vai se deteriorando (Oliveira, 2007). A Escala de Incapacidade de Kurtzke (Disability Status Score-DSS) e a Escala de Incapacidade Expandida

de Kurtzke- (Expanded Disability Status Score EDSS) tem sido utilizadas para medir o grau de severidade da mielopatia e avaliar a eficácia de um possível tratamento.

Espasticidade

Espasticidade é uma complicação grave decorrente da exacerbação de estímulos permanentes ao Sistema Piramidal, causando hipertonia muscular tipo velocidade – dependente, limitação dos movimentos e deformidade articular. Possui papel importante na progressão para a incapacidade. Quando a medula espinhal é privada do controle supra-espinhal, a atividade do neurônio motor é manifestada em forma de espasmos musculares. A hipertonia muscular pode causar dor, contraturas e bloqueios articulares, com consequente perda da amplitude de movimento e funcionalidade.

Alterações esfíncterianas

Estudos anteriores comprovam que a neuromielite no HTLV-1 também afeta a função autonômica da bexiga e intestinos (Mori 2004; Chen, 2000). Os pacientes relatam incontinência urinária, urgência miccional e resíduo urinário mesmo pós-esvaziamento. Tal disfunção vesical, de acordo com o nível da lesão e determinados parâmetros urodinâmicos, é considerada uma lesão do neurônio motor superior, acrescentado à bexiga hiperreflexa. Há uma hiperatividade do músculo detrusor com uma dissinergia da bexiga, resultando em uma comunicação entre o sacro e o centro miccional do tronco cerebral. (Mori 2004, Oliveira 2007).

A bexiga neurogênica é comum em pacientes com HAM/TSP, e o ultrassom (US) e estudos video-urodinâmicos são métodos usuais para se definir o diagnóstico. A avaliação sonográfica do sistema urinário permite o estudo dos rins, do trato urinário inferior e da bexiga. Muitos distúrbios renais podem ocorrer devido a bexiga neurogênica da HAM/TSP.

Dor neuropática

A dor neuropática é de ocorrência comum no estágio avançado da mielopatia. A disestesia é uma dor crônica e limitante, e pode ser afetada pelo frio, estresse, ansiedade, e estímulos viscerais ou músculo-esqueléticos. Para muitos pacientes, a incontinência urinária e a dor lombar podem ser mais incapacitantes que a fraqueza dos membros inferiores (Lima, 2007).

Diagnóstico

O diagnóstico da Paraparesia espástica associada ao HTLV-1 necessita da confirmação da infecção pelo vírus e da exclusão de outras causas de mielopatia. A acurácia do diagnóstico tem evoluído com os testes neurofisiológicos, e com o exame de ressonância magnética (Morgan, 2007). Nos estágios precoces da doença, a neuroimagem da medula espinhal não define a mielopatia, apesar dos pacientes apresentarem outros sintomas relacionados a doença do neurônio motor superior. Nesta fase, anormalidades funcionais da medula espinhal podem ser demonstradas através de testes neurofisiológicos. As estratégias utilizadas para se obter um diagnóstico precoce e preciso tem implicações epidemiológicas e terapêuticas, permitindo um melhor aconselhamento e acompanhamento da evolução da HAM/TSP.

Apesar do comprometimento motor está associado a uma inflamação crônica da medula espinhal, estudos de quase duas décadas já mostravam comprometimento encefálico associado a infecção pelo vírus HTLV-1 (Kira, 1991).

Ressonância magnética do cérebro mostra alterações da substância branca e cinzenta subcortical e periventricular, porém as lesões da substância branca podem ser indistinguíveis daquelas encontradas em outras doenças desmielinizantes. Pacientes com HAM/TSP podem apresentar inflamações assintomáticas no cérebro, as quais podem ser detectadas e monitoradas por PET-[¹¹C]PBR28 associado a ressonância magnética estrutural (Dimber 2016).

Exames do fluido cerebro-espinhal (FCE) de pacientes com HAM/TSP mostram pleiocitose linfocítica, aumento moderado nos níveis de proteína, bandas oligoclonais e uma elevada produção local de anticorpos HTLV-1 (Ijichi 1989, Lézin 2005). O provírus do HTLV-1 pode ser encontrado em células do FCE de pacientes com HAM/TSP. O aumento da carga proviral neste fluido tem sido associado a progressão da mielopatia (Lézin, 2005).

Resposta imune na HAM-TSP

A resposta imune individual e a carga proviral, associada a um desequilíbrio na expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias irão definir o prognóstico do portador de

HAM/TSP, visto que não há, até o momento, nenhum tratamento curativo eficaz. A lesão no SNC causada pelo HTLV-1 é associada a infiltrados de células mononucleares, e com ampla resposta de linfócitos T CD8⁺ (Bangham, 2005). A HAM/TSP é considerada uma doença inflamatória onde o dano celular leva a desmielinização. (Bangham, 2005; Gonçalves, 2008). Precocemente, os vasos sanguíneos, leptomeninges e parênquima são infiltrados por linfócitos T CD4 e T CD8, linfócitos B, e macrófagos. Na fase crônica, o infiltrado medular consiste predominantemente de linfócitos T CD8. Toda a medula espinhal pode ser afetada, porém a região torácica é predominantemente atingida.

Vários autores tem sugerido que as alterações neuroinflamatórias observadas em pacientes com HAM/TSP, afetando principalmente a medulla espinhal e o cérebro, estão associadas a disfunção de células T regulatórias (Chisumba 2015; Oh 2006, Yamano 2005).

1.7.2 Uveíte Associada ao HTLV (HUA)

A uveíte associada ao HTLV é caracterizada por uma reação granulomatosa ou não granulomatosa acompanhada por uma opacificidade vítrea e uma vasculite retinal com raras alterações retino-corioidais exudativas em um ou ambos os olhos. (Gonçalves, 2010). A HUA é considerada a terceira entidade clínica da infecção pelo HTLV-1, acomete preferencialmente adultos de meia idade infectados pelo vírus, de ambos os gêneros, podendo ocorrer como única manifestação viral ou estar associada a HAM/TSP (Kamoi 2012). A uveíte ocorre mais comumente como manifestação oftalmológica isolada, mas outros comprometimentos podem ocorrer simultaneamente, como vasculite, exudato ou degeneração da retina periférica, queratoconjuntivite e síndrome sicca (Lima 2016; Kamoi 2012; Pinheiro, 2006; Mochizuki 1992)

Em pacientes com HAM/TSP, a uveíte esteve mais frequente entre aqueles com um início precoce da doença e nos pacientes com incapacidade motora grave. HAU tem características clínicas que podem variar de acordo com a área geográfica. No Caribe e no Brasil, a doença de córnea observada em pacientes infectados pelo HTLV-1 não foi encontrada em pacientes japoneses (Merle, 2006; Merle, 1994; Mochizuki, 1992).

Além disso, uma significativa elevação nos níveis de células T CD4⁺HLA-DR⁺ e T CD8⁺HLA-DR⁺ associados a anormalidades oculares foram demonstrados em pacientes com HAM/TSP avançada (Pinheiro, 2006).

1.7.3 Alterações Dermatológicas Relacionadas ao HTLV-1

Lesões dermatológicas são comumente associadas ao HTLV-1. Sua importância ocorre porque o envolvimento cutâneo em um portador aparentemente assintomático pode ser considerado um indicador precoce de um futuro desenvolvimento de ATL ou HAM/TSP.

Um estudo transversal de voluntários brasileiros para doação de sangue mostrou uma predominância de doenças dermatológicas em indivíduos assintomáticos infectados, em comparação com indivíduos soronegativos. Em portadores que desenvolvem HAM/TSP, a ictiose tem se manifestado com frequência (Milagres, 2003).

1.7.4 Disfunções Urinárias

Alguns estudos mostram que indivíduos assintomáticos infectados podem desenvolver sintomas urinários, não apenas aqueles com HAM/TSP (Oliveira, 2007). A disfunção erétil e a bexiga hiperativa tem representação significativa no comprometimento esfínteriano e sexual significativamente maiores entre os portadores de HTLV-1 do que nos controles. Além disso, manifestações urinárias como bexiga hiperativa associada a parâmetros imunológicos foram semelhantes aos observados em pacientes com HAM/TSP (Costa, 2012; Souza, 2012). As manifestações urinárias em indivíduos infectados assintomáticos podem representar o início do comprometimento neurológico, com a ocorrência de noctúria, incontinência urinária e a disúria, sendo estes sintomas mais frequentes na fase inicial, podendo progredir para o estresse miccional, esvaziamento incompleto e incontinência (Romanelli, 2010). A hiperatividade do músculo detrusor é o achado mais frequente (Castro, 2002; Rocha, 2007; Champs, 2010; Costa, 2012). Atualmente, os distúrbios urinários são considerados marcadores biológicos de um início precoce de HAM/TSP e a incontinência urinária também é vista como uma forma oligossintomática desta doença (Castro, 2002; Tanajura, 2012; Lima, 2016).

Sabe-se que HTLV-1 tem um espectro neurológico mais amplo do que a forma grave neurológica abrange (HAM/TSP) e indivíduos infectados podem apresentar várias síndromes isoladas ou variadas, chamadas por alguns autores como complexo neurológico associado ao HTLV-1 (Araújo, 2006; Lima, 2010). Como as disfunções da bexiga são

representativas nesta situação como um dos primeiros sinais de HAM-TSP já descritos anteriormente, consideramos que é de grande importância destacar sua manifestação em pacientes com HTLV sem um diagnóstico definido para a doença neurológica, considerando os autores que afirmam que os sintomas esfínterianos são na maior parte do tempo relacionados a um comprometimento neurológico incipiente (Castro, 2002/2007; Oliveira, 2007; Romanelli, 2010; Costa, 2012). A combinação de distúrbios urinários irritativos e obstrutivos é um dado marcante nas características clínicas do HTLV-1 e, em alguns casos, os sintomas urinários precedem a paraparesia por muitos anos. Estudos urodinâmicos revelam presença de bexiga hiperativa, embora alguns indivíduos demonstrem uma bexiga hipoativa ou contrátil porém associada a distúrbios. Além disso, estudos urodinâmicos evidenciam hiperreflexia detrusora na maior parte dos casos, mas também hiporreflexia detrusora e disergia do esfíncter detrusor em pacientes com HTLV-1 sem HAM/TSP. Infecção do trato urinário é encontrada em menor proporção, sugerindo que os sintomas que surgem podem ser explicados pela síndrome da bexiga hiperativa 1, 14.

Em conclusão, este estudo demonstra que devemos nos preocupar e monitorar os pacientes com queixa do esfíncter para entender melhor a influência desses sintomas na progressão para HAM/TSP, considerando que esses indivíduos foram primeiro definidos como oligossomáticos e essas características clínicas exigem maior atenção e mais Estudos incluindo abordagens clínicas e urodinâmicas para ajudar a prevenir danos severos ao motor.

1.7.5 Outras Manifestações

Apesar da maioria das pessoas infectadas permanecerem assintomáticas ou pouco sintomáticas e por vezes não apresentarem manifestações clínicas, vários trabalhos anteriores evidenciaram que além das doenças previamente descritas que são as de maior importância, outros comprometimentos podem estar presentes, em uma menor incidência. Dentre elas, doenças auto-imunes, a exemplo: artrites, polimiosites, síndrome de Sjogren, Lupus (Bittencourt, 2009; Quaresma, 2016); doenças de ordem psiquiátrica, como depressão e ansiedade (Orge, 2009; Gascón, 2011), as quais tem sido associadas ao impacto psicológico de uma condição de saúde incurável e ao efeito biológico da infecção retroviral (Stumpf 2008).); cânceres de outros sítios além do linfático, como de fígado e mama (Barmak, 2003; Arisawa, 2006; Huleihel, 2014; Shukrun, 2014; Panfil, 2016) e mais recentemente encefalites, meningites e a mielopatia cervical (Dimber, 2016, Kahn, 2017, Dos Santos, 2017).

Uma manifestação comum que surge como início dos sintomas é a dor, de característica subaguda e persistente. Queixas dolorosas estão presentes em 84,3% dos indivíduos com HTLV-1, independentemente dos sinais e sintomas associados, serem neurológicos ou não. Dentre os vários quadros de dor que podem surgir, a lombalgia é uma das mais frequentes. A dor está correlacionada com a piora da infecção e provavelmente está associada a uma expressão aumentada de citocinas pró-inflamatórias (Dos Santos, 2017).

1.8 Aspectos relacionados a transmissão familiar do HTLV-1

A infecção pelo HTLV-1 em agrupamentos familiares, suas manifestações, evolução clínica, perfil imunológico e o impacto da mielopatia e doenças associadas ainda não foram completamente esclarecidos (Gotuzzo 2004, 2007; Peleteiro 2015; Alvarez 2015; Mendes 2016). No Brasil, cerca de 12 artigos foram publicados abordando agregação e transmissão familiar nas últimas duas décadas, todos com uma abordagem epidemiológica e descritiva (Alvarez 2015; Mendes 2016; Costa 2013; Silva 2009; Cloves 2009; Nobre 2006; Primo 2005; Ribas 2003; Araújo 2002; Pombo-de-Oliveira 2001; Carvalho 1995; Cavalcanti 1993).

Duas principais rotas de transmissão, a via vertical e a via sexual, são reconhecidas por favorecerem de maneira preponderante o agrupamento familiar do HTLV-1 (Alvarez 2015) e dentre as duas, a amamentação apresenta grande impacto, devido a alta concentração de linfócitos no leite materno (Mendes, 2016; Carneiro-Proietti, 2002), e nos casos onde sua duração é superior a 6 meses, estudos tem evidenciado sua associação com um maior risco de infecção, quando comparada a outras formas de transmissão (Alvarez, 2015; Bittencourt, 2010; Romanelli 2010; Cavalcanti 1993).

Membros de uma mesma família compartilham fatores genéticos, virais e até mesmo ambientais, o que possivelmente aumentaria o risco para o desenvolvimento de doenças. Em revisão sistemática recente, pesquisadores mostraram que o número de indivíduos de uma mesma família mais frequentemente acometidos pelo HTLV-1 varia entre dois a quatro membros, e a maior parte dos estudos revisitados evidenciou que 83% dos infectados apresentavam a mesma doença relacionada ao vírus (Alvarez 2015). Estudos anteriores afirmam que famílias que desenvolvem características de HAM/TSP ou relacionadas ao complexo neurológico apresentam quadros menos severos que o curso natural e não familiar para a progressão da doença (Nozuma, 2014). Por outro lado, pesquisadores tem reportado

que os casos familiares têm o início dos sintomas mais precoce do que os casos de origem não familiar, o que geralmente se inicia por volta da quarta ou quinta década de vida. Além disso, o intervalo entre o início da perda sensitivo-motora e a necessidade do uso de cadeira de rodas é maior entre os casos de origem familiar (Mendes, 2016). Considerando a Leucemia de células T, que é a outra forma mais grave e consequente da infecção, o risco para o seu desenvolvimento chega a ser 12 vezes maior naqueles portadores assintomáticos que apresentam histórico familiar (Iwanaga, 2010).

1. 9 Tratamento e prognóstico da infecção pelo HTLV-1

Não há atualmente tratamentos reconhecidos para a eliminação do vírus nem tampouco para as sequelas causadas pelas doenças associadas ao HTLV, porém estudos recentes tem mostrado terapias de alívio para marcadores inflamatórios clássicos, como dor, marcha, disúria e noctúria. Corticosteroides, IFN- α e IFN- β 1a tem mostrado resultados limitados (Buell 2016); A combinação de dois nucleosídeos análogos (zidovudina and lamivudina) foi utilizada em estudo prévio, sem respostas significativas, persistindo a progressão da incapacidade (Taylor, 2006).

Estudos anteriores mostram que pacientes com HAM/TSP submetidos a corticoterapia sofreram um aumento na carga proviral (Takenouchi, 2003). Inversamente, drogas antiretrovirais causaram uma diminuição na CPV (Taylor, 2006). Tais resultados indicam que a carga proviral pode ser um parâmetro importante no monitoramento da atividade da doença em ensaios clínicos. A CPV no fluido cerebrospinal pode ser um marcador mais fidedigno de HAM/TSP que aquela encontrada no sangue circulante (Gonçalves, 2008). Mais recentemente, pesquisadores comprovaram que metilprednisolona pulsada foi bem tolerada na melhora dos sintomas e durante seu uso observou-se redução dos níveis de TNF- α (Buell, 2016). O Resveratrol (RES) por suas propriedades anti-cancerígenas, anti-inflamatórias e imunomoduladoras, tem sido empregado como agente terapêutico útil no tratamento de doenças inflamatórias relacionadas ao HTLV-1. Efeitos inibidores do RES sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1- α , IL-6 e TNF- α também foram recentemente descritos (Fugetta 2016).

Quanto à espasticidade, nenhum tratamento é considerado eficaz. A abordagem farmacológica tem sido utilizada para aliviar os sintomas (baclofen, diazepam, etc). Porém, com a evolução inevitável da doença, o paciente migra da marcha normal para a marcha com

apoio e então para o uso da cadeira de rodas. A toxina botulínica tem sido classicamente utilizada nos casos de hipertonia muscular eslástica de origem piramidal, mas em indivíduos infectados, estudos descrevem seu uso apenas no tratamento da bexiga hiper ativa (Carneiro-Netto, 2014).

Infecções do trato urinário são comuns em pacientes que desenvolveram HAM/TSP, e tais infecções são complicadas por eventos como litíase, refluxo vesicouretral, pielonefrite crônica, e insuficiência renal. O manejo recomendado para as disfunções vesicais é o cateterismo intermitente associado a drogas anticolinérgicas para a hiperatividade do detrusor e um agente muscular anti-espasmódico para a disfunção esfínteriana externa (Castro-Costa, 2005; Castro, 2002/2007; Oliveira, 2007; Tanajura Costa, 2012).

Constipação é uma disfunção intestinal muito comum em indivíduos que desenvolveram HAM/TSP. O manejo eficaz para esses eventos precisa ter como base a dieta, consumo adequado de líquidos e agentes farmacológicos, quando necessário (Chen, 2000).

1.10 Aspectos Sociais da Infecção pelo HTLV

A falta de informações básicas sobre o HTLV-1, como formas de transmissão, prevenção e doenças associadas traz dados alarmantes que atuam como barreiras sociais no combate à disseminação do vírus. O desconhecimento por profissionais de saúde acerca do impacto do HTLV-1 sobre a saúde e qualidade de vida da população faz com que sejam preteridas queixas importantes do paciente, o qual na maioria das vezes desconhece ser portador da infecção, queixas estas que ajudariam bastante na investigação, e o diagnóstico deixaria de ser predominantemente um achado acidental, o que ainda é muito comum. Por ser uma infecção silenciosa e uma doença quase desconhecida na região Norte onde foi desenvolvida a coleta de dados, portadores do vírus sofrem todos os tipos de preconceitos e dificuldades no dia-dia, o que corrobora com registros de estudiosos afirmando que os enfrentamentos pelo HTLV-1 são agravados pela dificuldade sócio-econômica, locomoção e da pouca atuação pelos órgãos Públicos Centrais de Saúde (Casseb 2013; Zihmann *et al* 2011)). Um Guia de Manejo Clínico (2013) é o que há como iniciativa do governo federal para o esclarecimento sobre o vírus; porém, políticas públicas ou formas incisivas de combate à transmissão, como a inclusão nos exames pré-natal e serviços com equipes multiprofissionais capacitadas para o atendimento das complexidades surgidas em

decorrência da infecção, não tem sido cogitados. Percebe-se claramente o descuido em relação ao HTLV-1 na classificação de doenças consideradas negligenciadas, onde o vírus não está inserido, apesar da infecção atingir camadas da população empobrecidas e menos favorecidas, portanto mais vulneráveis (Morel 2006; Brasil 2010; Dourado 2003). A educação reflete esse problema. O nível educacional é considerado, segundo o Índice de Condições de Vida e Saúde (ICVS) - da Organização Mundial de Saúde (OMS) - um indicador de qualidade de vida diretamente correlacionado com variáveis sócio-econômicas, principalmente em doenças com distribuição em clusters (Olinda, 2009).

A “invisibilidade” que surge em decorrência de múltiplas barreiras percebidas na ocorrência da infecção pelo HTLV é somada à invisibilidade dos sujeitos que vivem com o vírus, e, embora considere-se que os pacientes (os quais tem condições de se dirigir a um ambulatório de referência) estejam essencialmente atendidos em suas necessidades concernentes ao adoecimento, observa-se que há, no cerne da prevenção e promoção em saúde, um verdadeiro descaso social. As relações familiares e de trabalho do portador de HTLV, a aceitação e o conhecimento da doença estão diretamente relacionados à qualidade de vida do indivíduo. Negligenciar a origem sócio-econômico-educacional e étnica da doença tem contribuído socialmente para continuidade da transmissão, disseminação e perpetuação da infecção em nosso meio, alimentando ideias preconceituosas e segregadoras que acentuam o estigma da doença no Brasil.

2. JUSTIFICATIVA

Considerando a disfunção motora do HTLV, são escassos os estudos que fundamentam as causas do aparecimento dos sintomas; 98% dos indivíduos infectados permanecem assintomáticos, embora possam transmitir o vírus; 2 a 5 % podem desenvolver HAM/TSP. O SNC é normalmente protegido por uma estrutura fisiológica chamada barreira hematoencefálica (BHE), que consiste principalmente de um endotélio contínuo com junções oclusivas. O mecanismo de migração de linfócitos para o SNC ainda não foi bem definido, porém sabe-se que VLA-4 e outras integrinas facilitam sua migração através do endotélio da BHE (Curis, 2016), e assim como os mecanismos imunopatogênicos específicos da HAM/TSP ainda não estão totalmente esclarecidos, estudos têm demonstrado a franca participação do sistema imunológico no desenvolvimento ou manutenção desta desordem neurológica (Coelho-dos-Reis, 2007; Starling, 2010). O aumento da proliferação celular, da síntese de citocinas pró-inflamatórias e da carga pró-viral são coparticipantes neste processo, sendo esta última considerada como um marcador na evolução da doença quando associada a hiper expressão de citocinas pró-inflamatórias. O aumento da carga proviral por si só não é suficiente para produzir danos nos tecidos e não deve ser reconhecido isoladamente como um bio-marcador para progressão da doença, de modo que outros fatores imunes estão envolvidos. Interações entre linfócitos infectados com HTLV-1 e células endoteliais cerebrais podem levar a danos na barreira hemato-encefálica, permitindo uma maior adesão e invasão de linfócitos infectados para o SNC, sendo este um passo importante na determinação da progressão da doença neurológica (Romero, 2000). A neutralização destas moléculas poderia auxiliar na prevenção ou redução do desenvolvimento de HAM/TSP. Portanto, justifica-se a investigação de integrinas que facilitam a migração, utilizando os diversos mecanismos de alteração do potencial de membrana, tendo o endotélio como facilitador do acesso e com consequente lesão do tecido nervoso a nível da medula torácica espinhal.

A população escolhida foram infectados nascidos e residentes no estado do Pará, o qual possui uma das maiores prevalências de HTLV-1 registradas no Brasil (Ishak, 2002), por meio de marcação de consulta e busca ativa de prontuários, descritos detalhadamente no capítulo Métodos. O HTLV-1 etnologicamente encontra-se mais presente em cidades brasileiras onde há comunidades descendentes de japoneses oriundos do sudoeste do Japão, que imigraram no século 20, como as colônias residentes no Mato Grosso do Sul, e também onde há descendentes de africanos, devido a sua origem e entrada na América do Sul trazidos nos navios negreiros durante o período colonial (Paiva & Casseb, 2015; Gessain, 2012). O

Pará possui um número considerável de comunidades nipônicas nos arredores da capital, onde cultivam plantação de pimenta e algumas frutas, como cupuaçu, mangustão, rambutan e acerola. Também apresenta em torno de 240 comunidades quilombolas, todas próximas da cidade de Belém; supões que tais números possam contribuir para a alta prevalência do estado, visto que em regiões endêmicas a maior forma de transmissão é a vertical, e em comunidades fechadas a amamentação é prática comum. Além disso, no interior do estado há muitos pontos de prostituição, principalmente nas estradas que ligam o estado a outros territórios, facilitando a transmissão sexual do vírus. Considerando a característica de disseminação do HTLV-1 por agrupamentos, o que usualmente os autores chamam de distribuição em *clusters*, Ferreira et al (2010) demonstraram a ocorrência do HTLV-1 em comunidades ribeirinhas do nordeste do Pará, com frequências semelhantes às de populações urbanas, porém sem nenhum caso de transmissão familiar na amostra. Segundo Catalan-Soares (2006), as altas taxas de prevalência encontradas em familiares e parceiros sexuais estáveis de indivíduos infectados sugerem agregação familiar da infecção. Isso também nos alerta para a importância de estudarmos os comunicantes de indivíduos infectados, ainda que assintomáticos, a fim de limitar a disseminação silenciosa do vírus.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Identificar o perfil funcional de linfócitos T de portadores de HTLV-1 com e sem critérios diagnósticos definidos de HAM/TSP, e determinar se há associação com a progressão para doença neurológica.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Identificar o perfil fenotípico dos linfócitos, considerando moléculas envolvidas com a migração celular em pacientes infectados pelo HTLV-1, e verificar se tais moléculas podem ser utilizadas como parâmetros imunológicos e prognósticos na diferenciação entre portadores oligossintomáticos e pacientes que apresentam alterações de função motora;
- b) Analisar se os níveis de citocinas pro-inflamatórias circulantes estão associados com a evolução clínica.

c) Descrever características funcionais, clínicas e imunológicas de agrupamentos familiares em portadores de HTLV-1

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamento do estudo

O delineamento é do tipo estudo de casos e controles. Os participantes foram divididos em dois grupos essenciais: pacientes diagnosticados e confirmados por PCR para o vírus HTLV-1 e indivíduos não infectados, aqui considerados como controles. Três subgrupos foram pré-estabelecidos:

Grupo A - indivíduos infectados e com sintomas relacionados ao HTLV-1, porém **considerados assintomáticos** para HAM-TSP, pois não se enquadram nos critérios pré-determinados para o diagnóstico da forma neurológica grave (Osame, 1990; Castro-Costa, 2006);. Este grupo foi denominado oligo/assintomático.

Grupo B - pacientes com diagnóstico confirmado por exame neurológico e de imagens para HAM/TSP, segundo os critérios de Osame (1990);

Grupo C - indivíduos não infectados com o vírus (controles).

4.2 Seleção dos pacientes

4.2.1 Critérios de Inclusão

Portadores de HTLV-1, confirmados por PCR teste, de ambos os sexos, com e sem manifestações relacionadas ao vírus e sem doenças sistêmicas com manifestações semelhantes às aquelas encontradas na literatura para o HTLV, como HIV, HBV, diabetes, polirradiculoneurites, sequelas motoras de Acidente Vascular Encefálico, infecções urinárias recorrentes de outras causas.

Indivíduos não infectados com HTLV-1 e sem outras doenças que possam trazer vieses ao estudo, as mesmas descritas acima.

4.2.2 Critérios de Exclusão

Indivíduos que durante seguimento do estudo adquiram doenças sexualmente transmissíveis ou foram diagnosticados com doenças sistêmicas como HIV, HBV, diabetes, ou ainda polirradiculoneurites, sequelas motoras de Acidente Vascular Encefálico e infecções urinárias recorrentes de outras causas.

Indivíduos que estejam em uso de corticoterapia.

4.3 Coleta de dados

A coleta de dados foi desenvolvida em pacientes portadores e não portadores do vírus HTLV-1 residentes no estado do Pará, com acompanhamento no Núcleo de Medicina Tropical e por demanda espontânea através da busca ativa. O período de avaliação dos voluntários e coleta de amostras de sangue ocorreu de agosto de 2014 a fevereiro de 2016.

4.4 Tamanho da amostra

Foi realizado uma cálculo amostral para o tamanho ideal da amostra utilizando-se a equação a seguir, conforme Moser e Kalton (1985).

$$n = \frac{z^2 \times (p \cdot q)}{e^2}$$

Onde:

n = tamanho da amostra; p = prevalência da infecção pelo HTLV-1/2 na população= 0,91% (Catalan-Soares et al, 2005); q = prevalência da não-infecção pelo HTLV-1/2 na população= 99,09%; z = valor da distribuição normal-padrão correspondente ao nível de confiança desejado ($z = 1,96$ para intervalo de 95% de confiança – IC 95%); e = erro máximo aceitável na estimativa = 2%.

Ao resultado encontrado, acrescentam-se 10% correspondentes a perdas.

$$n = \frac{1,96 \times (1 \times 99)}{2^2} = 95,07$$

Sendo n final = 95 + 10% \approx 105 indivíduos

Considerando as perdas que ocorreram no decorrer do estudo, alcançou-se um total de 110 indivíduos, onde foram excluídos posteriormente 22 amostras por descongelamento acidental do freezer -80°C em momentos distintos, onde estas encontravam-se armazenadas

por um período máximo de 5 semanas até o transporte para o Instituto Oswaldo Cruz. O total final de amostras viáveis foi de 88.

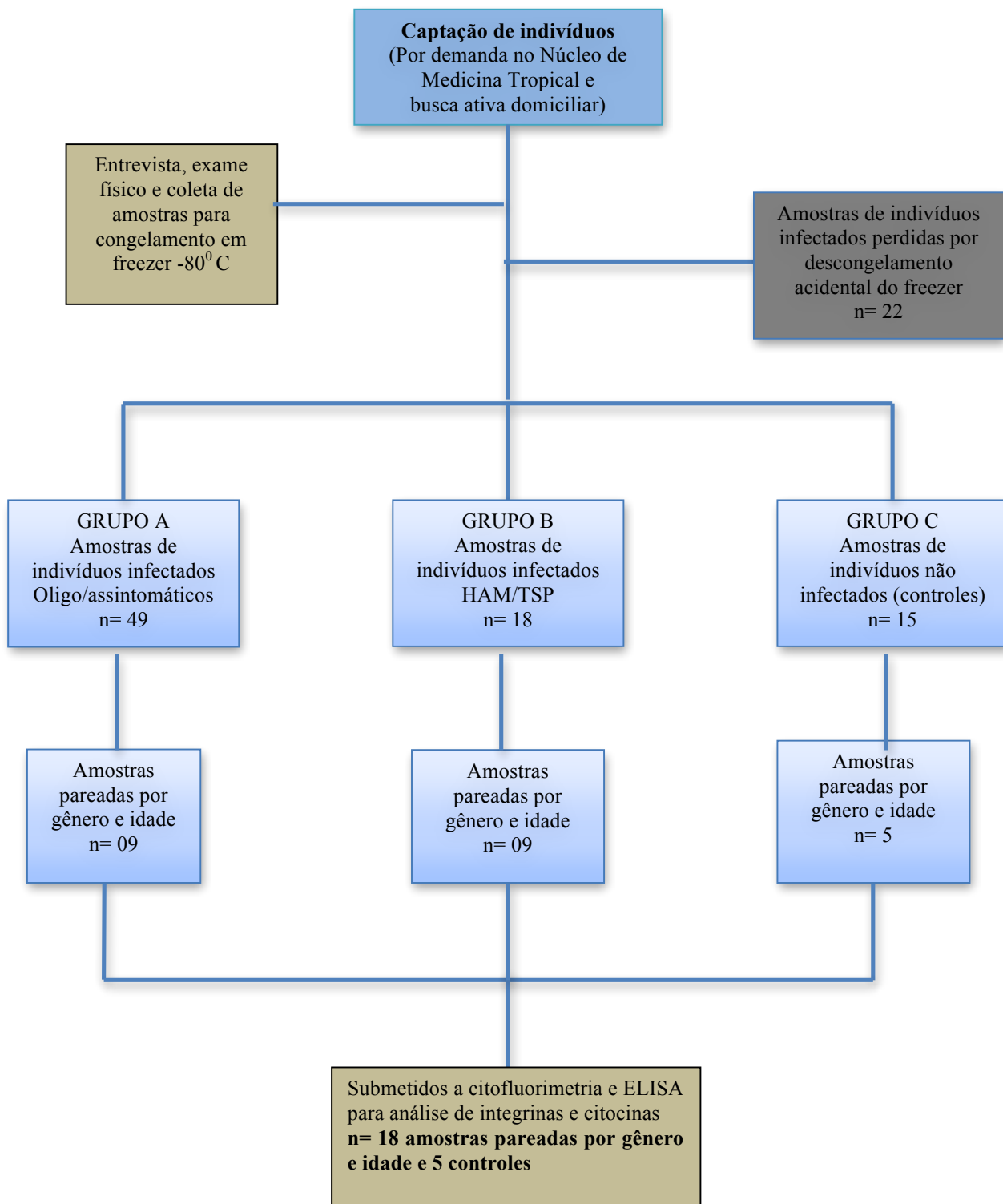


Figura 7. Fluxograma representativo da coleta de dados desde a captação de pacientes até triagem das amostras divididas em subgrupos. Fonte: o autor.

4.5 Procedimentos metodológicos

Todas as padronizações e treinamentos dos protocolos utilizados assim como os testes-piloto para viabilidade celular foram desenvolvidos sob supervisão no Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz. Os procedimentos de obtenção de células mononucleares do sangue periférico e plasma, assim como a criopreservação foram realizados no Laboratório de Virologia (LabVir) da Universidade Federal do Pará, em colaboração com a Fundação Oswaldo Cruz. Descongelamento de amostras, marcação membranar e de superfície, fixação das células e dosagem de citocinas por ELISA foram desenvolvidas no IOC. A citometria de fluxo para imunofenotipagem de subpopulações foi realizada no laboratório de Imunoparasitologia, Plataforma Multiusuários de Sorting, do IOC/ RJ.

4.5.1 Coleta de Amostras de Sangue

As coletas das amostras eram agendadas diretamente com os pacientes via telefone conforme a sua disponibilidade, em sua grande maioria à domicílio, pois poucos dispunham de recursos para comparecer ao LabVir. As amostras de sangue periférico foram obtidas por punção venosa e acondicionadas em tubo comercial com sistema a vácuo contendo anticoagulante heparina sódica (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA). O material era então transportado em caixa de isopor resfriada com gelo picado até o LabVir para processamento imediato.

4.5.2 Obtenção de Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSP) e Amostras De Plasma

A amostra de sangue de heparina de sódio foi coletada de todos os voluntários. Logo após, o sangue total foi submetido a centrifugação a 500 x g, por dez minutos, à temperatura ambiente para retirada do plasma, o qual foi aliqotado imediatamente em eppendorfs na quantidade de 500 µl cada, totalizando 2 ml por amostra e então armazenado em freezer - 80^o C. Em seguida, as células mononucleares de sangue periférico (CMSP) foram obtidas por outra centrifugação de sangue sobre um gradiente de densidade formado com Histopaque 1077 (Sigma Chemical Company, St Louis, MO, EUA).

O sangue contido nos tubos heparinizados foi diluído na mesma proporção com meio de cultivo RPMI + 1 mM de HEPES (Sigma, EUA) + L- glutamine (GIBCO, Carlsbad, CA, EUA) e antibiótico – penicilina/estreptomicina (Sigma, EUA). Após a diluição, o sangue foi lentamente adicionado sobre o Histopaque 1077 evitando-se a mistura entre ambos, sendo a proporção de 1 parte de Histopaque 1077 para 2 partes de sangue diluído (protocolo em anexo). Em seguida fez-se a segunda centrifugação, esta a 1. 200 x g por 20 minutos em temperatura ambiente. Ao término do procedimento, percebe-se a formação de áreas distintas no tubo, que correspondem a diferentes componentes celulares os quais migraram para determinado local conforme sua densidade celular, e na porção intermediária formou-se o que chamamos de “anel de células” devido a densidade média do Histopaque 1077 que separa as células mononucleares. O anel então foi coletado e transferido para um novo tubo, o qual foi completado com meio de cultura e submetido a centrifugação (lavagem) a 500 x g por 10 minutos na temperatura de 4° C. Ao final desta centrifugação, o sobrenadante foi despresado e o tubo foi novamente completado com meio de cultura para realizar a segunda lavagem, para garantir a retirada do Histopaque 1077 que é tóxico para as células. Seguiu-se então para a contagem das células em câmara de Neubauer, utilizando-se a diluição de 1:10 em azul de Trypan (Sigma, EUA) e posteriormente o ajuste para 5×10^6 células/ml que é a proporção utilizada na etapa seguinte, a criopreservação.

4.5.3 Criopreservação

Durante a última centrifugação, seguiu-se com o preparo do meio de congelamento, onde utilizou-se a proporção de 10% de DMSO (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EUA) para 90% de soro fetal bovino (Cultilab Ltda., Campinas, SP, BRA) e mantido refrigerado a 4°C. Ao término da centrifugação, o sobrenadante foi despresado e o volume de meio de congelamento foi adicionado para se obter uma suspensão celular com concentração de 5×10^6 células por ml. A suspensão foi distribuída em criotubos de forma que a quantidade final de células estivesse entre 5×10^6 e $7,5 \times 10^6$ células por criotubo. Em seguida, estes eram imediatamente inseridos no Mr. Frosty™ (Nalgene, Thermo Fischer Scientific, Cleveland, TX, EUA) e mantidos no freezer -80°C por pelo menos 24 horas. Este procedimento garantiu o congelamento gradual das células, menos 1°C a cada minuto decorrido. Em seguida, as amostras foram transferidas para caixas de armazenamento específicas e mantidas no mesmo freezer -80°C até o transporte para o LIPMED/IOC/FIOCRUZ onde as amostras eram transferidas e acondicionadas em nitrogênio líquido até serem descongeladas para realização

dos ensaios citofluorimétricos. O período de armazenamento das células mononucleares em freezer -80°C foi de no máximo 5 semanas.

4.5.4 Transporte de Material Biológico

As amostras biológicas (CMSP e plasma) foram acondicionadas de forma segura em caixas de material biológico modelo UN3373 apropriada para transporte contendo gelo seco. As embalagens possuíam isolamento para derramamento de líquidos (protegidas e envoltas uma a uma em algodão e plástico-bolha) seguindo determinações da instrução de embalagem 650 das normas da IATA (International Air Transport Association), de acordo com as normas de segurança exigidas para transporte aéreo. Tais amostras eram enviadas em até 5 semanas e entregues por empresa especializada no prazo máximo de 24 horas na Fundação Oswaldo Cruz/RJ, dentro do intervalo de segurança previsto para que não ocorresse descongelamento.

4.5.5 Descongelamento das Amostras

As amostras criopreservadas de CMSP foram retiradas do nitrogênio líquido e imediatamente colocadas em gelo seco até que o processo de descongelamento fosse iniciado. Tais amostras foram descongeladas de acordo com o protocolo Duke adaptado (Duke Human Vaccine Institute, Immunology and Virology Quality Assessment Center). Para o meio de descongelamento, utilizou-se 1 parte de soro fetal bovino (SFB) para 9 partes do meio RPMI. Os criotubos foram colocados em banho maria a 37°C por no máximo 5 minutos ou até formar-se apenas uma pequena pedra de gelo. Em seguida, todo conteúdo do criotubo foi gentilmente transferido para um tubo cônico de 15ml contendo 10 ml de meio de descongelamento a 37°C . Posteriormente os tubos foram centrifugados a $400 \times g$ por 10 minutos a 20°C . Ao término da centrifugação o sobrenadante de cultura foi despresado, adicionado mais 10 ml de meio de descongelamento e uma segunda centrifugação a $400 \times g$ por 10 minutos a 4°C foi realizada.

Após a segunda centrifugação, o sobrenadante foi descartado, e 3ml de meio de descongelamento foi adicionado ao tubo. As células foram gentilmente homogeneizadas com auxílio de uma pipeta. Em seguida, as mesmas foram diluídas 1:10 em azul de tripan (Sigma) para contagem em câmara de Neubauer. A viabilidade e recuperação das células foram avaliadas. Ambos os parâmetros de qualidade deveriam estar acima de 80%.

Recuperação:

Número total de células vivas/4 x 10¹ (diluição) x 10⁴ x volume de ressuspensão (ml)

5 x 10⁶ _____ 100%

células vivas encontradas _____ x

Viabilidade:

Número total de células vivas e mortas _____ 100%

células vivas encontradas _____ x

4.5.6 Avaliação Fenotípica das Células Mononucleares do Sangue Periférico

As células descongeladas foram mantidas em repouso com RPMI-1640 suplementado com 10% de soro AB humano inativado, 10 mM de HEPES, 1-5 mM de l-glutamina, 0-04 mM de 2-mercaptoetanol, 200 UI / ml de penicilina e 200 mg/Ml de estreptomicina, por um período de 12 horas em uma atmosfera humidificada de 5% de CO₂ a 37°C. Em seguida, 300.000 células foram incubadas durante 30 min em ambiente escuro com os anticorpos monoclonais (CD3-V500, CD4-APC-Cy7, CD8-APC, CD49d-PeCy5, CD49e-PE, CD49f-FITC) (BD Biosciences). Após o período de incubação, foi adicionado 1ml de PBS azida 0,1% para a lavagem das células, e centrifugadas a 500 x g durante 10 minutos a 4°C. Em seguida o sobrenadante foi descartado e as células foram fixadas com 300 microlitros de PBS 1% de paraformaldeído. Após homogeneização da suspensão celular, as mesmas foram mantidas ao abrigo da luz a 4° C até a sua aquisição no citômetro de fluxo. A caracterização de células T reguladoras (anti- CD4 Pe-Cy5, anti-CD25 PE e anti-FOXP3 FITC) foi feita usando um kit comercial e os procedimentos foram realizados de acordo com o protocolo de fabricação (Biolegend).

4.5.7 Citometria de Fluxo

Foram realizadas 100.000 aquisições de eventos no Cytoflex Flow Cytometer (Beckman Coulter inc, CA, EUA) em amostras selecionadas considerando o maior número de células e o pareamento previamente estabelecido conforme as características clínicas. Os limites para os marcadores de quadrantes e histogramas foram sempre definidos com base em células não marcadas e controles de isotipos, e as compensações de cores foram feitas com

base em amostras com simples marcação para cada fluorocromo. Foi desenvolvido um protocolo de citometria de fluxo multiparamétrico para determinar as frequências de linfócitos T que expressam as moléculas de integrinas, sendo os resultados analisados no software Kaluza 1.5a (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, EUA).

A estratégia de análise foi: primeiro definiu-se um *Dotplot* de FSC-A x FSC-H para definir região eletrônica (A) contendo CMSP e exclusão dos *doublers*. Dentro da região definida em (A) foi criado um *dotplot* de FSC-A x SSC-A para determinar uma região eletrônica que define o provável tamanho e a granularidade de linfócitos. Dentro da região eletrônica dos linfócitos (B) foi criado histograma para definir a população de células com viabilidade. Posteriormente, foi criado um histograma para definir a porcentagem de linfócitos T (CD3⁺) na região prévia e um dot-plot para definir a porcentagem de células que expressam CD4 e CD8 dentro da população de linfócitos T CD3⁺. Criou-se um histograma para determinar a porcentagem de diferentes subpopulações de células T que expressavam integrinas (CD49d, CD49e e CD49f). Em seguida estabeleceu-se a porcentagem de linfócitos que expressam altos níveis de moléculas de integrina (CD49d^{hi}, CD49e^{hi} e CD49f^{hi}) o que foi determinado pelas células que apresentaram alta intensidade de fluorescência (Figura 8). Todos os resultados citofluorimétricos foram expressos como mediana da porcentagem celular; com intervalos interquartis de 25% - 75%. Para as células T regulatórias, as análises começam com a definição de um *Dotplot* de FSC-A x FSC-H para definir uma região eletrônica (A) contendo CMSP e exclusão dos *doublers*. Em seguida, criou-se dentro da região definida em (A) um *dotplot* de FSC-A x SSC-A para determinar uma região eletrônica que define o provável tamanho e a granularidade de linfócitos. Dentro da região eletrônica dos linfócitos (B) foi criado histograma para definir a população de células com viabilidade. Finalmente, criou-se um histograma para definir a população de linfócitos T CD4⁺ (C). Dentro desta população, foi verificada a população dupla positiva para CD25 e Foxp3 em dot plot (D). Por fim, foi criado um histograma para avaliar o percentual de células produtoras de IL-10 e a média de intensidade de fluorescência para estimar a quantidade de IL-10 que estava sendo produzida pelas Tregs (Figura 9).

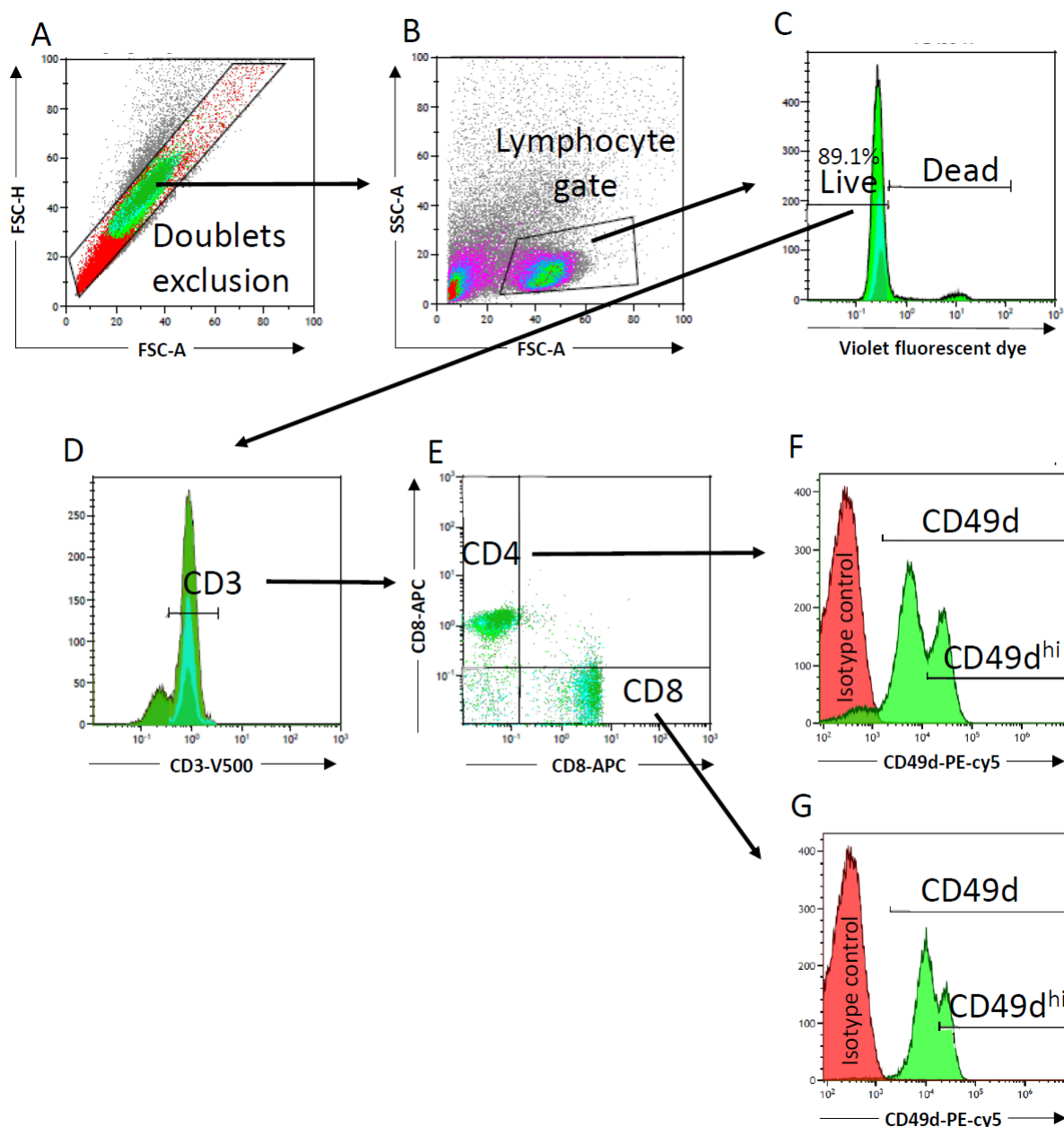


Figura 8. Protocolo de análise citofluorimétrica de integrinas. **A.** Dotplot de FSC-A x FSC-H para definir região eletrônica contendo PBMC e exclusão dos doublets. **B.** Dentro da região definida em (A) foi criado um dotplot de FSC-A x SSC-A para determinar região eletrônica que define o provável tamanho e a granularidade de linfócitos. **C.** Dentro da região eletrônica dos linfócitos foi criado histograma para definir a população de células com viabilidade. **D.** Dentro da população de células viáveis foi criado histograma para definição da população de linfócitos T CD3⁺. **E.** Dentro da população CD3⁺ foi criado dotplot para definição das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. **F, G.** Dentro das populações CD3⁺CD4⁺ ou CD3⁺CD8⁺, respectivamente, foram criados histogramas para definição do percentual total de células que expressam as moléculas de integrina (CD49d, CD49e ou CD49f). Além disso, também foi determinada a população de linfócitos T com alta intensidade de expressão das integrinas (CD49d^{hi}, CD49e^{hi} e ou CD49f^{hi}). A curva em vermelho refere-se às células incubadas com controle isotipo para determinar a intensidade de fluorescência considerada positiva para os marcadores.

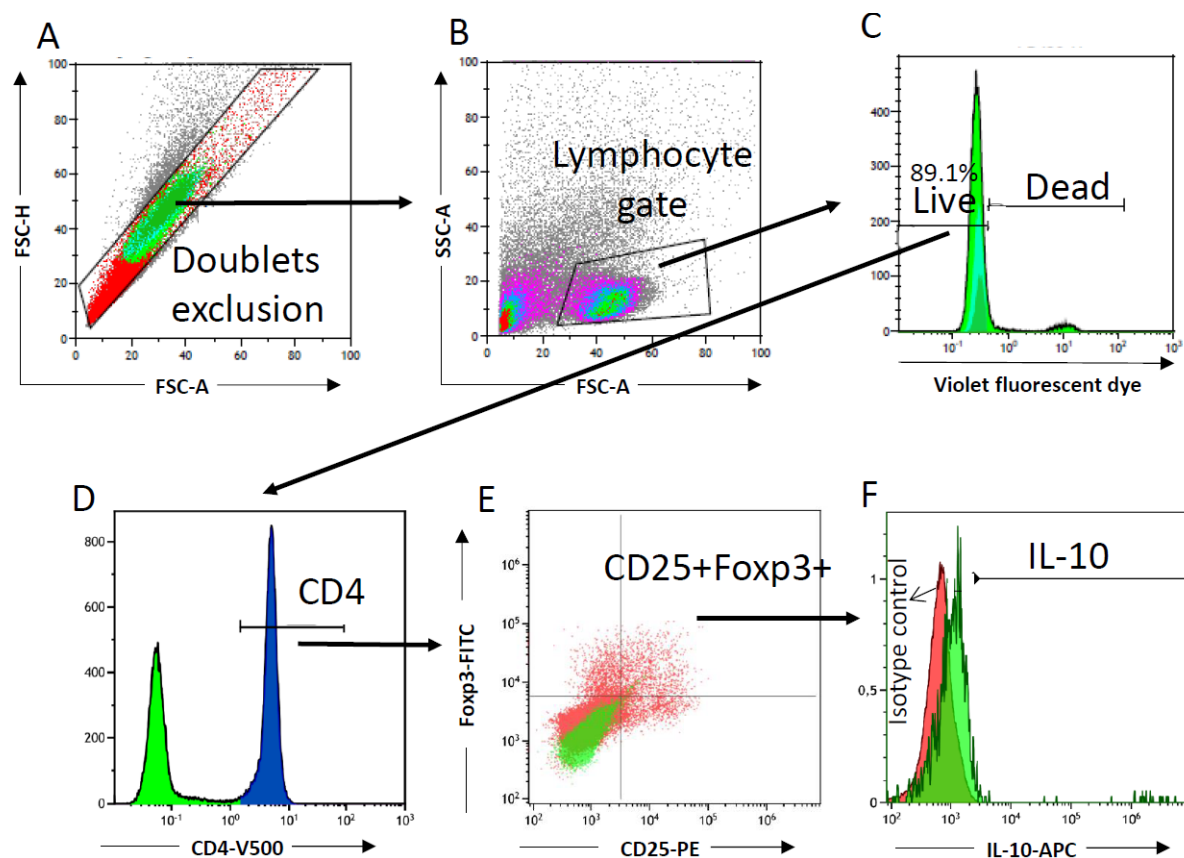


Figura 9. Protocolo de análise citofluorimétrica de Tregs. **A.** Dotplot de FSC-A x FSC-H para definir região eletrônica contendo PBMC e exclusão dos doublets. **B.** Dentro da região definida em (A) foi criado um dotplot de FSC-A x SSC-A para determinar região eletrônica que define o provável tamanho e a granularidade de linfócitos. **C.** Dentro da região eletrônica dos linfócitos foi criado histograma para definir a população de células com viabilidade. **D.** Dentro da população de células viáveis foi criado histograma para definição da população de linfócitos CD4⁺. **E.** Dentro da população CD4⁺ foi criado dotplot para definição das subpopulações de linfócitos CD25⁺Foxp3⁺. A população em verde representa a amostra de células incubadas com controles isotipos. **F.** Dentro da população CD25⁺Foxp3⁺ foi criado histograma para definição do percentual de células que produzem a citocina IL-10.

4.5.8 Quantificação de Citocinas Plasmáticas

Os níveis de IL-8, MIP-1 β , IL-6, IL-10, IFN- γ , IL-1 p, IL-13, IL-7, IL-12 e IL-5 a partir de amostras de plasma foram determinados utilizando-se um imunoensaio biométrico multiplex contendo microbeads fluorescentes (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). Os níveis de citocinas foram calculados pela tecnologia Luminex (Bio-Plex Workstation, Bio-Rad Laboratories, EUA). A análise dos dados foi realizada utilizando o software fornecido pelo fabricante (Bio-Rad Laboratories, EUA). Foi utilizada uma variação de 0,5 a 8 000 pg/ml de citocinas recombinantes para estabelecer as curvas padrão e a sensibilidade do ensaio.

4.5.9 Quantificação da Carga Proviral

A carga proviral dos pacientes infectados com HTLV-1 foi quantificada por meio da técnica de PCR em tempo real anteriormente descrita por Tamegão-Lopes *et al.* (2006). Foi utilizado o sistema *TaqMan*® (Applied Biosystems, Foster City, CA) de três sequências: como controle endógeno foi utilizado o gene da albumina; como alvo foram utilizadas as regiões não homólogas do gene *pol* do HTLV-1. As sequências de iniciadores e sondas utilizadas na técnica da PCR em tempo real estão descritas no Quadro 1. A PCR foi feita utilizando-se o conjunto de reagentes *TaqMan* Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, EUA), de acordo com as instruções do fabricante para um volume final de 30 µL. A plataforma StepOnePlus (Applied Biosystems, EUA) foi utilizada com o seguinte protocolo: 50°C por 2 minutos; 95°C por 10 minutos; 50 ciclos de 90°C por 50 segundos e 60°C por 1 minuto.

Para o cálculo da quantificação absoluta foi utilizada a seguinte equação (considerando a contagem de leucócitos por mm³ feita através de hemograma no laboratório de análises clínicas do Hospital de Pronto Socorro do Guamá):

$$2^{-CT \text{ Alvo}} / 2^{-CT \text{ Albumina}} \times \text{Leucócitos} \times 2$$

Os valores de carga proviral estão expressos em número de cópias de DNA do HTLV-1 integrados no genoma do hospedeiro por mm³ de sangue.

Quadro 1. Sequência nucleotídica de iniciadores e sondas utilizadas na PCR em tempo real para quantificação de carga proviral de pacientes com HTLV-1.

<i>Alvo</i>	<i>Sequência (5'-3')</i>
<i>Iniciadores</i>	
HTLV-1 F	GAACGCTCTAATGGCATTCTTAAAACC
HTLV-1 R	GTGGTTGATTGTCCATAGGGCTAT
Albumina F	GCTCAACTCCCTATTGCTATCACA
Albumina R	GGGCATGACAGGTTTTGCAATATTA
<i>Sondas</i>	
HTLV-1	FAM-ACAAACCCGACCTACCC-NFQ
Albumina	FAM-TTGTGGGCTGTAATCAT-NFQ

4.5.10 Riscos

A coleta de sangue sempre traz algum desconforto habitual, porém foi muito bem tolerada pelos pacientes. Todos os procedimentos foram realizados com técnica asséptica, tendo sido utilizadas medidas de biossegurança necessárias para evitar riscos de infecção para o paciente e para quem coletou as amostras. Quanto ao risco de rompimento do sigilo de informações, visando evitar tal problema, tomamos o cuidado de construir um Termo de Sigilo de Informações, o qual foi assinado por todos os colaboradores do projeto.

4.6 Análise estatística

As comparações realizadas entre os grupos (controle, oligo/assintomáticos e HAM/TSP) foram realizadas por teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunns nos casos em que os dados não apresentavam distribuição gaussiana. A análise paramétrica de variância (ANOVA) tendo Bonferroni como pós-teste foi utilizada quando os dados assumem distribuição gaussiana para comparações múltiplas (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, EUA). Para análise de correlação, foi utilizado o teste não paramétrico de Spearman. Foram consideradas estatisticamente significativas as diferenças que apresentaram p valor inferior a 0,05.

4.7 Comparação dos grupos

As amostras foram divididas em três grupos: dois grupos de voluntários portadores de HTLV-1, denominados de grupo A – Oligo/assintomáticos e B- portadores de HAM/TSP; e um terceiro grupo, com voluntários não infectados pelo HTLV, e que também não estivessem infectados com HIV, denominado de C- controle. A denominação “oligo/assintomáticos” para o grupo A refere-se àqueles indivíduos que estão infectados, porém não apresentam o diagnóstico de HAM/TSP. A maioria dos portadores de HTLV-1 são indivíduos queixosos, frequentemente apresentando relatos de poliartralgias, e outros sintomas relacionados a dor e limitação crônicas (Bittencourt, 2009; Romanelli, 2010; Santos, 2017). Pouco se encontra indivíduos sem nenhuma queixa em absoluto. Portanto, consideramos que o termo correto para o grupo A seria “oligo/assintomáticos” equivalente a “pouco sintomáticos” ao invés de “assintomáticos”; mas no contexto do estudo onde a referência comparativa são os indivíduos

com a doença neurológica (HAM/TSP), consideramos a referência subentendida “sem sintomas de HAM/TSP” mais apropriada. O número de indivíduos inseridos em cada grupo apresentou uma divisão heterogênea, já que o número de portadores de HAM/TSP inseridos no estudo segue os registros estabelecidos nos desenhos epidemiológicos, onde somente 3% a 5% podem evoluir para a forma neurológica grave, sendo então esta uma população mais difícil de encontrar.

4.8 Considerações éticas

Este projeto obedece às normas da Resolução 466/12 (MS/CNS, 2012), que trata da regulamentação das diretrizes e normas padronizadas para pesquisas envolvendo seres humanos no Brasil e está de acordo com a Declaração de Helsinki de 1975, revisada em 1983. Após a aprovação e antes de serem inseridos no estudo, todos os participantes e/ou seus responsáveis foram informados sobre a natureza da pesquisa, a voluntariedade na participação e os prejuízos e benefícios oriundos deste projeto, através do Termo de Consentimento Livre e Informado. A voluntariedade na participação só foi aceita mediante assinatura do termo de consentimento pelos pacientes ou seus representantes legais.

O projeto foi aprovado pela Plataforma Brasil com o número CAAE 30762614.0.3001.5172, pelo Comitê de Ética da Fiocruz- IOC. Todos os documentos relacionados às autorizações exigidas pela Plataforma Brasil encontram-se em anexo, como Termos de Anuência das instituições coparticipantes, autorização da pesquisa pela Plataforma Brasil, modelos de Termo de Consentimento Livre e Informado, Termo de Sigilo de informações e Ficha de Avaliação dos pacientes (Anexos).

5 RESULTADOS

Os resultados foram divididos conforme as características desenvolvidas dentro da pesquisa básica e aplicada. Todos os sujeitos do estudo foram acompanhados individualmente, e submetidos primeiramente à entrevista e avaliação funcional, para o que considerou-se no exame, as disfunções encontradas que estavam relacionadas à infecção pelo HTLV-1, sendo classificadas nesta etapa como: físico-funcionais, cognitivas e sensoriais. Em

seguida, foram realizadas as coletas de sangue para a investigação de parâmetros imunológicos. Portanto, serão apresentadas como resultados do estudo duas seções, onde a primeira é constituída de resultados clínico-funcionais, epidemiológicos e demográficos; a segunda seção trata dos resultados do perfil imunológico apresentado por esses indivíduos, onde foi utilizada a análise citofluorimétrica para a avaliação das integrinas, assim como as análises de quantificação de citocinas e quimiocinas envolvidas na infecção pelo HTLV-1.

5.1 Características clínicas, demográficas e epidemiológicas de pacientes infectados pelo HTLV-1/2 e não infectados

No período de agosto de 2014 a fevereiro de 2016 foram recrutados 110 portadores de HTLV-1, a maioria deles acompanhados no ambulatório de referência do Núcleo de Medicina Tropical e 15 indivíduos não infectados. Do total de infectados, ocorreram perdas por desistência de voluntários em participar do projeto, critérios excludentes e por descongelamento acidental de amostras, totalizando 67 indivíduos participantes soropositivos para HTLV-1 (n=60) ou HTLV-2 (n=7) (Tabela 1). Deste total, parte destes indivíduos apresentavam nenhum ou poucos sintomas e foram classificados como oligo/assintomáticos (n=49). Dentre estes foi observada uma mediana de 45 anos de idade (menor idade= 1 ano; maior idade= 78 anos), e 33/49 eram do gênero feminino (Tabela 1). Os demais indivíduos foram classificados como portadores de HAM/TSP (n=18), sendo que os mesmos apresentaram mediana de 55,5 anos de idade (menor idade= 40 anos; maior idade= 71 anos), e 14/18 eram do gênero feminino (Tabela 1). Em relação aos indivíduos controles não infectados (n=15), foi observada uma mediana 27 anos de idade, sendo (menor idade= 19 anos; maior idade= 43 anos), e 7/15 eram do gênero feminino (Tabela 1). Em relação aos indivíduos não portadores de HAM/TSP 19/49 apresentavam algum sintoma relacionado a lesão do sistema nervoso. A mediana do tempo de aparecimento dessas lesões nos indivíduos oligossintomáticos foi de 5 (cinco) anos. Dentre os indivíduos HAM/TSP a mediana deste tempo de aparecimento das lesões relacionadas ao sistema nervoso foi de 7 (sete) anos (Tabela 1).

Tabela 1. Características clínico-epidemiológicas dos indivíduos infectados pelo HTLV-1/2 com (HAM/TSP) e oligo/assintomáticos e indivíduos não-infectados atrelados ao estudo.

Grupo	Caracterização	Idade (anos)	Gênero	Início dos sintomas (anos)	Manifestações
A1	Oligo/assintomático	43	F	3	dor lombar e MMII
A2	Oligo/assintomático	40	F	2	Dor lombar
A4	Oligo/assintomático	64	F	5	dorsalgia e lombalgia
A6	Oligo/assintomático	71	M	13	gonalgia bilateral
A7	Assintomático	45	M		N
A8	Oligo/assintomático	62	F	22	disf. vesic leve , urgência ao urinar, dificuldade para eliminar a urina
A9	Oligo/assintomático	32	F	2	dores nas costas, formigamento de mãos e pés
**A10	Oligo/assintomático	70	F	10	dor MMII, marcha claudicante
A11	Assintomático	37	F		N
**A12	Assintomático	47	F		N
**A14	Assintomático	40	F		N
**A16	Assintomático	16	M		N
A20	Oligo/assintomático	61	F	5	perda urinária diurna
A21	Oligo/assintomático	63	M	15	lombalgia
A22	Oligo/assintomático	41	M	8	dor MMII
**A23	Assintomático	1	F		N
**A24	Assintomático	35	M		N
A25	Oligo/assintomático	71	F	3	astenia, fraqueza MMII, perda urinária diurna e noctúria
A26	Assintomático	34	M		N
A27	Assintomático	22	M		N
A28	Oligo/assintomático	42	F	1	dermatite na face e couro cabeludo
A29	Oligo/assintomático	49	F	0.08	câncer de mama
A30	Oligo/assintomático	72	F	0.08	dermatite na face, orelhas, couro cabeludo, dor nas pernas
A31	Assintomático	47	M		N
A32	Oligo/assintomático	35	F	0.08	IU de repetição
A33	Assintomático	50	M		N
**A34	Assintomático	61	F		N
A35	Oligo/assintomático	49	F	5	dificuldades as vezes para urinar, eliminar urina totalmente
A36	Assintomático	27	F		N
A37	Assintomático	42	M		N
A38	Assintomático	36	M		N
A39	Assintomático	58	F		N
A40	Assintomático	43	F		N
A41	Assintomático	39	F		N

A42	Assintomático	59	M		N
A43	Oligo/assintomático	78	F	10	distúrbios de equilíbrio
A44	Assintomático	25	F		N
A45	Assintomático	35	F		N
A46	Assintomático	63	F		N
A47	Assintomático	52	M		N
A48	Assintomático	21	M		N
A49	Assintomático	42	F		N
A50	Assintomático	53	F		N
A51	Oligo/assintomático	45	F	8	formigamento de MMII, edema de extremidades inferiores
A52	Assintomático	52	F		N
A53	Assintomático	60	F		N
A54	Oligo/assintomático	45	F	3	fraqueza nas pernas, tropeça bastante,
A55	Assintomático	49	M		N
A56	Assintomático	29	F		N
P1	HAM/TSP	64	F	10	fraqueza MMII, dores lombares, urgência miccional
P2	HAM/TSP	43	M	6	espasticidade grave, deambula com muletas, disf vesical leve
P3	HAM/TSP	54	F	4	cadeirante, espasticidade grave, disf vesical grave
P5	HAM/TSP	71	F	4	Espasticidade grave MMII, dores lombares, urgência miccional
P6	HAM/TSP	42	M	3	sangramento urinário, disfunção vesical, bexiga flácida, espasticidade
P7	HAM/TSP	54	F	7	espasticidade MMII, pé escavante, disf vesical leve, IU
P8	HAM/TSP	61	F	0.4	disf vesical leve, incontinência urinária, formigamento nas pernas, dificuldade em subir escadas, incontinência urinária leve
P9	HAM/TSP	57	M	1	incontinência urinária moderada, anda com auxílio de muletas, espasticidade MMII
P10	HAM/TSP	53	F	5	
P11	HAM/TSP	63	F	16	espasticidade moderada, auxílio de muletas, incontinência urinária noturna
P12	HAM/TSP	63	F	10	espasticidade MMII, déficit de deambulação, disf vesical moderada
P13	HAM/TSP	40	F	19	incontinência urinária e constipação intestinal
P14	HAM/TSP	65	F	19	

P15	HAM/TSP	49	M	10	síndrome sicca, cadeirante, espasticidade grave de MMII
P16	HAM/TSP	48	F	5	dores articulares, cansaço, gonalgia bilat, fadiga muscular, perda urinária durante o dia ao fazer esforços
P17	HAM/TSP	49	F	4	leve distúrbio de marcha perda urinaria diurna
P18	HAM/TSP	61	F	10	cadeirante, incontinência urinaria, usa fraldas
U1	Uveíte	65	F	10	uveíte e poliartralgia
C1	Controle	22	M		
C2	Controle	25	F		
C3	Controle	27	M		
C4	Controle	19	F		
C5	Controle	29	M		
C6	Controle	25	F		
C7	Controle	30	F		
C8	Controle	32	M		
C9	Controle	27	M		
C10	Controle	27	F		
C11	Controle	42	F		
C13	Controle	27	M		
C14	Controle	43	F		
C15	Controle	25	M		
C16	Controle	29	M		

Grupo A= indivíduos assintomáticos e oligossintomáticos; grupo P= HAM/TSP; MMII= membros inferiores; IU= infecção urinária. N= nenhuma manifestação. **= indivíduos HTLV-2.

Durante o estudo, foram identificados seis agrupamentos familiares (Figura 7). Todos os indivíduos incluídos no presente estudo e pertencentes a um dos agrupamentos familiares foram caracterizados clinicamente. Apenas os indivíduos do agrupamento familiar A obteve análises de resposta imune em relação a caracterização fenotípica de linfócitos T (resultados no artigo) quanto a presença de integrinas. Este foi o agrupamento com maior número de indivíduos e com a maior diversidade de manifestações clínicas associadas (Figura 7A). Apenas um de seis agrupamentos familiares foi caracterizado por apresentar infecção por HTLV-2, e por não apresentar nenhum caso de HAM/TSP dentre os indivíduos analisados (Figura 7D). Entre os cinco agrupamentos familiares cujos indivíduos foram caracterizados por apresentar infecção por HTLV-1, quatro destes apresentaram casos de HAM/TSP (Figura 7).

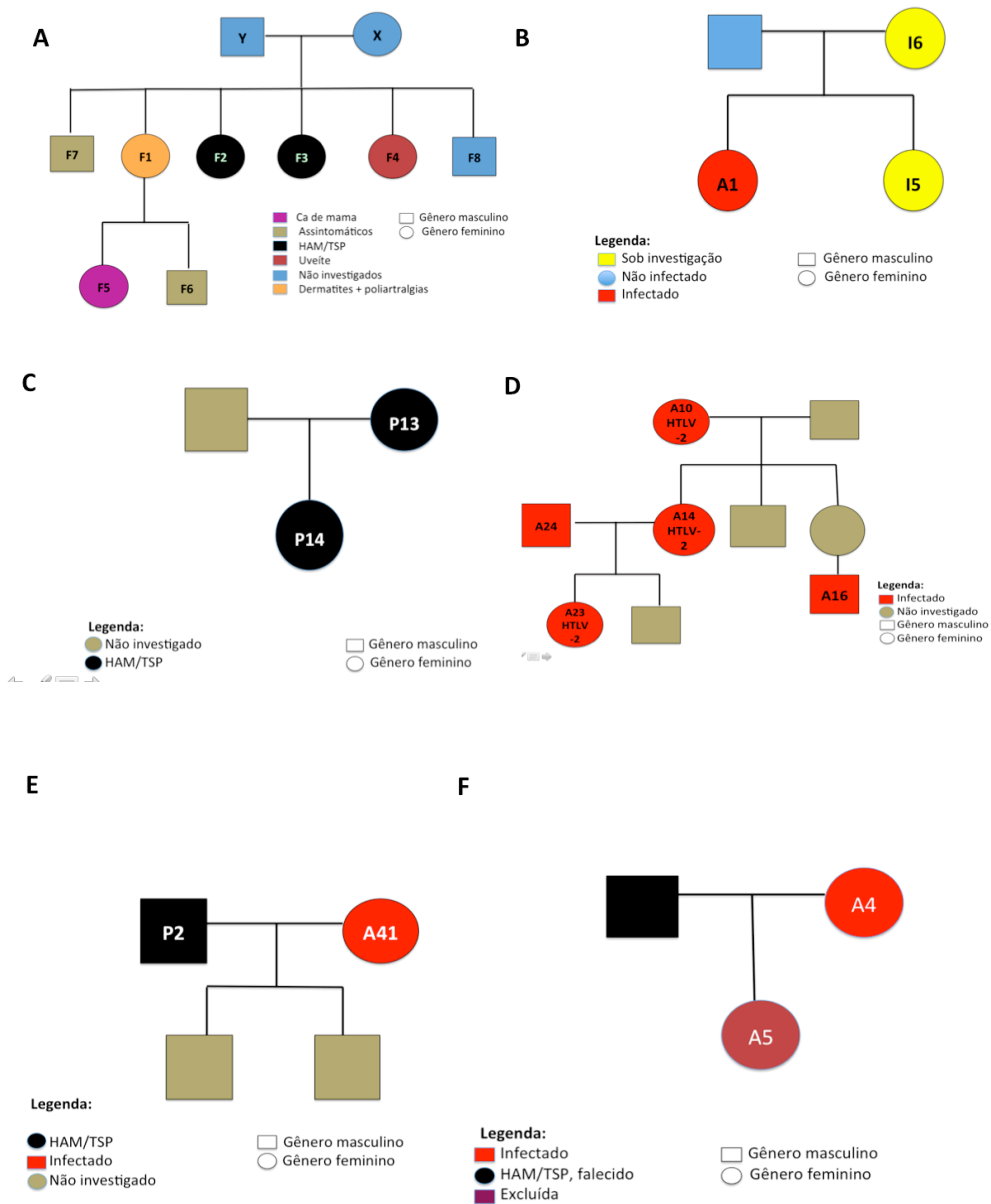


Figura 10. Heredogramas das famílias de indivíduos infectados por HTLV-1/2 participantes do estudo. Identificação dos indivíduos: A= Assintomático; P= HAM/TSP; I= Sob investigação; F: integrantes da família que foram submetidos a investigação imunológica (letra A)

5.2 Resposta imunológica de indivíduos infectados por HTLV-1

Para avaliação de parâmetros relacionados a resposta imunológica de indivíduos infectados por HTLV foram selecionados do total de pacientes listados acima, 18 voluntários positivos para HTLV-1, sendo 9 indivíduos portadores de HAM/TSP e 9 indivíduos oligo/assintomáticos. Além destes, também foram incluídos 5 indivíduos controles não infectados por HTLV. Estas amostras foram selecionadas de forma pareada por gênero e idade entre os grupos HAM/TSP e oligo/assintomáticos. Na Tabela 2 constam os dados das características clínico-epidemiológicas dessas amostras.

Tabela 2. Características clínico-epidemiológicas de amostras pareadas de indivíduos infectados pelo HTLV-1

Código Paciente	Gênero	Idade (anos)	Início Sintomas (anos)	Características Clínicas	Carga proviral (cópias/ml)
A8	Fem	62	22	Disf. Urinária	11600.00
A20	Fem	61	5	Disf. Urinária	204.54
A25	Fem	71	3	Fraqueza de MMII Disf. Urinária	7600.00
A29	Fem	49	1	Câncer de Mama	2652. 3
A30	Fem	72	1	Dermatite Poliartralgias Disf. Urinária	1557. 7
A31	Masc	47	-----	Assintomático	569. 0
A35	Fem	49	5	Disf. Urinária	99.95
A37	Masc	42	-----	Assintomático	177. 01
A42	Masc	59	-----	Assintomático	Indetect
P3	Fem	54	4	HAM/TSP Disf. Urinária	1377. 24
P5	Fem	71	4	HAM-TSP Disf. Urinária	21. 53
P6	Masc	42	12	HAM/TSP Disf. Urinária	226.19
P8	Fem	61	4	HAM/TSP Parestesia Disf. Urinária	4529. 8
P7	Fem	54	7	HAM/TSP Parestesia Disf. Urinária	2437. 7
P9	Masc	57	1	HAM/TSP Disf. Urinária	337. 24
P11	Fem	63	16	HAM/TSP Disf. Urinária	297. 5
P15	Masc	49	10	HAM/TSP Síndrome Sicca Disf. Urinária	7922. 01
U1	Fem	65	10	Uveíte Poliartralgia Fraqueza de MMII; Parestesia	1215. 0

A= portadores oligo/assintomáticos; P= portadores HAM/TSP; MMII= membros inferiores.

A distribuição de gênero de indivíduos oligo/assintomáticos foi de três homens e seis mulheres. Outros seis portadores do gênero feminino e três do gênero masculino integraram o grupo HAM/TSP (Tabela 2). Não há diferença de idade entre o grupo dos portadores

oligo/assintomáticos (mediana: 59 anos; menor idade= 42 anos; maior idade=72 anos), em comparação com o grupo HAM/TSP (mediana: 57 anos; menor idade= 42 anos; maior idade= 71 anos) (Tabela 2). Entre os indivíduos oligo/assintomáticos, o dano neurológico mais frequente foi a disfunção urinária (5/9). Apenas três dos nove indivíduos não apresentaram sintomas neurológicos (Tabela 2). Oito dos nove indivíduos do grupo HAM/TSP apresentaram disfunção urinária associada à Paraparesia Espástica Tropical (Tabela 2). A carga viral de indivíduos HAM/TSP (mediana: 1215.0 cópias/ml; IQR: 261.9-3484.0 cópias/ml; n = 9) foi 2,1 vezes maior que o grupo oligo/ assintomático (mediana: 569.0 cópias/ml; IQR: 138.5-5126.0 cópias/ml; n= 9), mas sem diferença significativa (Tabela 2). Os resultados referentes a expressão de integrinas em linfócitos T CD4 e T CD8 provenientes dos 18 indivíduos descritos acima, serão apresentados no formato de artigo para publicação que poderá ser analisado nas páginas consecutivas.

Artigo

Aumento da expressão de CD49d em linfócitos T circulantes de pacientes infectados por HTLV-1

Resumo

A paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1 é uma mielopatia progressiva crônica associada a inflamação do sistema nervoso central (SNC) e caracterizada por uma infiltração perivascular de células inflamatórias. Células infectadas pelo HTLV-1 possui capacidade de migrar através da camada endotelial pela indução da expressão de receptores/ligantes associados a migração. Linfócitos T interagem com a matrix extracelular por meio de receptores de integrinas e estas interações afetam tanto a migração celular quanto a proliferação. A importância dessas interações em doenças induzidas pela infecção por retrovírus permanece pouco esclarecida. No presente estudo foram investigadas a expressão de três integrinas de cadeia alfa (CD49d, CD49e e CD49f) na superfície de subtipos de células T provenientes de pacientes infectados por HTLV-1, tanto para HAM/TSP quanto para indivíduos oligo/assintomáticos. Foi observada uma alta frequência de linfócitos T CD4⁺CD49d^{hi} e T CD8⁺CD49d^{hi} provenientes do sangue periférico de pacientes infectados por HTLV-1, e este aumento de expressão pode estar diretamente associado com a habilidade dos linfócitos T em infiltrar o tecido nervoso, tanto em indivíduos oligo/assintomáticos quanto em HAM/TSP. É plausível que a alta expressão dessa integrina em leucócitos é importante para o aumento do processo inflamatório do tecido, e possivelmente relacionado com o desenvolvimento das manifestações neurológicas. Nossos achados apontam para o potencial uso da integrina CD49d como alvo para desenvolvimento de estratégias terapêuticas de indivíduos infectados por HTLV-1, com objetivo de bloquear a migração de linfócitos T ativados para o sistema nervoso central e impedir a progressão para HAM/TSP.

Palavras-chave: HTLV-1, linfócitos, integrinas, VLA-4, CD49d

Title

CD49d is upregulated in circulating T lymphocytes from HTLV-1 infected patients

Running Title

CD49d is upregulated in HTLV-1 infection

Araújo Janahú L^{1,2}, Da Costa C A³, Valinotto ACR³, Santana B³, Ribeiro-Lima J¹, Bertho AL⁴, Savino W^{5,6}, Da-Cruz AM^{1,6}, Gomes-Silva A⁷.

1. Interdisciplinary laboratory of Medical Research, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil.
2. Nucleus of tropical medicine, Federal University of Pará, Brazil.
3. Virology laboratory, Federal University of Pará, Brazil.
4. Immunoparasitology laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil.
5. Tymus research laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil.
6. National Institute of Science and Technology on Neuroimmunomodulation, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil
7. Clinical Research Laboratory on Mycobacteria, Evandro Chagas National Institute of Infectology, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil.

Corresponding author: Adriano Gomes-Silva, Av. Brasil 4365, Pavilhão Cardoso Fontes Sala 21, Manguinhos, Rio de Janeiro-RJ, Brazil. CEP 21040-360

Tel.: 00.55.21.2562-1034

E-mail: adriano.gomes@ini.fiocruz.br

Abstract

HTLV-1-associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis (HAM-TSP) is a chronic progressive myelopathy characterized by an inflammation of central nervous system (CNS) characterized by perivascular infiltration of inflammatory cells. HTLV-1 infected cells have capacity to migrate through endothelial layer by induction of adhesion receptor expression and corresponding ligands. T cells interact with the extracellular matrix via integrin receptors and these interactions affect both cellular migration and proliferation. The importance of these interactions in retrovirus-induced diseases, however, remains less clear. Herein we studied the expression of three integrin alpha-chains (CD49d, CD49e and CD49f) on the membrane of T-cell subsets in patients infected by HTLV-1, both HAM/TSP patients and oligo/asymptomatic subjects who were asymptomatic or presented some manifestations related to the virus infection. It was observed higher peripheral blood frequency of CD4⁺CD49d^{hi} and CD8⁺CD49d^{hi} T cells in HTLV-1 infected patients and such abnormality may be directly linked to the ability of T lymphocytes to gain the nervous tissue, in both oligo/asymptomatic and HAM/TSP infected subjects. It is plausible that the high expression of this integrin on leucocytes is important to enhance tissue inflammatory process and it is likely related to the development of neurological manifestations. Our findings points to the potential use of CD49d as target for therapeutic approach aiming to block migration of activated T cells from HTLV-1 infected patients into the CNS and avoid the progression to HAM/TSP.

Key words: HTLV-1, lymphocytes, integrin, VLA-4,

Introduction

Infection by the Human T-cell Lymphotropic virus type one (HTLV-1), is currently recognized as a public health problem, being spread in several countries, with approximately 20 million infected individuals worldwide (WHO, 1989; Gessain, 2012). Brazil counts around 2 million infected subjects, and the state of Pará stands for one third in Brazilian prevalence of HTLV-1, possibly related to the expressive numbers of Japanese community and remnants of African communities living in the state (Edlich et al., 2000; Vallinoto, 2004; Carneiro-Proietti et al., 2012; Brazil, 2013, Proietti, 2015).

HTLV-1 has been associated with several diseases, including the HTLV-1 Associated Myopathy/Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP); being a more deleterious form of the nervous system affection, with severe, progressive and irreversible motor impairment, spasticity, paraparesis, paresthesia and sphincter alterations, among others (Osame, 2002; ASIA, 2000; WHO, 1989). Because of its prolonged latency and low pathogenicity, only 2%-5% of the carrier individuals progress to severe forms, although significant numbers of patients exhibit other associated manifestations, such as dermatological, ophtalmological, rheumatological and auto-immune illnesses (Castro-Costa 2006; Casseb 2008; Ciminale 2014; Quaresma 2016). The mechanisms leading to the progression to HAM/TSP are still unclear, but the immune system may be involved.

Active chronic damage of central nervous system (CNS) from HAM/TSP patients have been characterized by perivascular infiltration of inflammatory cells (Romero, 2000). The interactions between HTLV-1-infected lymphocytes and brain endothelial cells and/or infection of the latter may lead to damage of the blood brain barrier (BBB) (Afonso 2008; Miller, 2012; Curis 2016). This may be an important step in determining the progression to neurological disease and seems to precede the development of CNS inflammation (Al-Fahim, 1999). Tight junctions between nervous and microvascular endothelial cells that form the BBB constitute the first obstacle to the entry of HTLV-1 into the CNS; previous studies showed these cells can be infected both *in vitro* and *in vivo* (Romero, 2000; Ho, 1984; Hoxie, 1984). Moreover, increased adhesion of T lymphocytes from HAM/TSP patients to endothelial cells when compared to patients with other neurological disease was reported (Ichinose, 1994; Ichinose 1996; Nakamura 1996). These data strongly indicate an alteration of endothelial cell function in the neuropathology associated with HTLV-1, playing an important role in the pathogenesis of HAM/TSP.

In a second vein, integrins play a role in HTLV-1 spread by participating in the formation of

the virological synapse (Tarasevich, 2015; Gross 2016; Fukushima, 2008), which is considered another form of HTLV infection, in addition to the well known cell-to-cell transmission (Igakura, 2003; Fukushima, 2008).

HTLV-1 infected cells have capacity to migrate through endothelial layer by induction of adhesion receptor expression and corresponding ligands (Romero, 2000). As a consequence of HTLV, infected endothelial cells from CNS lose the BBB function, allowing leukocyte traffic from blood to the nervous tissue, including HTLV infected T lymphocytes. The presence of the virus activates immune cells to produce inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β and IL-6), which will then contribute to disrupt the BBB integrity and increase the inflammatory process that evolves to the HAM/TSP clinical condition (Curis, 2016; Kahn, 2017).

These components, as well as membrane-bound co-stimulatory molecules, develop an important role on increasing cell adhesion by up-regulating the expression or affinity of certain adhesion molecules as for example the ligand receptor pair VLA-4/VCAM-1 (respectively expressed on leukocytes and endothelial cells) whose interaction is important for transmigration of T cells from the blood. Interestingly, the integrin VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$; also known as CD49d/CD29) can also bind to fibronectin and this interaction is relevant for cell migration within the tissues (Ala, 2002; Pinto-Mariz, 2015).

Studying a noninfectious neuromuscular disease, namely Duchenne Muscle Dystrophy (DMD), we recently showed that relative numbers of circulating CD49d^{hi} CD4⁺ T and CD49d^{hi} CD8⁺ T cells in DMD boys could be applied as a biomarker of disease progression. Moreover, T cells bearing these phenotypes could preferentially cross endothelial cell barrier and fibronectin meshwork, and strongly adhered onto monolayers of human myotubes (Pinto-Mariz et al, 2015).

Herein, we showed that CD49d is upregulated in circulating T lymphocytes from HTLV-1 infected patients, and such abnormality may be directly linked to the ability of T lymphocytes to gain the nervous tissue, in both asymptomatic and HAM/TSP infected subjects.

Material and Methods

Patients and Ethical Clearance

This cross-sectional study included 18 subjects infected with HTLV-1 who had acquired the infection in endemic areas from Pará, Brazil. Five non-infected volunteers from the same endemic area were used as controls. Written informed consent was obtained from all

participants. The study obeys Helsinki declaration and was approved by Oswaldo Cruz Foundation and Tropical Medicine Center Ethical Committees.

Eighteen subjects were classified into two groups in accordance with neurological symptomatic characteristics: HAM/TSP (n=9) that presented diagnostic of important neurological disease associated with HTLV-1 infection, and oligo/asymptomatics (n=9) who had light or no signs and symptoms related to neurological pathology. These groups were initially paired by age and gender. Data collection occurred from June 2014 to February 2016. HTLV-1 spread is historically linked to a family distribution in clusters, where the Japanese and African descendants have greater representation (Vallinoto, 2006). Within the groups of infected individuals described above, we further performed a specific study on a single family cluster of six HTLV-1 infected patients with history of previous HTLV-1 related diseases were compared with HTLV-1 infected patients from non-cluster families.

Cell surface cytofluorometric staining

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained by blood centrifugation over a Histopaque 1077 density gradient (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). Purified PBMC were counted and adjusted to 5×10^6 cells/mL of freezing solution (90% of fetal calf serum (Cultilab, Campinas, Brazil) and 10% of DMSO (Sigma) and kept at liquid nitrogen until phenotypical analysis. Following PBMC thawing, the cell quality was ascertained by the percentage of cell recovery and viability by trypan blue counting (Sigma). All the samples used for phenotyping analyses presented over than 80% of both parameters. Cells were kept in resting with RPMI-1640 (Sigma) supplemented with 10% heat-inactivated human AB serum (Sigma), 10 mM HEPES, 1-5 mM L-glutamine, 0-04 mM 2-mercaptoethanol, 200 IU/ml of penicillin and 200 mg/ml of streptomycin (Sigma), during overnight incubation in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37°C. Then, 300,000 cells were incubated during 30 min in dark with the fluorochrome-labeled monoclonal antibodies: CD3-V500, CD4-APC-Cy7, CD8-APC, CD49d-PeCy5, CD49e-PE, CD49f-FITC (BD Biosciences). After washing the cells, samples were fixed with 1% paraformaldehyde and kept in dark at 4°C until acquisition at the flow cytometer. In all case, Ig/fluorochrome matched unrelated antibodies were applied as negative controls.

Acquisitions, gated in the typical lymphocyte morphological profile were performed using the Cytotflex Flow Cytometer (Beckman Coulter Inc, CA, USA). The limits for the quadrant markers and histograms were always set based on non-staining cells and isotype controls, and color compensations were made based on simple labeling samples. A multiparametric flow

cytometric protocol to determine the frequencies of T lymphocytes expressing CD49d was developed in Kaluza 1.5a software (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA), and the resulting graphics are shown in supplementary figure 1. Accordingly, we first defined a lymphocyte electronic region at forward scatter versus side scatter dot plots. A histogram was created to define the percentage of T lymphocytes (CD3⁺) into the previous region and a double dot plot was constructed to define cell percentage expressing CD4 and CD8 within the T lymphocyte population. A further histogram was then created to determine the percentages of different T cell subsets expressing CD49d, CD49e and CD49f. Moreover, the percentage of lymphocytes expressing high levels of integrin molecules (CD49d^{hi}, CD49e^{hi} and CD49f^{hi}) was determined by those cells that presented high intensity of fluorescence in each CD4 or CD8-defined T-cell subset. All cytometric results were expressed as median of cell percentage; (interquartile range- IQR percentile 25% - 75%).

Statistical analysis

The comparison of different groups (Control, Oligo/Asymptomatic or HAM/TSP) was done by non-parametric Kruskal-Wallis with Dunns post-test (for data assumed not to follow a Gaussian distribution). Parametric one-way analysis of variance with Bonferroni post-test was used when the data assumed Gaussian distribution. For correlation analysis it was used a non-parametric Spearman teste. The significance level was $p \leq 0.05$. In the case of comparisons of CD49d expression in family *versus* non-family groups of infected individual, we applied the Student's *t* test.

Results

Clinical, demographic and virological analyses

General features of patients are summarized in Table 1. The gender distribution of oligo/asymptomatic subjects was three male and six female. Another six female and three male integrated the HAM/TSP group. There is no difference between age of oligo/asymptomatic subjects (median: 59 years old; IQR: 48.0-66.5 years old) in comparison with HAM/TSP group (median: 57 years old; IQR: 51.5-64.0 years old). Among the oligo/asymptomatic subjects the most frequent neurological damage was urinary dysfunction (5/9). Three out of nine subjects did not present neurological symptoms, whereas eight out of nine HAM/TSP subjects presented urinary dysfunction associated with Tropical Spastic Paraparesis. The proviral load from HAM/TSP subjects (median: 1215.0 copies/mL; IQR:

261.9-3484.0 copies/mL; n=9) was 2.1 higher than oligo/asymptomatic group (median: 569 copies/mL; IQR: 138.5-5126.0 copies/mL) but without significant difference ($p>0.05$).

Integrin alpha-chain expression on T cell subsets

We first evaluated the global expression levels of three integrin alpha-chains (CD49d, CD49e, CD49f) known to be related to T-cell activation. As shown in table 2, no difference was seen among the relative numbers of cells expressing CD49d, CD49e and CD49f, integrins alpha-chains of fibronectin receptors (CD49d, CD49e) and laminin receptor (CD49f). However, when the cells expressing high amounts of these integrin alpha-chains were analyzed by cytofluorometry, we observed a higher percentage of peripheral blood CD49d^{hi}CD4⁺ T cells from oligo/asymptomatic subjects (median: 51.4%; IQR: 38.1%-62.0%) than non-infected subjects (median: 27.7%; IQR: 17.8% - 35.4%; $p<0.05$). Although, the levels of CD49d^{hi}CD4⁺ T cells in oligo/asymptomatic kept higher than HAM/TSP subjects (median: 33.1%; IQR: 29.3% - 37.7%), no statistical significance was observed. Differently, HAM/TSP subjects had a higher percentage of CD49d^{hi}CD8⁺ T cells (median: 70.0%; IQR: 56.7% - 86.8%) than non-infected subjects (median: 39.4%; IQR: 30.5%-61.1%; $p<0.05$), and it was similar to oligo/asymptomatic subjects (median: 78.3%; IQR: 52.8% - 83.5%) (Figure 1).

By contrast, there was no significant differences among these groups when were analyzed the percentage of CD4⁺ or CD8⁺ T cells expressing CD49e^{hi} or CD49f^{hi} (Table 2).

Considering that we had both males and females, with varying ages, we verified whether or not there are fluctuations in the contents of CD49d^{hi}CD4⁺ and CD49d^{hi}CD8⁺ T cell subsets. Nevertheless, no significant differences were seen, as a function of gender or age, not only in health subjects, but also in the HTLV-1 infected patients (Supplementary Figure 2a-d).

The routes of HTLV-1 transmission are blood, sexual intercourse or mother to child, mainly through breastfeeding. Moreover, familiar clustering could be favored by other different factors (Saito, 2012). The number of individuals infected in the same family group varies from two to four members, and a recent study showed that 83% of infected individuals, whose families had a history of previous HTLV-1 related disease, presented the same clinical manifestations (Alvarez 2015). In Brazil, previous reports approached the distribution and consequences of HTLV on carriers who belong to family groups with history of previous HTLV disease (Alvarez 2015; Mendes 2016; Da Costa 2013; Cloves 2009; Nobre 2006; Primo 2005; Ribas 2003; Araújo 2002; Pombo-de-Oliveira 2001; Carvalho 1995; Cavalcanti 1993). We then studied the relative numbers of CD49d^{hi}CD4⁺ and CD49d^{hi}CD8⁺ T-cell

subpopulations in members of family cluster of HTLV-1 infected individuals, and compared them with non-familiar infected patients. However, in both familiar and non-familiar groups no differences were found, as shown in Supplementary figure 3.

Discussion

Previous studies performed in HAM/TSP patients revealed increased adhesion and transmigration through human endothelial cells of circulating activated CD4⁺ T cells bearing high expression of lymphocyte function antigen-1 (LFA-1,) (Ichinose, 1994, 1996). Furthermore the interruption of integrin/ligand signaling in HTLV-1-infected T cell lines derived from HAM/TSP patients with anti-integrin-blocking antibodies significantly suppressed HTLV-1 production, suggesting the importance of these molecules on the development of HTLV-related neurological disease (Fukushima, 2008).

On the other hand, expression of integrin-type extracellular matrix receptors have not been reported in circulating T lymphocytes from HTLV-1 infected patients. Herein we studied the expression of three integrin alpha-chains (CD49d, CD49e and CD49f) on the membrane of T-cell subsets in patients infected by HTLV-1, both HAM/TSP patients and infected carriers, who were asymptomatic or presented some manifestations related to the virus infection.

We first examined the total membrane expression of these molecules in circulating T-cell subsets and no significant changes were detected between healthy controls and HTLV-1 infected subjects. Nevertheless, when we evaluated the relative numbers of T-cells highly expressing CD49d, we did find differences between infected *versus* non-infected individuals, although the values seen in HAM/TSP patients were statistically similar to those found in asymptomatic/oligosymptomatic individuals. This suggests that once infection is established, activated T cells expressing higher amounts of VLA-4 will be able to cross the endothelial barrier at the CNS.

Previous studies on the expression of CD49d in peripheral blood T lymphocytes from boys developing a non-infectious neuromuscular disease, Duchenne Muscular Dystrophy, revealed increased numbers of both CD4⁺CD49d^{hi} and CD8⁺CD49d^{hi} T cells, which actually were capable of migrating through an endothelial barrier as well as through a fibronectin matrix. Importantly, *ex-vivo* treatment of migrating cells with anti-CD49d monoclonal antibody, preferentially blocked migration of those cells expressing high amounts of CD49d on their membranes (Pinto-Mariz et al, 2015). In this study, we showed that CD49d^{hi} T cells had an activated phenotype, with expression of HLA-DR. Accordingly, it is plausible that the higher peripheral blood frequency of CD4⁺CD49d^{hi} and CD8⁺CD49d^{hi} T cells in HTLV-1 infected

patients is likely related to the development of neurological manifestations, since the high expression of this integrin on leucocytes is important to enhance tissue inflammatory process. Yet, CD49d high expression does not discriminate oligo/asymptomatic *versus* HAM/TSP patients. Actually, we found that, as compared to healthy controls, the relative numbers of CD4⁺CD49d^{hi} T cells were significantly higher in oligo/asymptomatic patients whereas significantly increased numbers of CD8⁺CD49d^{hi} T cells were seen in HTLV-1 infected patients with HAM/TSP.

Interestingly, it has been shown that the percentage of CD4⁺ and CD8⁺ T cells expressing high density of CD49d was apparently higher in both patients with HAM/TSP and HTLV-1 carriers, as compared to controls, but this difference reached statistic significance only in asymptomatic carriers (Al Fahim, 1999).

In any case, our findings points to the potential use of CD49d as target for therapeutic approach aiming to block migration of activated T cells from HTLV-1 infected patients into the CNS, similar to what has been described for multiple sclerosis (Yednock et al., 1992; Polman et al., 2006).

Acknowledgements

This work was funded by Focem (MercoSur), Fiocruz, CNPq, Capes and Faperj (Brazil). It as conducted in the framework of the Brazilian National Institute of Science and Technology on Neuroimmunomodulation, funded by CNPq.

References

- Afonso P V, Ozden S, Cumont M C, Seilhean D, Cartier L, Rezaie P, Mason S, Lambert S, Huerre M, Gessain A, Couraud P O, Pique C, Ceccaldi P E, Romero I A. 2008. Alteration of blood-brain barrier integrity by retroviral infection. PLoS Pathog, November, Volume 4, Issue 11, 1-11.
- Alvarez C *et al* 2015. A Peruvian family with a high burden of HTLV-1- associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. BMJ Case Rep, 1-4.
- Ala A, Dhillon A P, Hodgson H J. 2002. Role of cell adhesion molecules in leukocyte recruitment in the liver and gut . International Journal of Experimental Pathology, 84, 1-16.
- Al-Fahim A, Cabre P, Kastrukoff L, Dorovini-Zis K, Oger J. 1999. Blood mononuclear cells in patients with HTLV-I-associated myelopathy: lymphocytes are highly activated and adhesion to endothelial cells is increased. Cell Immunol; 198 (1):1–10.
- American Spinal Injury Association (ASIA). 2000. International Standards for Neurological Classifications of Spinal Cord Injury. Revised Ed. Chicago, Ill: American Spinal Injury Association: 1-23.

- Araújo AP, Fontenelle, LM, Pádua PA, Maia Filho HS, and de Araújo AQ. 2002. Juvenile Human T-Lymphotropic Virus Type 1-associated myelopathy. *Clin. Infect. Dis*, 201–204.
- Brasil. Ministério da Saúde. Guia de Manejo Clínico da Infecção pelo HTLV. Brasília, DF. 2013.
- Carneiro-Proietti ABF, Sabino EC, Leão S, Salles NA, Loureiro P, Saar M, et al.. Human T-Lymphotropic Virus Type 1 and Type 2 Seroprevalence, Incidence, and Residual Transfusion Risk Among Blood Donors in Brazil During 2007–2009. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2012; 28: 1265-72.
- Carvalho SMF, Noronha, H, Bezerra, AC, Reis, AMM, Silva EA, Couto FRC, et al. The study of HTLV transmission in infected individuals in Brazil. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 10, 264. 1995.
- Casseb J et al. 2008. Presence of Tropical Spastic Paraparesis/Human T-cell Lymphotropic Virus Type 1-Associated Myelopathy (TSP/HAM)-Like Among HIV-1-Infected Patients. *Journal of Medical Virology*, 80: 392–398.
- Castro-Costa CM, Araújo AQC, Barreto MM, et al. 2006. Proposal for diagnostic criteria of Tropical Spastic Paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy (TSP/HAM). *AIDS Res Human Retrovirus*; 22: 931-935.
- Cavalcanti M, Ferreira Júnior, O, Puccioni M, Novis S, and Schechter M. HTLV-I-associated neurologic manifestations in four generations of a Brazilian family. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 6, 213–217. 1993.
- Chung, CH, Wu, WB, Huang, TF. Aggretin, a snake venom-derived endothelial integrin antagonist, induces angiogenesis via expression of vascular endothelial growth factor. *Blood* 2004; 103: 2105-12.
- Ciminale V *et al.* 2014. HTLV-1 and HTLV-2: highly similar viruses with distinct oncogenic properties. *Frontiers in Microbiology*. 5: 13, 1-8.
- Cloves, A S, Coelho-Dos-Reis, J G A, Nobre, V A, GIPH (Grupo Interdisciplinar de Pesquisa em HTLV), and Barbosa-Stancioli, E F. Quantitative Anti-HTLV-1 Reactivity Profile Evaluation of Persons from a Family with High Prevalence of Infection and Dermatological Disorders Associated with HTLV-1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 25:P-073. 2009.
- Curis C *et al.* 2016. Human T-Lymphotropic Virus Type 1-Induced Overexpression of Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule (ALCAM) Facilitates Trafficking of Infected Lymphocytes through the Blood-Brain Barrier. *Journal of Virology*, Vol. 90 No. 16, p. 7303-7312.
- Da Costa CA, Furtado KC, Ferreira L de S, Almeida D de S, Linhares Ada C, Ishak R, et al. 2013. Familial Transmission of human T-cell lymphotropic virus: silent dissemination of an emerging but neglected infection. *PLoS Negl Trop Dis*; 7: e2272.
- Edlich RF, Arnette, JA, Wiliam FM. Global epidemic of human T–cell lymphotropic virus types I (HTLV-I). *The Journal of Emergency Medicine*, v.18, p. 109-119, 2000.
- Fukushima N, Nakamura T, Nishiura Y, Ida H, Aramaki T, Eguchi K. HTLV-I Production Based on Activation of Integrin/Ligand Signaling in HTLV-I-Infected T Cell Lines Derived from HAM/TSP Patients. *Intervirology* 2008; 51:123–129.
- Gessain A, Cassar O. Epidemiological aspects and world distribution of HTLV-1 infection. *Frontiers in Microbiology* 2012, nov, 1-23.

- Gross C, Kress A. 2016. Molecular Mechanisms of HTLV-1 Cell-to-Cell Transmission. *Viruses*, 8, 74, 20-22.
- Ho YK *et al.* HTLV-1 Tax-Induced Rapid Senescence is Driven by the Transcriptional Activity of NF- κ B and depends on chronically activated IKK and p65/RelA. *Journal of Virology* 2012; vol 86, no. 17, p. 9474–9483.
- Hoxie JA, Matthews DM, and Cines DB. 1984. Infection of human endothelial cells by Human T-cell Leukaemia virus type I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 7591–7595.
- Ichinose K, Nakamura T, Nishiura Y, Nagasato K, Ohishi K, Watanabe H, Fujita A, Kurouji K, Tsujihata M, Nagataki S: Characterization of adherent T cells to human endothelial cells in patients with HTLV-I-associated myelopathy. *J Neurol Sci* 1994; 122: 204–209.
- Ichinose K, Nakamura T, Nishiura Y, Tsujino A, Goto H, Shirabe S, Furuya T, Nagataki S: Characterization of T cells transmigrating through human endothelial cells in patients with HTLV-I-associated myelopathy. *Immunobiology* 1996/97; 196: 485–490.
- Igakura T, Stinchcombe JC, Goon PK, Taylor GP, Weber JN, Griffiths GM, Tanaka Y, Osame M, Bangham CR: Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. *Science* 2003; 299: 1713–1716.
- Iwasaki Y. Pathology of chronic myelopathy associated with HTLV-I infection (HAM/ TSP). *J Neurol Sci* 1990; 96: 103–123.
- Jones JL, Walker RA. Integrins: a role as cell signaling molecules. *J Clin Path Mol Path* 1999; 52: 208-13.
- Khan MY, Khan IN, Farman M, Al Karim S, Qadri I, Kamal MA, Al Ghamdi K, Harakeh S. 2017. HTLV-1 Associated Neurological Disorders. *Current Topics in Medicinal Chemistry*.
- Mendes *et al.* Human T-cell lymphotropic virus-1 infection: three infected generations in the same family. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop* 2016; vol. 49, no.5, Uberaba sept./oct.
- Miller F, Afonso P, Gessain A, Ceccaldi P E. 2012. Blood-brain barrier and retroviral infections. *Virulence*, volume 3 issue 2, 222-229.
- Nakamura T, Nishiura Y, Ichinose K, Shirabe S, Tsujino A, Goto H, Furuya T, Nagataki S. Spontaneous Proliferation of and Cytokine Production by T Cells Adherent to Human Endothelial Cells in Patients with Human T-Lymphotropic Virus Type I-Associated Myelopathy. *Intern Med.* Mar; 35 (3): 195-9. 1996.
- Nobre V, Guedes AC, Martins ML, Barbosa-Stancioli EF, Serufo, JC, Proietti FA, *et al.* 2006. Dermatological findings in 3 generations of a family with a high prevalence of Human T cell Lymphotropic Virus type 1 infection in Brazil. *Clin. Infect. Dis*; 43, 1257–1263.
- Osame M, Usuku K, Izumo S, Ijichi N, Ami-tani H, Igata A, Matsumoto M, Tara M: HTLV-I associated Myelopathy, a new clinical entity. *Lancet* 1986; i: 1031–1032.
- Osame M: Pathological mechanisms of human T-cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy (HAM/TSP). *J Neurovirol* 2002; 8: 359–364.
- Pinto-Mariz *et al.* CD49d is a disease progression biomarker and a potential target for immunotherapy in Duchenne muscular dystrophy. *Skeletal Muscle* 2015; 5:45.
- Pinto-Mariz *et al.* Differential integrin expression by T lymphocytes: Potential role in DMD muscle damage. *Journal of Neuroimmunology* 2010; 223: 128–130.
- Primo JR, Brites C, Oliveira MF, Moreno-Carvalho O, Machado M, and Bittencourt AL. 2005. Infective dermatitis and human T cell lymphotropic virus type 1-associated

myelopathy/tropical spastic paraparesis in childhood and adolescence. *Clin. Infect. Dis.* 41, 535–541.

Pombo-de-Oliveira MS, Carvalho SM, Borducchi D, Dobbin J, Salvador J, Correa RB *et al.* 2001. Adult T-cell leukemia/lymphoma and cluster of HTLV-I associated diseases in Brazilian settings. *Leuk. Lymphoma* 42, 135–144.

Proietti AB F. HTLV- Cadernos Hemominas. 6a. Ed. Belo horizonte: Fundação Hemominas. 2015.

Quaresma *et al.* HTLV-1, Immune Response and Autoimmunity. *Viruses* 2016; 8: 5, 1-10.

Rampoldi E, Meola G, Conti AM, Velicogna M, Larizza L. A comparative analysis of collagen III, IV, laminin and fibronectin in Duchenne muscular dystrophy biopsies and cell cultures. *Eur J Cell Biol* 1986; 42: 27–34.

Ribas JG, Melo GC, Catalan-Soares BC, and GIPH-HTLV Research Group. 2003. HTLV-I familiar infection: vertical transmission in three generations. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*; 19 (Suppl. 1), S-32.

Romero I *et al.* 2000. Interactions between Brain Endothelial Cells and Human T-Cell Leukemia Virus Type 1-Infected Lymphocytes: Mechanisms of Viral Entry into the Central Nervous System. *Journal of Virology*, July, 6021–6030.

Saito M, Bangham C. 2012. Immunopathogenesis of Human T-Cell Leukemia Virus Type-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis: Recent Perspectives. *Leukemia Research and Treatment*. 7: 1-9.

Tarasevich A, Filatov A, Pichugin A, Mazurov D. Monoclonal antibody profiling of cell surface proteins associated with the viral biofilms on HTLV-1 transformed cells. *Acta Virology*, Sep; 59 (3): 247-56. 2015.

Vallinoto A C R *et al.* Serological and molecular evidence of HTLV-1 infection among Japanese immigrants living in the Amazon region of Brazil. 2004. *Jpn J Inf Dis*, 57, 156-159.

World Health Organization (WHO). 1989. Human T lymphotropic virus type 1, HTLV-1. *Wkly. Epi- demiol. Rec.* 64, 382–383.

Figure Legends

Figure 1. Frequency of T lymphocytes expressing high intensity of integrin in HTLV-1 infected and non-infected subjects. The percentage of (A) CD4⁺T lymphocyte, and (B) CD8⁺ T lymphocyte that present CD49d^{hi} are showed for non-infected and HTLV-1 infected subjects (oligo/asymptomatic and HAM/TSP). Each symbol represents one individual. For each group the central line indicates the median value, and the below and above lines indicated the 25%-75% interquartile range (IQR), respectively. * p<0.05; ** p<0.01.

Supplementary Figure 1. Multiparametric flow cytometric protocol to determine the frequencies of T lymphocytes expressing integrin. **A.** First a forward scatter-area (FSC-A) versus forward scatter-height (FSC-H) dotplot was created to define electronic region containing PBMC and exclusion of doublets. **B.** Within the region defined in (A) an FSC-A versus side scatter-area (SSC-A) dotplot was created to determine the electronic region that defines the likely size and granularity of lymphocytes. **C.** Within the lymphocyte electron region, a histogram was created to define the cell population with viability. **D.** Within the population of viable cells, a histogram was created to define the population of CD3⁺ T lymphocytes. **E.** Within the CD3⁺ population, a dotplot was created to define the subpopulations of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes. **F and G.** Within the CD3⁺CD4⁺ or CD3⁺CD8⁺ populations, respectively, two histograms were created to define the percentage of total cells expressing integrin molecules (CD49d, CD49e or CD49f). In addition, the population of T lymphocytes with high intensity of integrin expression (CD49d^{hi}, CD49e^{hi} or CD49f^{hi}) was also determined. The red curve refers to cells incubated with isotype control to determine the fluorescence intensity considered the cut-off value to define the positive cell population.

Supplementary Figure 2. The age and gender of HTLV-1 infected subjects did not influence the frequency of T lymphocytes expressing CD49d^{hi}. **A.** Correlation between the percentage of CD4⁺CD49d^{hi} T lymphocytes and the age (years old) of infected subjects. **B.** Correlation between the percentage of CD8⁺CD49d^{hi} T lymphocytes and the age (years old) of infected subjects. p = significance level; r = correlation index; **C.** Percentage of CD4⁺ or CD8⁺ T lymphocytes expressing CD49d^{hi} from subjects under 58 years old (<58 years old) or from subjects over 58 years old (>58 years old). **D.** Percentage of CD4⁺ or CD8⁺ T lymphocytes expressing CD49d^{hi} from male and female subjects. For each group the central line indicates the median value, and the below and above lines indicated the 25%-75% interquartile range

(IQR), respectively. Each point represent one subject HAM/TSP (filled circle) or Oligo/asymptomatic (open circle).

Supplementary Figure 3. Relative numbers of CD49d^{hi}CD4⁺ and CD49d^{hi}CD8⁺ T-cell subpopulations in members of non-familiar and familiar cluster of HTLV-1 infected individuals. The percentage of (A) CD4⁺T lymphocyte, and (B) CD8⁺ T lymphocyte that present CD49d^{hi} are showed for non-familiar and familiar cluster of HTLV-1 infected subjects. Each symbol represents one individual, HAM/TSP (filled square) and (open square) oligo/asymptomatic. For each group the central line indicates the median value, and the below and above lines indicated the 25%-75% interquartile range (IQR), respectively.

Table 1. Clinical, demographic and virological information of HTLV-1 infected subjects.

Patient identification	Gender	Age (years)	Clinical Features	Viral load (copies/ml)
O/A1	Female	62	Urinary dysfunction	11, 600.0
O/A2	Female	61	Urinary dysfunction	204.5
O/A3	Female	71	Urinary dysfunction; Weakness of lower limbs	7, 600.0
O/A4	Female	49	Breast cancer	2, 652.3
O/A5	Female	72	Urinary dysfunction; Dermatitis; Poliarthralgy	1, 557.7
O/A6	Male	47	Asymptomatic	569.0
O/A7	Female	49	Urinary dysfunction	99.9
O/A8	Male	42	Asymptomatic	177.0
O/A9	Male	59	Asymptomatic	Undetectable
P1	Female	54	HAM/TSP; Urinary dysfunction	1, 377.2
P2	Female	71	HAM/TSP; Urinary dysfunction	21. 5
P3	Male	42	HAM/TSP; Urinary dysfunction	226.2
P4	Female	61	HAM/TSP; Urinary dysfunction; Paresthesia	4, 529.8
P5	Female	54	HAM/TSP; Urinary dysfunction; Paresthesia	2, 437.7
P6	Male	57	HAM/TSP; Urinary dysfunction	337.2
P7	Female	63	HAM/TSP; Urinary dysfunction	297.5
P8	Male	49	HAM/TSP; Urinary dysfunction; Sycca Syndrome	7, 922.0
P9	Female	65	Uveitis; Poliarthralgy; Weakness of lower limbs; Paresthesia	1, 215.0

O/A – Oligo/asymptomatic HTLV-1 subjects; **P** – symptomatic HTLV-1 subjects; **HAM/TSP**- HTLV-1-associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis

Table 2. Percentage of peripheral blood T lymphocytes expressing integrin from HTLV-1 infected and non-infected subjects.

T cell phenotyping	Non-infected (n=5)	Oligo/asymptomatic (n=9)	HAM/TSP (n=9)	Statistic
CD49d ⁺ in CD4 ⁺	84.7 (67.9-88.5)	83.2 (76.4-83.8)	72.9 (62.5-84.2)	n.s.
CD49d ⁺ in CD8 ⁺	98.1 (97.5-99.2)	98.2 (97.7-98.8)	98.8 (95.2-99.1)	n.s.
CD49e ⁺ in CD4 ⁺	72.4 (37.9-94.7)	78.3 (68.5-89.2)	71.1 (55.8-77.3)	n.s.
CD49e ⁺ in CD8 ⁺	72.7 (41.9-92.0)	86.3 (84.3-91.2)	81.9 (73.8-86.1)	n.s.
CD49f ⁺ in CD4 ⁺	47.0 (34.3-97.6)	66.6 (48.0-73.0)	55.0 (39.6-78.8)	n.s.
CD49f ⁺ in CD8 ⁺	33.6 (5.4-98.4)	28.3 (22.1-54.4)	30.1 (13.7-65.1)	n.s.
CD49d ^{hi} in CD4 ⁺	27.7 (17.8-35.4)	51.4 (38.1-62.0)	33.07 (29.3-37.7)	p <0.05^c
CD49d ^{hi} in CD8 ⁺	39.4 (30.5-61.1)	78.3 (52.8-83.5)	79.0 (56.7-86.8)	p <0.05^d
CD49e ^{hi} in CD4 ⁺	29.1 (19.3-38.8)	41.0 (34.88-56.31)	35.87 (26.2-46.9)	n.s.
CD49e ^{hi} in CD8 ⁺	38.1 (22.4-44.1)	37.3 (36.3-50.0)	39.87 (29.7-46.6)	n.s.
CD49f ^{hi} in CD4 ⁺	21.8 (20.2-30.3)	36.5 (31.1-44.4)	35.2 (26.5-54.4)	n.s.
CD49f ^{hi} in CD8 ⁺	10.2 (1.54-29.7)	8.3 (5.3-21.9)	8.1 (4.4-17.6)	n.s.

^a Percentage of cells; ^b 25%-75% Interquartile range; ^c statistical analyses comparison between non-infected and oligo/asymptomatic groups; ^d statistical analyses comparison between non-infected and HAM/TSP groups.

Figure Legends

Figure 1. Frequency of T lymphocytes expressing high intensity of integrin in HTLV-1 infected and non-infected subjects. The percentage of (A) CD4⁺T lymphocyte, and (B) CD8⁺ T lymphocyte that present CD49d^{hi} are showed for non-infected and HTLV-1 infected subjects (oligo/asymptomatic and HAM/TSP). Each symbol represents one individual. For each group the central line indicates the median value, and the below and above lines indicated the 25%-75% interquartile range (IQR), respectively. * p<0.05; ** p<0.01.

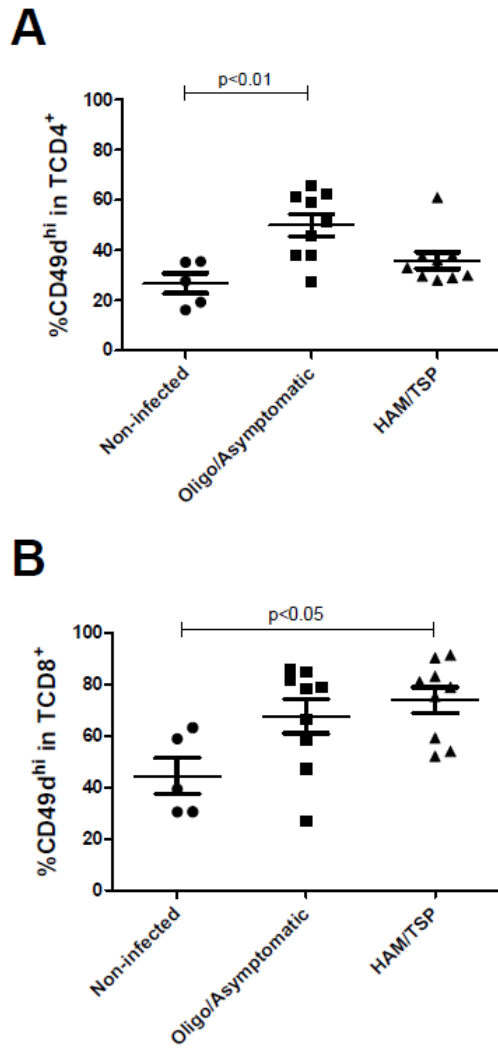
Supplementary Figure 1. Multiparametric flow cytometric protocol to determine the frequencies of T lymphocytes expressing integrin. **A.** First a forward scatter-area (FSC-A) versus forward scatter-height (FSC-H) dotplot was created to define electronic region containing PBMC and exclusion of doublets. **B.** Within the region defined in (A) an FSC-A versus side scatter-area (SSC-A) dotplot was created to determine the electronic region that defines the likely size and granularity of lymphocytes. **C.** Within the lymphocyte electron region, a histogram was created to define the cell population with viability. **D.** Within the population of viable cells, a histogram was created to define the population of CD3⁺ T lymphocytes. **E.** Within the CD3⁺ population, a dotplot was created to define the subpopulations of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes. **F and G.** Within the CD3⁺CD4⁺ or CD3⁺CD8⁺ populations, respectively, two histograms were created to define the percentage of total cells expressing integrin molecules (CD49d, CD49e or CD49f). In addition, the population of T lymphocytes with high intensity of integrin expression (CD49d^{hi}, CD49e^{hi} or CD49f^{hi}) was also determined. The red curve refers to cells incubated with isotype control to determine the fluorescence intensity considered the cut-off value to define the positive cell population.

Supplementary Figure 2. The age and gender of HTLV-1 infected subjects did not influence the frequency of T lymphocytes expressing CD49d^{hi}. **A.** Correlation between the percentage of T CD4⁺CD49d^{hi} lymphocytes and the age (years old) of infected subjects. **B.** Correlation between the percentage of T CD8⁺CD49d^{hi} lymphocytes and the age (years old) of infected subjects. p = significance level; r = correlation index; **C.** Percentage of T CD4⁺ or CD8⁺ lymphocytes expressing CD49d^{hi} from subjects under 58 years old (<58 years old) or from subjects over 58 years old (>58 years old). **D.** Percentage of T CD4⁺ or CD8⁺ lymphocytes expressing CD49d^{hi} from male and female subjects. For each group the central line indicates the median value, and the below and above lines indicated the 25%-75% interquartile range

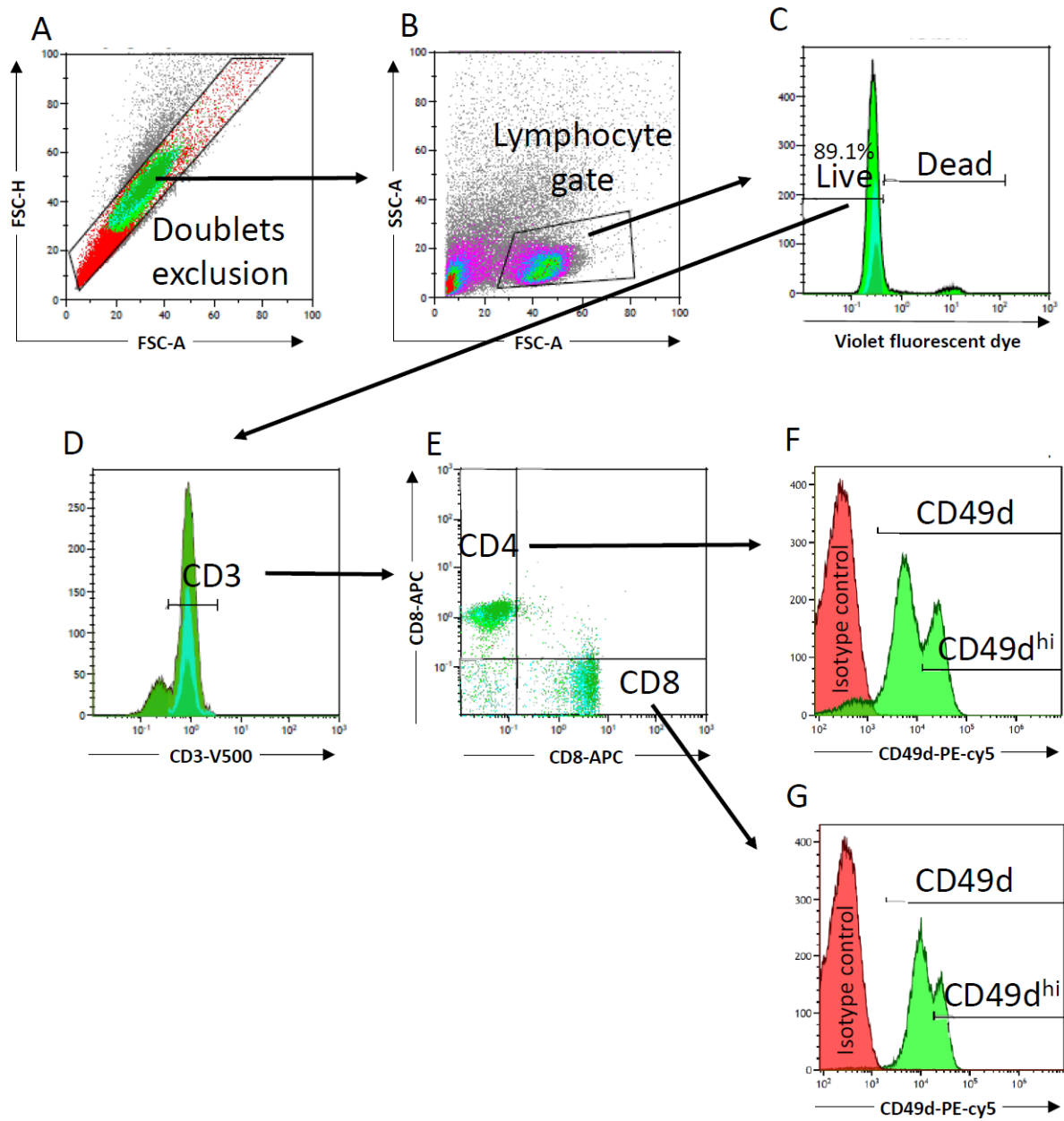
(IQR), respectively. Each point represents one subject HAM/TSP (filled circle) or Oligo/asymptomatic (open circle).

Supplementary Figure 3. Relative numbers of CD49d^{hi}CD4⁺ and CD49d^{hi}CD8⁺ T-cell subpopulations in members of non-familiar and familiar cluster of HTLV-1 infected individuals. The percentage of (A) CD4⁺T lymphocyte, and (B) CD8⁺ T lymphocyte that present CD49d^{hi} are showed for non-familiar and familiar cluster of HTLV-1 infected subjects. Each symbol represents one individual, HAM/TSP (filled square) and (open square) oligo/asymptomatic. For each group the central line indicates the median value, and the below and above lines indicated the 25%-75% interquartile range (IQR), respectively.

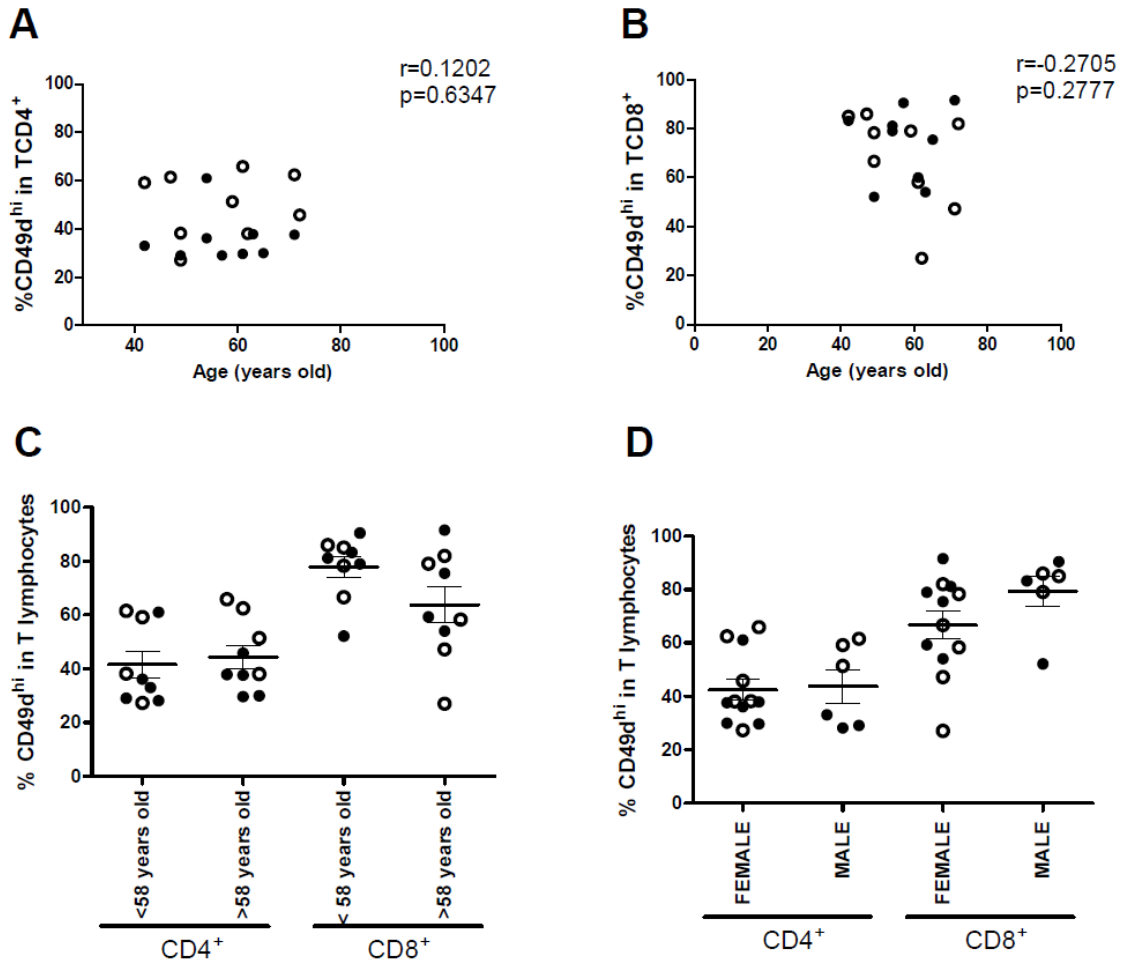
Figure 1



Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 2



5.2.2 Resultados Complementares

5.2.2.1 Análise de Citocinas

Não houve diferença significativa entre os níveis de citocinas plasmáticas quando grupos de indivíduos infectados (oligo/assintomáticos e HAM/TSP) e não infectados foram comparados.

Tabela 3. Níveis plasmáticos de citocinas em indivíduos infectados pelo HTLV-1 (oligoassintomáticos e HAM/TSP) e controles.

Citocinas (pg/ml)	Controles (não-infectados) (n=4)	Oligo/Assintomáticos (n=7)	HAM-TSP (n=7)	Estatística
IL-8	5.8 ^a (4.7-7.3) ^b	5.5 (3.9-22.4)	6.4 (5.5-12.8)	n.s.
MIP1 β	4.7 (1.7-5.5)	2.5 (1.2-21.4)	7.2 (2.1-208.9)	n.s.
IL-6	0.5 (0.3-18.7)	0.2 (0.1-0.9)	0.9 (0.5-15.2)	n.s.
IL-10	0.01 (0.01-26.3)	0.01 (0.01-0.01)	0.01 (0.01-35.0)	n.s.
IFN- γ	0.01 (0.01-84.9)	0.01 (0.01-12.4)	7.1 (0.01-17.7)	n.s.
IL-13	7.0 (1.1-981.6)	0.01 (0.01-10.2)	3.7 (0.01-5.8)	n.s.
IL-7	6.2 (0.01-28.3)	26.4 (12.4-77.0)	12.4 (5.2-77.0)	n.s.
IL-12	2.5 (1.3-360.1)	2.4 (1.1-3.0)	3.0 (3.0-9.0)	n.s.
IL-5	3.3 (2.4-4.9)	3.2 (2.4-3.2)	3.2 (3.2-5.2)	n.s.

5.2.2.2 Análise de células T regulatórias

Com o propósito de avaliar uma provável participação de células T regulatórias produtoras de IL-10 na evolução clínica de indivíduos infectados por HTLV-1, a frequência de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺IL-10⁺ ou a intensidade de produção de IL-10 por células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ foram avaliados nos indivíduos HAM/TSP, oligo/assintomáticos ou

controles não infectados. O percentual médio de células $CD4^+CD25^+Foxp3^+IL-10^+$ em indivíduos oligoassintomáticos (mediana=7.02%; IQR=2.25-10.65%; n=7) foi maior que em indivíduos HAM/TSP (mediana=3.97%; IQR=1.93-8.41%; n=4) e indivíduos controles não infectados (mediana=2.93%; IQR=2.51-3.54%; n=3) porém sem significância estatística (Figura 11A). Além disso, a intensidade média de fluorescência para IL-10 que reflete o nível de produção desta citocina por linfócitos $CD4^+CD25^+Foxp3^+$, foi maior nos indivíduos oligo/assintomáticos (mediana=24.97MFI; IQR=5.74-121.5MFI; n=7) em relação aos indivíduos HAM/TSP (mediana=10.37MFI; IQR=1.56-30.60MFI; n=4) e aos voluntários não infectados (mediana=3.25MFI; IQR=1.46-189.9MFI, n=3) porém sem significância estatística (Figura 11B).

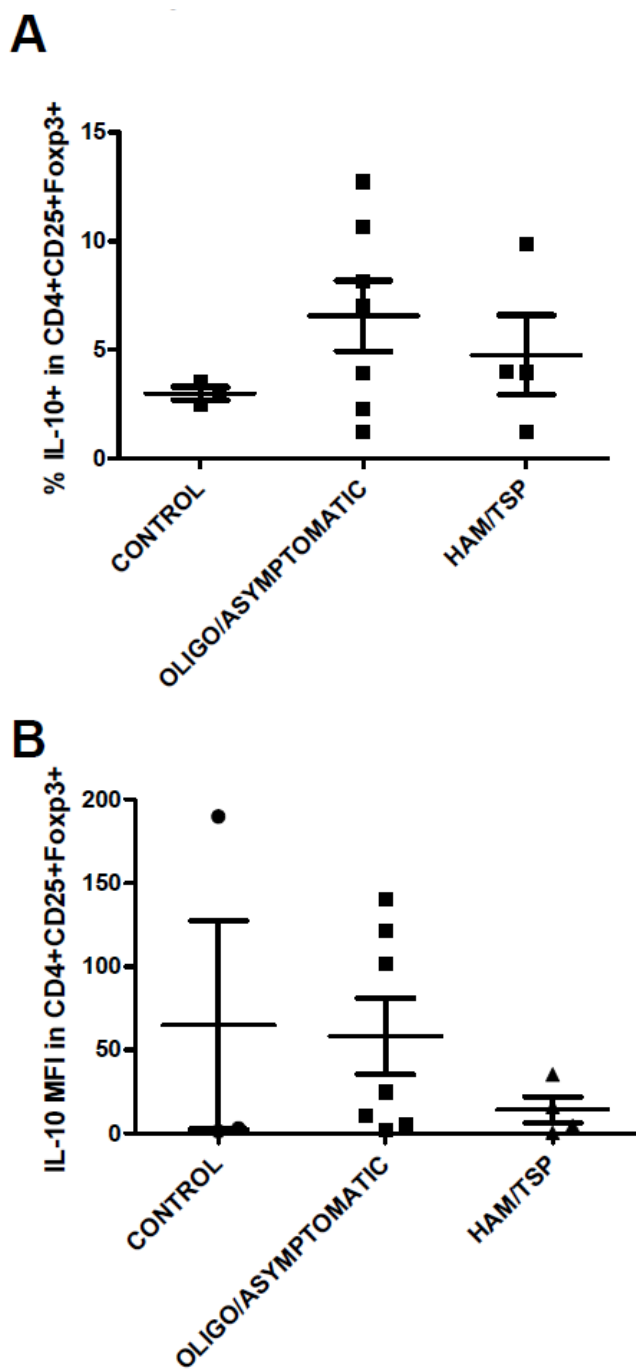


Figura 11. Análise de células T regulatórias em indivíduos não infectados (CONTROL) e infectados por HTLV-1 (OLIGO/ASYMPTOMATIC e HAM/TSP). (A) percentual de células Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺IL-10⁺. (B) Intensidade média de fluorescência (MFI) da citocina IL-10 em células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. Cada ponto representa um indivíduo. As linha horizontais representam os valores de mediana e intervalos interquartis 25% e 75%.

6 VIESES DA PESQUISA E DIFULDADES ENCONTRADAS

A falta de atualização de dados cadastrais de inúmeros pacientes e o preenchimento inadequado de informações contidas no prontuário foi um viés para a coleta de dados. A ausência dos pacientes e voluntários quando do agendamento das consultas no Laboratório, somado a não adesão ao tratamento, retardaram o início do trabalho de campo, optando-se a partir de então pela coleta e entrevista domiciliar. O acesso a várias localidades era difícil, pois algumas áreas eram consideradas acesso de risco, motivo pelo qual não foi possível incluir alguns infectados e grupos familiares. Quanto ao envio do material biológico, a logística para a coleta e o transporte de amostras Belém-Rio de Janeiro era complexa, e por vezes a demora na entrega ao destino final (LIPMED-IOC) foi maior que o desejável prejudicando o prosseguimento dos protocolos experimentais.

7 DISCUSSÃO

Durante o curso da evolução natural, o Sistema Nervoso Central se isolou do restante da circulação e de outros órgãos por meio de uma “parede” fisiológica denominada barreira hemato-encefálica (Rapoport, 1976); porém, estudos desenvolvidos experimentalmente mostram que a entrada dos linfócitos no SNC é permissiva e depende do seu estado de ativação (Devine, 1996; Hickey, 1991).

Estudos anteriores realizados em pacientes com HAM / TSP revelaram maior adesão e transmigração através de células endoteliais humanas T CD4⁺ ativadas circulantes expressando altos níveis de LFA-1 (Ichinose, 1994, 1996). Além disso, a interrupção da sinalização de integrina / ligante em linhagens de células T infectadas com HTLV-1 derivadas de pacientes com HAM / TSP através de anticorpos anti-integrina suprimiu significativamente a produção de HTLV-1, sugerindo a importância dessas moléculas no desenvolvimento de doença neurológica (Fukushima, 2008).

Neste estudo, demonstramos características clínicas e imunológicas de indivíduos infectados pelo HTLV-1, com destaque para o aumento do percentual de células T CD49d^{hi} expressas na superfície de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. A expressão de receptores de matriz extracelular para integrinas em linfócitos T circulantes de pacientes infectados com HTLV-1 ainda não havia sido descrita. Investigamos a expressão de três cadeias alfa (CD49d, CD49e e CD49f) na membrana de subpopulações de células T em portadores de HAM/TSP e

portadores infectados (não HAM/TSP), que eram assintomáticos ou apresentavam algumas manifestações relacionado à infecção pelo vírus.

As manifestações clínicas encontradas mostraram-se extremamente variadas nos indivíduos por nós investigados e em sua maior parte estiveram relacionadas à tecidos-alvo de processos inflamatórios, como tecido nervoso, oftalmológico e pele, envolvidos com intensa migração de leucócitos infectados para áreas específicas (Oliveira, 2007; Casseb 2008; Romanelli, 2010; Castro-Costa 2012; Ciminale 2014). Nossos estudos corroboram com tais afirmações quando evidenciam que a molécula de adesão mais expressa sendo um receptor de fibronectina esteve aumentada tanto nos indivíduos sintomáticos quanto nos assintomáticos.

Os portadores pertencentes ao grupo HAM/TSP apresentaram outras manifestações neurológicas além da paraparesia espástica, como distúrbios urinários, sinais estes bem definidos na literatura (Oliveira, 2007; Costa, 2012; Souza, 2012). É importante ressaltar que este tipo de disfunção também foi notado na maioria dos indivíduos oligo/assintomáticos. Tal manifestação tem grande representatividade como fator de risco para progressão da doença neurológica e tem sido considerada (se intensa) como primeiro sinal ou ainda como uma forma branda de HAM/TSP (Castro, 2002; Tanajura, 2012; Lima, 2016). Embora ainda não tenham sido totalmente compreendidos os mecanismos de comprometimento esfinteriano, é de grande importância que os indivíduos que apresentam comprometimento vesical independente da forma que se expressa (se bexiga espástica, incontinência urinária ou noctúria) sejam mantidos em observação e acompanhamento do tratamento para uma possível intervenção precoce em caso de progressão da doença. Apesar de apresentarem manifestações em comum, um diferencial entre os grupos infectados encontra-se no tempo do início dos sintomas, o qual foi quase três vezes maior no grupo oligoassintomático (média de 11 anos) que no grupo HAM/TSP (média de 4 anos). Tal aparecimento precoce das manifestações clínicas diante da inflamação do SNC parecem ter alguma relação com a resposta imune exacerbada que ocorre na mielopatia.

Durante a investigação, como esperado, apesar de não ter havido diferença significativa entre os grupos infectados, pacientes HAM/TSP apresentaram níveis mais elevados de carga proviral, duas vezes maior do que os valores apresentados por indivíduos do grupo oligo/assintomático, o que vai de acordo com vários estudos (Grant, 2002; Furukawa, 2003; Gonçalves, 2008; Montanheiro, 2009; Martins, 2015). Porém, os valores de carga proviral alta tem uma significância mais confiável como fator de risco para progressão de doença se estiverem associados a produção aumentada de citocinas pro-inflamatórias, como IFN- γ e TNF- α (Furukawa, 2003). Em uma associação da CPV com o estado clínico-

funcional, pesquisa anterior mostra que a CPV sofre flutuação durante o curso da infecção, podendo variar e atingir níveis mais baixos, e valores mais elevados são representativos apenas diante de incapacidade funcional bem definida, ainda que outros sintomas neurológicos tenham surgido precocemente (Furtado, 2012).

É concebível que o aumento das moléculas de adesão seja uma consequência de uma indução pelo vírus, já que a infecção pelo HTLV-1 *per se* aumenta a expressão da integrina VLA-4 nos linfócitos (Dhawan 1993; Al-Fahim *et al.* 1999). Portanto, altos níveis de expressão de CD49d⁺ indicam que essas células são preferencialmente infectadas pelo HTLV-1 e possuem maior capacidade de migrarem para o SNC.

Em nossos estudos foram avaliados como parâmetro inicial a expressão membranar total de CD49d, CD49e e CD49f em subpopulações do sangue periférico, sem diferenças significativas entre os grupos. Porém, ao analisarmos células com alta expressão de CD49d, foram constatadas diferenças significativas entre os indivíduos infectados e o grupo controle, sugerindo que, uma vez estabelecida a infecção, células T ativadas migram para o SNC e se tornam capazes de romper ou causar danos na barreira hematoencefálica. Uma outra hipótese a ser considerada é que tais alterações podem estar relacionadas ao tempo decorrido de infecção viral, onde o início de processos inflamatórios (fase aguda) no sistema nervoso, principalmente na medula espinhal, tende a diminuir com a evolução do processo infeccioso (anos e condição de doença) sendo gradualmente substituído por tecido fibrótico (Araújo 2006; Castro-Costa, 2006, 2012).

Considerando que os grupos continham indivíduos de ambos os gêneros, e idades diversas, verificamos se haveria ou não flutuações nos conteúdos das subpopulações de células T CD49d^{hi}CD4⁺ e CD49d^{hi}CD8⁺. No entanto, não foram observadas diferenças significativas.

Estudo anterior com linfócitos T do sangue periférico de portadores de doença com comprometimento neuromuscular de origem não infecciosa mostrou a ocorrência de elevada expressão de CD4⁺CD49d^{hi} and CD8⁺CD49d^{hi} e um perfil fenotípico ativado com expressão de HLA-DR, evidenciando a capacidade destas células infectadas em migrarem pela barreira endotelial (Pinto-Mariz *et al.*, 2015).

É perceptível que a alta expressão de CD49d não discrimina os portadores de HTLV-1 em sua condição clínica. A misteriosa progressão para a forma HAM / TSP que ocorre de 3%

a 5% de indivíduos infectados com HTLV-1 sugere fortemente a influência do sistema imunológico neste processo patológico. A frequência mais elevada no sangue periférico de CD4⁺CD49d^{hi} e CD8⁺CD49d^{hi} em pacientes oligo / assintomáticos pode ser uma das chaves para o desenvolvimento de manifestações neurológicas subclínicas, uma vez que a alta expressão desta integrina em leucócitos é importante para exacerbar o processo inflamatório tecidual.

Diante de doenças inflamatórias, o grau de migração de linfócitos através da barreira endotelial é claramente hiperregulado, modificando o potencial transmembranar; a sobrecarga de linfócitos passa a ser orquestrada por uma variedade de fatores, como o estado de ativação celular e o repertório de moléculas de adesão expressas pelo endotélio vascular local (Devine, 1996). Nos últimos anos, os autores mostraram rotas migratórias atípicas das células imunes em barreiras parenquimatosas do SNC para além da bem documentada transmissão célula-a-célula (Engelhardt e Sorokin, 2009; Wilson *et al.*, 2010; Larochelle *et al.*, 2011; Engelhardt e Ransohoff, 2012; Alvarez *et al.*, 2013; Schneider-Hohendorf 2014). Esta informação nos leva a pensar sobre alternativas que possam interromper a migração intensa e conseqüentemente a entrada de células infectadas nos tecidos do SNC. O uso terapêutico de anticorpos bloqueadores de VLA-4 para a infecção causada pelo HTLV-1 seria uma possibilidade a ser estudada, visto que tem sido utilizado em outras doenças que comprometem a função motora através de danos no sistema nervoso, como a Esclerose Múltipla (Yednock *et al.*, 1992; Polman *et al.*, 2006).

A frequência marcadamente mais alta de CD49d^{hi} em células T CD4⁺ e T CD8⁺ verificada em indivíduos infectados em relação ao grupo controle corrobora com os resultados de Al Fahim (1999) em experimentos com células endoteliais da veia umbilical humana, onde a porcentagem de células T CD4⁺ e CD8⁺ expressando CD49d foi expressivamente maior em ambos os pacientes com HAM/TSP e HTLV-1 do que nos controles e, após comparar ambos os grupos infectados, observou-se um número maior de células T CD4⁺CD49d^{hi} nos portadores de oligo/assintomáticos. A população de células T CD8⁺ infectadas pelo HTLV-1 ainda não foi intensamente estudada. Apesar destas células desenvolverem um papel importante na progressão de doenças associadas ao HTLV-1 em termos de citotoxicidade ou liberação de fatores solúveis. entretanto, o DNA proviral e a carga proviral têm sido apontados como fatores principais nessa desordem (Jacobson, 2002).

Sabe-se que a infecção pelo HTLV-1 altera a frequência de células CD8⁺, mas não de

células T CD4⁺ no sangue periférico (Melamed, 2015); porém, a frequência de células T CD8 vírus-específicas na circulação não é isoladamente um índice confiável da eficácia da resposta das células T a um vírus persistente como o HTLV-1. Nossos resultados mostram que a célula CD8⁺ infectada pelo HTLV-1 expressando CD49d tem um impacto relevante na distribuição de clones observada no sangue periférico, e, apesar de outros estudos mostrarem a influência das CTL em reduzir os níveis de CPV tanto em portadores assintomáticos quanto em HAM/TSP (Vine, 2004), tal afirmação não se apresenta de forma clara, visto que uma intensa resposta imune T CD8 tem sido fortemente relacionada a um processo inflamatório exacerbado e é um importante determinante da patogênese da HAM/TSP, onde geralmente os níveis de CPV encontram-se mais elevados (Martins, 2015). Esta eficiência da resposta CTL anti-HTLV-1 apresenta uma variação individual que poderia explicar porque algumas pessoas infectadas com HTLV-1 desenvolvem uma alta carga proviral e doenças associadas ao vírus, como ocorreu na maioria dos indivíduos infectados participantes do nosso estudo, enquanto que outras pessoas permanecem assintomáticas (Toulza *et al*, 2008). A maior frequência de células T CD8⁺ expressando alta intensidade de CD49d em portadores de HAM/TSP comparados aos portadores oligoassintomáticos sugere uma importante participação na indução do processo inflamatório.

Como achado complementar de nossos estudos, encontramos seis casos de agregação familiar, sendo 5 grupos infectados pelo HTLV-1 e 1 grupo familiar por HTLV-2. Na ocorrência de agregação familiar, no Brasil, estudos anteriores abordaram a distribuição e as conseqüências do HTLV em portadores que pertencem a grupos familiares (Alvarez 2015; Mendes 2016; Da Costa 2013; Cravos 2009; Nobre 2006; Primo 2005; Ribas 2003; Araújo 2002 Pombo-de-Oliveira 2001; Carvalho 1995; Cavalcanti 1993), sendo todos esses estudos voltados para características epidemiológicas e clínicas da infecção. O número de indivíduos infectados no mesmo grupo familiar varia de dois a quatro membros; um estudo recente mostrou que 83% dos indivíduos infectados, cujas famílias tinham história de doença anterior relacionada ao HTLV-1, apresentaram as mesmas manifestações clínicas (Alvarez 2015; Mendes, 2016). Considerando a investigação realizada em um dos grupamentos familiares atrelados ao estudo, observamos diferentes eventos relacionados à infecção pelo HTLV-1, como distúrbios dermatológicos, oftalmológicos e reumatológicos: poliartralgias, distúrbios urinários, dermatite infecciosa e uveíte, todos presentes nos indivíduos infectados pertencentes à uma mesma família. Além desses dados clínicos, comparando o aparecimento dos sintomas em ambos os grupos infectados, percebemos que o início foi precoce no grupo

familiar (média: 4,8 anos, não familiar foi de 8,3 anos); Esta informação corrobora com outros estudos, que mostram um aparecimento mais alarmante de sintomas em portadores com transmissão intra-familiar (Alvarez, 2015; Mendes, 2016). Em seguida, avaliamos os números relativos das subpopulações de células T $CD49d^{hi}CD4^{+}$ e $CD49d^{hi}CD8^{+}$ e carga proviral em membros do grupo familiar de indivíduos infectados com HTLV-1 e os comparamos com pacientes infectados não familiares. No entanto, em grupos familiares e não familiares, não foram encontradas diferenças. Supomos que as ocorrências na transmissão intrafamiliar sejam influenciadas por outros diferentes fatores, como rotas de transmissão, comportamento social, e os fatores ambientais podem desenvolver um papel importante na disseminação do HTLV.

Quanto aos níveis de citocinas pró-inflamatórias e imunomoduladoras registrados nos pacientes infectados de ambos os grupos, independente de agrupamentos familiares, não foram evidenciadas diferenças significativas entre eles, o que vai de encontro a alguns resultados anteriormente descritos (Carvalho, 2001; Santos, 2004; Montanheiro, 2009), sugerindo que essas moléculas possam estar funcionalmente alteradas. A outra hipótese, aqui relacionada às citocinas pró-inflamatórias, fundamenta-se nos estudos de Goon *et al.* (2002, 2003), onde as células T $CD4^{+}$ na infecção pelo HTLV-1 específicas secretoras de $IFN-\gamma$, $TNF-\alpha$ e $IL-2$ são significativamente mais frequentes nos pacientes com HAM/TSP de início recente do que nos indivíduos assintomáticos com níveis estáveis de carga proviral. Essas observações sugerem que as células T- $CD4$ (Th1) específicas ao HTLV-1 podem estar envolvidas no início dos sintomas e na patogênese da HAM/TSP, onde o tempo decorrido dos sintomas parece ter relevância na síntese de citocinas pró-inflamatórias.

Em síntese, durante a infecção pelo HTLV-1 a resposta imune parece variar de forma qualitativa e quantitativa entre os indivíduos, e a tentativa na manutenção de uma resposta balanceada Th1/Th2 é preditivo na manutenção do estado assintomático. Em um contexto amplo, nossos resultados sugerem um potencial uso de $CD49d$ como uma nova alternativa para abordagens terapêuticas através do bloqueio da migração de células T ativadas infectadas para o SNC. O bom uso da associação de marcadores de doença, como tem sido empregado no manejo da infecção pelo HIV, com a contagem de células T $CD4$ somada à quantificação da carga viral, podem vir a fazer o diferencial no diagnóstico precoce da HAM-TSP e com isso estabelecer uma intervenção mais eficaz.

8 CONCLUSÃO

Os grupos infectados pelo HTLV-1 possuem características clínicas distintas, porém ambos apresentaram sinais neurológicos subclínicos em comum, como as disfunções vesicais que são apontadas como marcadores de progressão de doença. Os portadores do vírus pertencentes a agrupamentos familiares apresentaram um maior número de as manifestações neurológicas subclínicas que os infectados de origem não familiar.

A carga proviral apresentou valores duas vezes maiores nos portadores de HAM/TSP que aqueles encontrados nos infectados oligo/assintomáticos, entretanto não houve diferença significativa entre eles, assim como na quantificação das citocinas pró-inflamatórias e regulatórias.

Na análise citofluorimétrica das integrinas investigadas observou-se maior frequência no sangue periférico das células T CD4⁺CD49d^{hi} e T CD8⁺CD49d^{hi} em pacientes infectados com HTLV-1, e tal anormalidade pode estar diretamente ligada à capacidade dos linfócitos T em alcançarem o tecido nervoso, tanto em oligoassintomáticos quanto em indivíduos HAM/TSP. Descobrimos que, em comparação com os controles saudáveis, o número relativo de células T CD4⁺CD49d^{hi} foi significativamente maior nos pacientes oligoassintomáticos, enquanto que números significativamente maiores de células T CD8⁺CD49d^{hi} foram observados em portadores com HAM / TSP. Quando a investigação foi realizada no grupo familiar selecionado, os resultados foram semelhantes ao obtido no restante das amostras, tanto a nível de integrinas, com hiper expressão de T CD4⁺CD49d^{hi} e T CD8⁺CD49d^{hi} em ambos os grupos (família e não família), quanto na dosagem de citocinas e análise de células regulatórias, ambos sem diferenças significativas.

Em função do gênero ou da idade, não foram observadas diferenças significativas quanto a expressão de integrinas em indivíduos infectados com HTLV-1.

Espera-se que com o aumento do conhecimento sobre o papel das integrinas na infecção pelo HTLV-1, somado a outro estudos complementares considerando suas alterações conformacionais, sinalização mediada e modulação do sistema imune, seja possível então melhorar a compreensão desses fenômenos biológicos fundamentais e proporcionar o desenvolvimento e aprimoramento de agentes que interajam entre ligante-receptor *in vitro* e *in vivo* em integrinas conhecidamente associadas a processos de movimentação, adesão e invasão celular. E conseqüentemente com isso se torne viável, a partir de novos dados, prover propostas para o surgimento de novas abordagens terapêuticas.

9. BIBLIOGRAFIA

- Abbas AK, Lichtman AH. 2005. Cellular and molecular immunology, 5th ed. Philadelphia: Saunders; 225-243.
- Abram CL, Lowell CA, Clare L. 2009. The Ins and Outs of Leukocyte Integrin Signaling. *Ann Rev Immunol*; 27: 339-62.
- Adry R, Lins C C, Kruchewsky R A, Galvão-Castro B. 2012. Comparison between the spastic paraplegia rating scale, Kurtzke scale, and Osame scale in the tropical spastic paraparesis/myelopathy associated with HTLV. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 45 (3), may-jun, 309-312.
- Afonso P V, Ozden S, Cumont M C, Seilhean D, Cartier L, Rezaie P, Mason S, Lambert S, Huerre M, Gessain A, Couraud P O, Pique C, Ceccaldi P E, Romero I A. 2008. Alteration of blood-brain barrier integrity by retroviral infection. *PLoS Pathog*, November 2008, Volume 4, Issue 11, 1-11.
- Ala A, Dhillon A P, Hodgson H J. 2002. Role of cell adhesion molecules in leukocyte recruitment in the liver and gut . *International Journal of Experimental Pathology*, 84, 1-16.
- Al-Fahim A, Cabre P, Kastrukoff L, Dorovini-Zis K, Oger J. 1999. Blood mononuclear cells in patients with HTLV-I-associated myelopathy: lymphocytes are highly activated and adhesion to endothelial cells is increased. *Cell Immunol*; 198 (1):1–10.
- Alvarez C *et al* 2015. A Peruvian family with a high burden of HTLV-1- associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *BMJ Case Rep*, 1-4.
- Alvarez J I, Katayama T, and Prat A. 2013. Glial influence on the blood brain barrier. *Glia*. 61:1939–1958.
- Amorim C *et al*. 2014. Functional Activity of Monocytes and Macrophages in HTLV-1 Infected Subjects. *Plos Neglected Tropical Diseases*, december 2014, volume 8, issue 12, 1-12.
- American Spinal Injury Association. 2000. International Standards for Neurological Classifications of Spinal Cord Injury. Revised Ed. Chicago, Ill: American Spinal Injury

Association: 1-23.

Andrade R *et al.* 2013. Association between urinary symptoms and quality of life in HTLV-1 infected subjects without myelopathy. *Int Braz J Urol.*; 39: 861-6.

Andrade RG, Gonçalves P de C, Ribeiro MA, Romanelli LC, Ribas JG, Torres EB. 2013. Strong correlation between Tax and HBZ mRNA expression in HAM/TSP patients: distinct markers for the neurologic disease. *J Clin Virol*; 56: 135-40.

Arao S, Masumoto A & Otsuki M. 2000. Beta 1 integrins play an essential role in adhesion and invasion of pancreatic carcinoma cells. *Pancreas* 20, 129 -137.

Araújo AP, Fontenelle, LM, Pádua PA, Maia Filho HS, and de Araújo AQ. 2002. Juvenile Human T-Lymphotropic Virus Type 1-associated myelopathy. *Clin. Infect. Dis*, 201–204.

Araújo A, Silva M. 2006. The HTLV -1 Neurological Complex. *Lancet Neurol*; 5: 1068–76.

Araya N *et al.* 2014. HTLV-1 induces a Th1-like state in CD4⁺CCR4⁺ T cells. *J Clin Invest*; 124 (8): 3431–3442.

Avraamides CJ, Garmy-Susni B, Varner JA. 2008. Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Cancer*; 8: 604-17.

Bangham, CRM, and Osame M. 2005. Cellular immune response to HTLV-1. *Oncogene* 24: 6035–6046.

Baltimore D. 1970. Viral -RNA dependent DNA polymerase. *Nature* 226: 1209-1221.

Bergeron L, Sullivan S, Sodroski J. 1992. Target Cell-Specific Determinants of Membrane Fusion within the Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp120 Third Variable Region and gp41 Amino Terminus. *Journal of Virology*, april, 2389-2397.

Best *et al.* Proviral load and immune markers associated with human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in Peru. *Clinical and Experimental Immunology*, 146: 226–233.

Bittencourt V, Orge G, Dourado A, Siqueira I, Carvalho E. 2009. Joint Manifestations In HTLV-I Infected Subjects. *Gazeta Médica da Bahia*; 79: 1, jan-dez, 41-44.

Bittner, J. J. 1936. Some possible effects of nur singon the mammary gland tumor incidence in mice. *Science*, 84, 162.

Black F L. 1997. Tracing prehistory migrations by the viruses they carry: human T- cell lymphotropic viruses as markers of ethnics relationships. *Hum Biol*, 69, 467-482.

Blattner W A et al. 1986. Modes of transmission and evidence for viral latency from studie s Human T cell pymphotropic vírus type I in japanese migrant populations in Hawaii. *Proc natn acad. Sci , USA*, 4895- 4898.

Borden, E. C., Sen, G. C., Uze, G., Sil- verman, R. H., Ransohoff, R. M., Foster, G. R *et al.* 2007. Inter- ferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6, 975–990.

Brasil. Ministério da Saúde. 2013. Guia de Manejo Clínico da Infecção pelo HTLV. Brasília, DF.

Brasil. Departamento de Ciência e Tecnologia do Ministério da Saúde. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. 2010. *Rev Saúde Pública*; 44 (1): 200-2.

Brito-Mello *et al.* 2007. IL-10 produced by CD4+ and CD8+ T cells emerge as a putative immunoregulatory mechanism to counterbalance the monocyte-derived TNF-alpha and guarantee asymptomatic clinical status during chronic HTLV-I infection. *Clin Exp Immunol.* Jan; 147 (1): 35-44.

Brown E, Hogg N. 1996. Where the outside meets the inside: integrins as activators and targets of signal transduction cascades. *Immunol Let*; 54:189-93.

Buell KG, Puri A, Demontis MA, Short CL, Adonis A, Haddow J, Martin F, Dhasmana D, Taylor GP. 2016. Effect of Pulsed Methylprednisolone on pain, in Patients with HTLV-1-Associated Myelopathy. *Plos One*, April, p. 1-14.

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

Canepa C et al. 2015. Low Proviral Load is Associated with Indeterminate Western Blot Patterns in Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 Infected Individuals: Could Punctual

Mutations be Related? *Viruses*, 7, 5643–5658;

Cann A J, Chen I S Y. 1996. Human T-cell leukemia virus type I and II. In: *Fields Virology* (ed. B.N. Fields et al.), pp. 1849–1880. Lippincott-Raven, New York.

Carneiro-Proietti ABF, Catalan-Soares B, Proietti FA, GIPH (Interdisciplinary HTLV-1/II Research Group). 2002. Human T-cell lymphotropic viruses (HTLV-I/II) in South America: should it be a public health concern? *J Biomed Sci.*; 9: 587-95.

_____, Sabino EC, Leão S, Salles NA, Loureiro P, Saar M, et al. 2012. Human T-Lymphotropic Virus Type 1 and Type 2 Seroprevalence, Incidence, and Residual Transfusion Risk Among Blood Donors in Brazil During 2007–2009. *AIDS Res Hum Retroviruses*; 28: 1265-72.

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

Carvalho SMF, Noronha, H, Bezerra, AC, Reis, AMM, Silva EA, Couto FRC, et al. 1995. The study of HTLV transmission in infected individuals in Brazil. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.*10, 264.

Casseb J et al. 2008. Presence of Tropical Spastic Paraparesis/Human T-cell Lymphotropic Virus Type 1-Associated Myelopathy (TSP/HAM)-Like Among HIV-1-Infected Patients. *Journal of Medical Virology*, 80: 392–398.

Casseb J S. Vírus Linfotrópico de Células T Humanas. Resumo da Linha de Pesquisa para concurso público de Título de Livre Docente na Universidade de São Paulo. São Paulo, 2013.

Castro, N M *et al.* 2002. Bexiga neurogênica como primeira manifestação de infecção pelo HTLV-1. *DST – J Bras Doenças Sex Transm.* Vol.14, n.5, p.32-34.

Castro-Costa CM, Araújo AQ, Menna-Barreto M, and Penalva- de-Oliveira AC. 2005. Guide of clinical management of HTLV patient: neurological aspects. *Arq. Neuropsiquiatr.* 63: 548–551.

Castro-Costa CM, Araújo AQC, Barreto MM, et al. 2006. Proposal for diagnostic criteria of Tropical Spastic Paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy (TSP/HAM). *AIDS Res Human*

Retrovirus; 22: 931-935.

_____, Salgueiro MR, Carton H, Vale OC, Arruda AM. Tropical spastic paraparesis in northeastern Brazil. *Arq Neuropsiquiatr.* 1989; 47: 134-8.

Catalan-Soares B, Carneiro-Proietti ABF, Proietti FA. 2005. Heterogeneous geographic distribution of Human T-cell Lymphotropic Viruses I and II (HTLV-I/II): serological screening prevalence rates in blood donors from large urban areas in Brazil. *Cad Saúde Pública;* 21: 926-93.

Cavalcanti M, Ferreira Júnior, O, Puccioni M, Novis S, and Schechter M. 1993. HTLV-I-associated neurologic manifestations in four generations of a Brazilian family. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 6, 213–217.

Cox D, Brennan M, Moran N. Integrins as therapeutic targets: lessons and opportunities. *Nat Rev* 2010; 9: 804-20.

Curis C *et al.* 2016. Human T-Lymphotropic Virus Type 1-Induced Overexpression of Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule (ALCAM) Facilitates Trafficking of Infected Lymphocytes through the Blood-Brain Barrier. *Journal of Virology*, Vol. 90 No. 16, p. 7303-7312.

Champs, A.P. 2010. Mielopatia associada ao HTLV-1: Perfil clínico, epidemiológico e fatores prognósticos de incapacidade para marcha. Dissertação de Mestrado. UFMG, Belo Horizonte.

Chen D, and Nussbaum SB. 2000. The gastrointestinal system and bowel management following spinal cord injury. *Phys. Med. Rehabil. Clin. N. Am.* 11: 45–46.

Chen IS, Quan SG, Golde DW. 1983. HTLV-1 transforms normal human lymphocytes. *Proc Natl Acad. Sci.* 80: 7006-7009.

Chissumba R, Silva-Barbosa S, Augusto A, Maueia C, Mabunda N, Samo Gudo E, Bhatt N, Jani I, Savino W. 2015. CD4⁺ CD25^{high} Treg cells in HIV/HTLV Co-infected patients with neuropathy: high expression of Alpha4 integrin and lower expression of Foxp3 transcription factor. *BMC Immunology.* 16: 52, 1-9.

Chung, CH, Wu, WB, Huang, TF. 2004. Aggrexin, a snake venom-derived endothelial integrin $\alpha 2 \beta 1$ antagonist, induces angiogenesis via expression of vascular endothelial growth

factor. *Blood*; 103: 2105-12.

Ciminale V *et al.* 2014. HTLV-1 and HTLV-2: highly similar viruses with distinct oncogenic properties. *Frontiers in Microbiology*. 5: 13, 1-8.

Cloves AS, Coelho-Dos-Reis JGA, Nobre VA, GIPH (Grupo Interdisciplinar de Pesquisa em HTLV), and Barbosa-Stancioli EF. 2009. Quantitative Anti-HTLV-1 Reactivity Profile Evaluation of Persons from a Family with High Prevalence of Infection and Dermatological Disorders Associated with HTLV-1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 25: p-073.

Cooper SA, Van der Loeff MS, and Taylor GP. 2009. The neurology of HTLV-1 infection. *Pract. Neurol.* 9:16–26.

Coutinho *et al.* 2014. Human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) proviral load induces activation of T-lymphocytes in asymptomatic carriers. *BMC Infectious Diseases*, 14: 453.

Croda M G, de Oliveira A C, Vergara M P, Bonasser F, Smid J, Duarte A J *et al.* 2008. Corticosteroid therapy in TSP/HAM patients: the results from a 10 years open cohort. *J. Neurol. Sci.* 269, 133–137.

Cruz BB, Catalan-Soares B, and Proietti FA. 2006. Higher prevalence of fibromyalgia in patients infected with human T cell lymphotropic virus type I. *J. Rheumatol.* 33: 2300–2303.

Da Costa CA, Furtado KC, Ferreira Lde S, Almeida D de S, Linhares Ada C, Ishak R, et al. 2013. Familial Transmission of human T-cell lymphotropic virus: silent dissemination of an emerging but neglected infection. *PLoS Negl Trop Dis*; 7: e2272.

Devine L, Lightman S L, Greenwood J. 1996. Role of LFA-1, ICAM-1, VLA-4 and VCAM-1 in lymphocyte migration across retinal pigment epithelial monolayers in vitro. *Immunology*, 88: 456-462.

Dorner AJ, Coffin JM. 1986. Determinants for receptor interaction and cell killing on the avian retrovirus glycoprotein gp85. *Cell*; 45: 365–374.

Devine L, Lightman SL & Greenwood J. 1996. Role of LFA-1, ICAM-1, VLA-4 and VCAM-1 in lymphocyte migration across retinal pigment epithelial monolayers in vitro. *Immunology*; 88:456-462.

Dhawan S, Weeks BS, Abbasi F, Gralnick HR, Notkins AL, Klotman ME *et al.* 1993. Increased expression of alpha 4 beta 1 and alpha 5 beta 1 integrins on HTLV-I-infected lymphocytes. *Virology*. 197 (2): 778–81.

Dimber R, Guo Q, Bishop C, Adonis A, Buckley A, Kocsis A, Owen D, Kalk N, Newbould R, Gunn R, Rabiner E, Taylor GP. 2016. Evidence of brain inflammation in patients with Human T Lymphotropic Virus type 1 associated myelopathy (HAM): A pilot multi modal imaging study using [11C] PBR28 PET, MR T1w and DWI. *J Nucl Med*. dec; 57 (12): 1905-1912.

Ditunno JF Jr, Young W, Donovan WH, Creasey G. The international standards booklet for neurological and functional classification of spinal cord injury. American Spinal Injury Association. *Paraplegia*. 1994 Feb. 32(2):70-80.

Dourado I, Alcantara LCJ, Barreto ML, et al. 2003. HTLV-1 in the general population of Salvador, Brazil, a city with African Ethnic and sociodemographic characteristics. *J Acquir Immune Defic Syndr*; 34: 527-531.

Edlich RF, Arnette, JA, Wiliam FM. 2000. Global epidemic of human T–cell lymphotropic virus types I (HTLV-I). *The Journal of Emergency Medicine*, v.18, p. 109-119.

Edwards D; Fenizia C; Gold H; de Castro-Amarante, MF; Buchmann C; Pise-Masison, CA; Franchini G. 2011. *Orf-I* and *orf-II*-encoded proteins in HTLV-1 infection and persistence. *Viruses*; 861–885.

Edlich RF, Arnette JA, Wiliam FM. 2000. Global epidemic of human T–cell lymphotropic virus types I (HTLV-I). *The Journal of Emergency Medicine*, v.18, p. 109-119.

Engelhardt B, and Sorokin L. 2009. The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. *Semin. Immunopathol*. 31: 497–511.

_____, and Ransohoff R M. 2012. Capture, crawl, cross: the T cell code to breach the blood-brain barriers. *Trends Immunol*. 33:579–589 .

Furnia A, Lal R, Maloney E *et al.* 1999. Estimating the Time of HTLV-1 Infection Following Mother-to-Child Transmission in a Breast-Feeding Population in Jamaica. *J. Med. Virol*, [S.l.], v. 59, p. 541-546.

Ferraz F B, Fernandez, J H. 2014. Integrins acting in cell adhesion, migration and cell signaling: association with pathologies and clinical studies. *Revista Científica da FMC - Vol. 9*, no 2.

Ferreira OC Jr, Planelles V, Rosenblatt JD. 1997. Human T Cell Leukemia viruses: Epidemiology, biology, and pathogenesis. *Blood Reviews*; 11: 91- 104.

Felipe L, Gonçalves DU, Santos MA, Proietti FA, Ribas JG, Carneiro-Proietti AB, and Lambertucci JR. 2008. Vestibular-evoked myogenic potential (VEMP) to evaluate cervical myelopathy in Human T-cell Lymphotropic Virus type I infection. *Spine* 33: 1180–1184.

Forlani *et al.* 2013. The MHC-II transactivator CIITA, a restriction factor against oncogenic HTLV-1 and HTLV-2 retroviruses: similarities and differences in the inhibition of Tax-1 and Tax-2 viral transactivators. *Frontiers in Microbiology*. August, volume 4, article 234, 1-11.

Franchini G. 1995. Molecular mechanisms of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I infection. *Blood*; 86: 3619-39.

Freitas *et al.* 2015. Polymorphisms in the IFN γ , IL-10, and TGF β genes may be associated with HIV-1 Infection. *Disease Markers*. 1-9.

Friend C. 1957. Cell-free transmission in adult swiss mice of a disease having the character of a Leukemia. *J Exp Med*, 105 (4): 307-318.

Fujinami RS, Oldstone MBA (1985): Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: A mechanism for autoimmunity. *Science* 230: 1043-1045.

Fujinami RS, Oldstone MBA, Wroblewska Z, Frankel ME, Koprowski H (1983): Molecular mimicry in viral infection: Cross reaction of measles virus phosphoprotein or

of herpes virus protein with human intermediate filaments. Proc Natl Acad Sci USA 80~2346-2350.

Fuggetta MP, Bordignon V, Cottarelli A, Macchi B, Frezza C, Cordiali-Fei P, Ensoli F, Ciafrè S, Marino-Merlo F, Mastino A, and Ravagnan G. 2016. Downregulation of proinflammatory cytokines in HTLV-1-infected T cells by Resveratrol. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research; 35:118.

Fukushima N, Nakamura T, Nishiura Y, Ida H, Aramaki T, Eguchi K. 2008. HTLV-I Production Based on Activation of Integrin/Ligand Signaling in HTLV-I-Infected T Cell Lines Derived from HAM/TSP Patients. Intervirology; 51:123–129.

Furukawa Y, Saito M, Matsumoto W et al. 2003. Different cytokine production in tax-expressing cells between patients with human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis and asymptomatic HTLV-I carriers. Journal of Infectious Diseases, 187: 1116-1125.

Furtado M dos S, Andrade R G, Romanelli L C, Ribeiro M A, Ribas J G, Torres E B, *et al.* Monitoring the HTLV-1 proviral load in the peripheral blood of asymptomatic carriers and patients with HTLV-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis from a Brazilian cohort: ROC curve analysis to establish the threshold for risk disease. J Med Virol. 2012; 84: 664-71.

Galvão – Castro *et al.* 1997. Distribution of Human T- Lymphotropic virus type I among blood donors: a nationwide Brazilian study. Transfusion; 37: 242-243.

Gastaldello, R., Hall, W.W. & Gallego, S. 2004. Seroepidemiology of HTLV-I/II in Argentina: an overview. J Acquir Immune Defic Syndr. 35; 301-8.

_____ *et al.* 2008. HTLV type 1 genetic types among native descendants in Argentina. AIDS Res Hum Retroviruses; 24: 1139-1146.

Gessain A, Mahieux R. 2000. Epidemiology, origin and genetic diversity of HTLV-1 retrovirus and STLV-1 simian affiliated retrovirus. *Bull. Soc. Exot* , 93, 163- 171.

Gessain A, Cassar O. 2012. Epidemiological aspects and world distribution of HTLV-1 infection. *Frontiers in Microbiology*, nov, 1-23.

Gonçalves DU, Proietti FA, Barbosa-Stancioli EF, Martins ML, Ribas JG, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Peruhype-Magalhães V, and Carneiro-Proietti AB. 2008. HTLV-1 Associated Myelopathy/ Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP) inflammatory network. *Inflamm. Allergy Drug Targets* 7: 98–107.

Gonçalves DU, Proietti FA, Ribas JG, Araújo MG, Pinheiro SR, Guedes AC and Carneiro-Proietti ABF. 2010. Epidemiology, Treatment, and Prevention of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1-Associated Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, July, p. 577–589.

Goon, P K C *et al.* 2002. High frequencies of Th1-type CD4 T-cells specific to HTLV-1 Env and Tax proteins in patients with HTLV-1-associated myelopathy/ tropical spastic paraparesis. *Blood*, v. 99, p. 3335–3341.

Goon PK, Igakura T, Hanon E, Mosley AJ, Asquith B, Gould KG, et al. 2003. High circulating frequencies of tumor necrosis alpha- and interleukin-2-secreting human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) -specific CD4⁺ T-cells in patients with HTLV-1-associated neurological disease. *J Virol*, 77: 9716-22.

Goon, P. K., T. Igakura, E. Hanon, A. J. Mosley, A. Barfield, A. L. Barnard, L. Kaftantzi, Y. Tanaka, G. P. Taylor, J. N. Weber, and C. R. Bangham. 2004. Human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I)-specific CD4⁺ T cells: immunodominance hierarchy and preferential infection with HTLV-I. *J. Immunol.* 172:1735.

Grant C et al. 2002. Human T cell leukemia virus type I and neurologic disease: events in bone marrow, peripheral blood, and central nervous system during normal immune surveillance and neuroinflammation. *J Cell Physiol.*, feb;190 (2): 133-59.

Grassi MF, Olavarria VN, Kruschewsky Rde A, Mascarenhas RE, Dourado I, Correia LC, de Castro-Costa CM, Galvao-Castro B. 2011. Human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-

1) proviral load of HTLV-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) patients according to new diagnostic criteria of HAM/TSP. *J Med Virol*, 83 (7): 1269–1274.

Gross C, Kress A. 2016. Molecular Mechanisms of HTLV-1 Cell-to-Cell Transmission. *Viruses*, 8, 74, 20-22.

Harrington W J Jr, Sheremata W A, Snodgrass S R, Emerson S, Phillips S, and Berger J R 1991. Tropical spastic paraparesis/HTLV-1-associated myelopathy (TSP/HAM): treatment with an anabolic steroid danazol. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 7, 1031–1034.

Hickey W F, Hsu B L & Kimura H. 1991. T-Lymphocyte Entry Into The Central Nervous System. *J Neurosci Res* 28, 254.

Hinuma Y *et al.* 1981. Adult T cell Leukemia: antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. *Proc Natl Acad Sci. USA*, 78: 6476-6480.

Ho YK *et al.* 2012. HTLV-1 Tax-Induced Rapid Senescence is Driven by the Transcriptional Activity of NF-KB and depends on chronically activated IKK and p65/RelA. *Journal of Virology*; vol 86, no. 17, p. 9474–9483.

Hoxie JA, Matthews DM, and Cines DB. 1984. Infection of human endothelial cells by Human T-cell Leukaemia virus type I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 7591–7595.

Ichinose K, Nakamura T, Nishiura Y, Nagasato K, Ohishi K, Watanabe H, Fujita A, Kurouji K, Tsujihata M, and Nagataki S. 1994. Characterization of adherent T cells to human endothelial cells in patients with HTLV-I-associated myelopathy. *J. Neurol. Sci.* 122: 204–209.

_____, Nakamura T, Nishiura Y, Tsujino A, Goto H, Shirabe S, Furuya T, Nagataki S. 1996. Characterization of T cells transmigrating through human endothelial cells in patients with HTLV-I-associated myelopathy. *Immunobiology*, 196 (5): 485-90.

_____ *et al.* 1996-1997. Characterization of T cells transmigrating through human endothelial cells in patients with HTLV-I-associated myelopathy. *Immunobiology*. 1996-1997;196 (5):485-90.

Ijichi S, Eiraku N, Osame M, Izumo S, Kubota R, Maruyama I, Matsumoto M, Niimura T, and Sonoda S. 1989. Activated T Lymphocytes in cerebrospinal fluid of patients with HTLV-

I associated myelopathy (HAM/TSP). *J. Neuroimmunol.* 25: 251–254.

Ijichi S et al. 1993. Identification of human T cell leukemia virus type IIb infection in the Wayu, an aboriginal population of Colombia. *Jpn J Cancer Res.* Dec; 84 (12): 1215-8.

Igakura T, Stinchcombe JC, Goon PK, Taylor GP, Weber JN, Griffiths GM, Tanaka Y, Osame M, Bangham. 2003. CR: Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. *Science*; 299:1713–1716.

Ishak R, Castro-Costa CM, Vallinoto ACR, Ishak MO. Infecções por Vírus Linfotrópicos de Células T Humanas. 2013. In: Leão, RNQ. *Medicina Tropical e Infectologia na Amazônia*. Belém: Ed. Samauma, vol. 1, p. 763-789.

Ishida T, Joh T, Uike N, Yamamoto K, Utsunomiya A, Yoshida S *et al.* 2012. Defucosylated anti- CCR4 monoclonal antibody (KW- 0761) for relapsed adult T-cell leukemia-lymphoma: a multicenter phase II study. *J. Clin. Oncol.* 30, 837–842.

Iwanaga M, Watanabe T, Utsunomiya A, Okayama A, Uchimaru K, Koh KR *et al.* 2010. Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-1) proviral load and disease progression in asymptomatic HTLV-1 carriers: a nationwide prospective study in Japan. *Blood*; 116: 1211-9.

Izumo S, Goto I, Itoyama Y, Okajima T, Watanabe S, Kuroda Y, et al. 1996. Interferon-alpha is effective in HTLV-I-associated myelopathy: a multicenter, randomized, double- blind, controlled trial. *Neurology* 46, 1016–1021.

Jacobson S. 2002. Immunopathogenesis of human T cell Lymphotropic virus type I-associated neurologic disease. *Journal of Infectious Diseases*, 186 (Suppl 2): S187-S192.

Jones KS, Petrow-Sadowski C, Bertolette DC, Huang Y, Ruscetti FW. 2005. Heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of Human T-cell Leukemia Virus type 1 virions into CD4⁺ T cells. *J Virol*; 79: 12692–12702.

Jones JL, Walker RA. Integrins: a role as cell signaling molecules. *J Clin Path Mol Path* 1999; 52: 208-13.

Kamoi K, Mochizuki M. 2012. HTLV-1 Uveitis. *Frontiers in Microbiology*. Vol 3, no. 270, p. 1-4.

Kapp T G *et al.* 2017. A Comprehensive Evaluation of the Activity and Selectivity Profile of Ligands for RGD-binding Integrins. *Scientific Reports*, 1-13.

Kamoi K, Mochizuki M. 2012. HTLV-1 Uveitis. *Frontiers in Microbiology*. Vol 3, no. 270, p. 1-4.

Kashanchi F, Brady JN. 2005. Transcriptional and post-transcriptional gene regulation of HTLV-1. *Oncogene*, 24, 5938–5951.

Kazanji M, Gessain A. 2003. HTLV-1 in French Guiana; clinical and molecular epidemiology. *Cad Saúde Pública*, 19: 1227-1240.

Khan MY, Khan IN, Farman M, Al Karim S, Qadri I, Kamal MA, Al Ghamdi K, Harakeh S. 2017. HTLV-1 Associated Neurological Disorders. *Current Topics in Medicinal Chemistry*.

Kieseier, B.C., O. Stüve, T. Dehmel, N. Goebels, V.I. Leussink, A.K. Mausberg, M. Ringelstein, B. Turowski, O. Aktas, G. Antoch, and H.-P. Hartung. 2013. Disease amelioration with tocilizumab in a treatment-resistant patient with neuromyelitis optica: implication for cellular immune responses. *JAMA Neurol.* 70: 390–393.

Kira JK, Fujihara Y, Itoyama IG, Hasuo K. 1991. Leukoencephalopathy in HTLV-1 Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis: MRI analysis and a two year follow-up study after corticosteroid therapy. *J. Neurol. Sci.* 106: 41–49.

Kuate C, Yepnjio F N, Ngang P, Njamnshi A K. HTLV-1 infection presenting as a cerebellar syndrome in Yaounde Central Hospital (Cameroon). *Afr J Neurol Sci* 2006; 2: 38-42.

Kumar CC. 1998. Signaling by integrin receptors. *Oncog*; 17: 1365-73.

Lima MA, Leite AC, Silva MT, and Araújo AQ. 2007. Other important aspects of Human T-Lymphotropic Virus 1-associated myelopathy. *Arch. Neurol.* 64: 1059–1060.

Larochelle C, Alvarez J I, and Prat A. 2011. How do immune cells overcome the blood-brain barrier in multiple sclerosis? *FEBS Lett.* 585:3770–3780.

Lima *et al.* 2016. Association of Sicca Syndrome with Proviral Load and Proinflammatory

Cytokines in HTLV-1 Infection. *Journal of Immunology*, 5: 1-6.

Lézin A, Olindo S, Oliere S, Varrin-Doyer M, Marlin R, Cabre P, Smadja D, and Cesaire R. 2005. Human T Lymphotropic Virus type I (HTLV-I) proviral load in cerebrospinal fluid: a new criterion for the diagnosis of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis? *J. Infect. Dis.* 191:1830–1834.

Lehmann-Horn K, Sagan SA, Bernard CC, Sobel RA, Zamvil SS. 2015. B-cell very late antigen-4 deficiency reduces leukocyte recruitment and susceptibility to central nervous system autoimmunity. *Ann Neurol*; 77: 902–908.

Lehmann-Horn K, Sagan SA, Winger RC, Spencer C, Bernard C, Sobel RA, Zamvil SS. 2016. CNS accumulation of regulatory B cells is VLA-4-dependent. *Neuroimmunology & Neuroinflammation*, p. 1-7.

Leon G *et al.* 2003. Seropositivity for HTLV types I and II among donors at the municipal blood bank of Caracas and associated risk factors. *Rev Panam Salud Publica*; 13: 117-123.

Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. 2007. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*; 7: 678–89.

Levin MC, Lee SM, Kalume F, Morcos Y, Dohan FC, Jr., Hasty KA, Callaway JC, Zunt J, Desiderio D, Stuart JM. Autoimmunity due to molecular mimicry as a cause of neurological disease. *Nat Med* 8: 509 - 13, 2002.

Macchi B, Balestrieri E, Ascolani A, Hilburn S, Martin F, Mastino A, *et al.* 2011. Susceptibility of primary HTLV-1 isolates from patients with HTLV-1-associated myelopathy to reverse transcriptase inhibitors. *Viruses* 3, 469–483.

Manns A, Miley WJ, Wilks RJ, Morgan OS, Hanchard B, Wharfe G, Cranston B, Maloney E, Welles SL, Blattner WA, Waters D. 1999. Quantitative proviral DNA and antibody levels in the natural history of HTLV-I infection. *J Infect Dis* 180:1487±1493.

Martins *et al.* 2015. Patogênese da infecção pelo HTLV. In: Proietti ABF. HTLV- Cadernos Hemominas. 5a. Ed. Belo Horizonte: Fundação Hemominas; Cap. 3, p. 28-72.

Masumoto A, Arao S, Otsuki M. 1999. Role of beta 1 integrins in adhesion and invasion of hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology* 29, 68±74.

- Matsuoka, M; Jeang KT. 2011. Human T-cell Leukemia Virus type 1 (HTLV-1) and leukemic transformation: Viral infectivity, Tax, HBZ and therapy. *Oncogene*, 30, 1379–1389.
- Melamed A. 2014. Clonality of HTLV-2 in Natural Infection. *Plos Pathogens*; march, volume 10, issue 3, 1-9.
- Merle H, Smadja D, Bera O, Cabre P, Vernant JC. 1994. Ophthalmologic manifestations in spinal cord diseases caused by HTLV-I virus. Clinical study of 30 cases. *J. Fr. Ophtalmol.* 17: 403–413.
- Merle H, Cabre P, Olindo S, Merle S, and Smadja D. 2001. Ocular lesions in 200 patients infected by the human T-cell lymphotropic virus type 1 in Martinique (French West Indies). *Am. J. Ophthalmol.* 131: 309–313.
- Mendes *et al.* 2016. Human T-cell lymphotropic virus-1 infection: three infected generations in the same family. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*; vol. 49, no.5, Uberaba sept./oct.
- Mescouto Melo K, Carvalho B. 2009. Células T regulatórias: mecanismos de ação e função nas doenças humanas, *Rev. Bras. Alerg. Imunopatol*; Vol. 32, no 5.
- Meytes D et al. 1990. Serological and molecular survey for HTLV-I infection in a high-risk Middle Eastern group. *Lancet*. 1990. Dec 22-29; 336 (8730):1533-5.
- Miller F, Afonso P, Gessain A, Ceccaldi P E. 2012. Blood-brain barrier and retroviral infections. *Virulence*, volume 3 issue 2, 222-229.
- Mitra SK, Hanson DA, Schaefer DD. 2005. Focal adhesion kinase: In command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 6: 56–68.
- Mitagami Y, Yasunaga J , Kinosada H , Ohshima K, Matsuoka M. 2015. Interferon- γ Promotes Inflammation and Development of T-Cell Lymphoma in HTLV-1 bZIP Factor Transgenic Mice. *PLOS Pathogens*, august 21, 1-19.
- Mochizuki M, T. Watanabe K. Yamaguchi K, Yoshimura S, Nakashima M, Shirao S. Araki K, Takatsuki S, Miyata N. 1992. Uveitis associated with Human T-cell Lymphotropic Virus type I: Seroepidemiologic, clinical and virologic studies. *J. Infect. Dis*; 166: 943–944.
- Morel C. 2006. Inovação em saúde e doenças negligenciadas. *Cad. Saúde Pública*, Rio de

Janeiro; 22 (8) : 1522-1523.

Milagres SP, Sanches JA Jr, Milagres AC, Valente NY. 2003. Histopathological and immunohistochemical assessment of acquired ichthyosis in patients with Human T-cell Lymphotropic Virus type I-associated myelopathy. *Br. J. Dermatol.* 149: 776–781.

Montanheiro *et al.* 2009. The Elevated Interferon Gamma Production is an Important Immunological Marker in HAM/TSP Pathogenesis. *Scandinavian Journal of Immunology.* 70, 403–407.

Morgan, DJ, Caskey MF, Abbehusen C, Oliveira-Filho J, Araujo C, Porto AF, Santos SB, Orge GO, Joia MJ, Muniz AL, Siqueira I, Glesby MJ, and Carvalho E. 2007. Brain magnetic resonance imaging white matter lesions are frequent in HTLV-I carriers and do not discriminate from HAM/TSP. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 23: 1499–1504.

Mori K, Noguchi M, Matsuo M, Nomata K, Nakamura T, and Kanetake H. 2004. Natural course of voiding function in patients with Human T-cell Lymphotropic Virus type 1-associated myelopathy. *J. Neurol. Sci.* 217: 3–6.

Nakamura S, Nagano I, Yoshioka M, Shimazaki S, Onodera J, Kogure K. 1993. Detection of tumor necrosis factor-alpha-positive cells in cerebrospinal fluid of patients with HTLV-I-associated myelopathy. *J Neuroimmunol* 42: 127 - 30.

Nakamura T. 2009. HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP): the role of HTLV-I-infected Th1 cells in the pathogenesis, and therapeutic strategy. *Folia Neuropathol* 47: 182 - 94.

_____, Nishiura Y, Ichinose K, Shirabe S, Tsujino A, Goto H, Furuya T, Nagataki S. 1996. Spontaneous Proliferation of and Cytokine Production by T Cells Adherent to Human Endothelial Cells in Patients with Human T-Lymphotropic Virus Type I-Associated Myelopathy. *Intern Med.* Mar; 35 (3):195-9.

Nakagawa M, Nakahara K, Maruyama Y, Kawabata M, Higuchi I, Kubota H *et al.* 1996. Therapeutic trials in 200 patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J. Neurovirol.* 2, 345–355.

Nozuma *et al.* 2014. Familial Clusters of HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis. *Plos One*, v. 5, n. 9, may, p. 1-6.

- Nobre V, Guedes AC, Martins ML, Barbosa-Stancioli EF, Serufo, JC, Proietti FA, *et al.* 2006. Dermatological findings in 3 generations of a family with a high prevalence of Human T cell Lymphotropic Virus type 1 infection in Brazil. *Clin. Infect. Dis*; 43, 1257–1263.
- Oh U, Grant C, Griffith C, Fugo K, Takenouchi N, Jacobson S. 2006. Reduced Foxp3 protein expression is associated with inflammatory disease during Human T Lymphotropic virus type 1 Infection. *J Infect Dis.*; 193 (11): 1557–66.
- Oh U, Yamano Y, Mora CA, Ohayon J, Bagnato F, Butman JA, Dambrosia J, Leist TP, McFarland H, and Jacobson S. 2005. Interferon-beta 1a therapy in human T-lymphotropic virus type I-associated neurologic disease. *Ann. Neurol.* 7:526–534.
- Oliveira P, Castro NM, and Carvalho EM. 2007. Urinary and sexual manifestations of patients infected by HTLV-I. *Clinics*; 62:191–196.
- Ono A, Ikeda E, Mochizuki M, Matsuoka M, Yamaguchi K, Sawada T *et al.* 1998. Provirus load in patients with human T-cell leukemia virus type 1 uveitis correlates with precedent Graves' disease and disease activities. *Jpn J Cancer Res.*; 89: 608-14.
- Osame M, Usuku K, Izumo S, Ijichi N, Amitani H, Igata A, Matsumoto M, Tara M. 1986. HTLV-I associated Myelopathy, a new clinical entity. *Lancet*, i: 1031–1032.
- Osame M. 2002. Pathological mechanisms of human T-cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy (HAM/TSP). *J Neurovirol*; 8: 359–364.
- Orland JR, Engstrom J, Fridey J, Sacher RA, Smith JW, Nass C, Garratty G, Newman B, Smith D, Wang B, Loughlin K, Murphy EL, and the HTLV Outcomes Study. 2003. Prevalence and clinical features of HTLV neurologic disease in the HTLV Outcomes Study. *Neurology* 61: 1588–1594.
- Paiva & Casseb. 2015. Origin and prevalence of Human T-Lymphotropic Virus type 1 (HTLV-1) and type 2 (HTLV-2) among indigenous populations in the Americas. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*.57 (1): January-February, 1-13.
- Peres E *et al.* From Immunodeficiency to Humanization: The Contribution of Mouse Models to Explore HTLV-1 Leukemogenesis. *Viruses* 2015, 7, 6371–6386.
- Piccirillo CA. 2008. Regulatory T cells in health and disease. *Cytokine*; 43 (3): 395-401.

Pinheiro SR, Martins-Filho OA, Ribas JG, Catalan-Soares BC, Proietti FA, Namen-Lopes S, Brito-Melo GE, Carneiro-Proietti AB, and GIPH (Interdisciplinary HTLV-I/II Research Group). 2006. Immunologic markers, uveitis, and keratoconjunctivitis sicca associated with human T-cell lymphotropic virus type 1. *Am. J. Ophthalmol.* 142: 811–815.

Pinon JD, Klasse PJ, Jassal SR, Welson S, Weber J, et al. 2003. Human T-cell Leukemia Virus type 1 envelope glycoprotein gp46 interacts with cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Virol*; 77: 9922–9930.

Pinto-Mariz *et al.* 2015. CD49d is a disease progression biomarker and a potential target for immunotherapy in Duchenne muscular dystrophy. *Skeletal Muscle*; 5:45.

Pinto-Mariz *et al.* 2010. Differential integrin expression by T lymphocytes: Potential role in DMD muscle damage. *Journal of Neuroimmunology*; 223: 128–130.

Prince HE *et al.* 1995. Spontaneous proliferation of memory (CD45RO⁺) and naïve (CD45RO⁻) subsets of CD4 cells and CD8 cells in human T Lymphotropic virus (HTLV) infection: distinctive patterns for HTLV-L versus HTLV-II. *Clinical and Experimental Immunology*; vol. 102, p. 256-261.

Proietti A B et al. 2002. Infecção e doença pelos vírus linfotrópicos humanos de células T (HTLV-I/II) no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 35 (5): set-out, 499-508.

Proietti A B. 2010. HTLV. 5a. Ed. Belo Horizonte: Fundação Hemominas.

_____. 2015. HTLV- Cadernos Hemominas. 6a. Ed. Belo horizonte: Fundação Hemominas.

Proietti FA, Carneiro-Proietti ABF, Catalan-Soares BC, and Murphy EL. 2005. Global epidemiology of HTLV-1 infection and associated diseases. *Oncogene* 24: 6058–6068.

Primo JR, Brites C, Oliveira MF, Moreno-Carvalho O, Machado M, and Bittencourt AL. 2005. Infective dermatitis and human T cell lymphotropic virus type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in childhood and adolescence. *Clin. Infect. Dis.* 41, 535–541.

Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD. 1980. Detection and isolation of type-c retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous t-

cell Lymphoma. Proceedings of National Academy of Sciences, USA, p. 7415–7419.

Pombo de Oliveira. 1996. HTLV-I infection and adult T cell leukemia in Brazil: An overview. São Paulo Medical Journal/RPM 114 (3): 1177-1185.

Pombo-de-Oliveira MS, Carvalho SM, Borducchi D, Dobbin J, Salvador J, Correa RB *et al.* 2001. Adult T-cell leukemia/lymphoma and cluster of HTLV-I associated diseases in Brazilian settings. Leuk. Lymphoma 42, 135–144.

Polman, C.H., P.W. O'Connor, E. Havrdova, M. Hutchinson, L. Kappos, D.H. Miller, J.T. Phillips, F.D. Lublin, G.Giovannoni, A.Wajgt *et al.* AFFIRM Investigators. 2006. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. N. Engl. J. Med. 354:899–910.

Quaresma et al. 2016. HTLV-1, Immune Response and Autoimmunity. Viruses; 8: 5, 1-10.

Rampoldi E, Meola G, Conti AM, Velicogna M, Larizza L. 1986. A comparative analysis of collagen III, IV, laminin and fibronectin in Duchenne muscular dystrophy biopsies and cell cultures. Eur J Cell Biol; 42:27–34.

Rapoport S I. 1976. Blood-Brain Barrier in Physiology and Medicine. New York: Raven Press.

Ribas JG, Melo GC, Catalan-Soares BC, and GIPH-HTLV Research Group. 2003. HTLV-I familiar infection: vertical transmission in three generations. AIDS Res. Hum. Retroviruses; 19 (Suppl. 1), S-32.

Rocha PN, Rehem AH, Santana JF, Castro N, Muniz AL, Salgado K, et al. 2007. The cause of urinary symptoms among Human T Lymphotropic Virus Type I (HTLV-I) infected patients: a cross sectional study. BMC Infect Dis;7:15.

Romanelli LCF, Caramelli P, Proietti ABF. 2010. Vírus Linfotrópico de Células T Humanos Tipo 1 (HTLV-1): Quando Suspeitar Da Infecção? Rev Assoc Med Bras; 56 (3): 340-7.

_____, Takayanagui O M, Castro-Costa C M. 2015. Manifestações Neurológicas Associadas ao Vírus HTLV-1. In: 2015. Proietti A B. HTLV- Cadernos Hemominas. 6a. Ed. Belo horizonte: Fundação Hemominas, cap 10.

Romero I *et al.* 2000. Interactions between Brain Endothelial Cells and Human T-Cell Leukemia Virus Type 1-Infected Lymphocytes: Mechanisms of Viral Entry into the Central Nervous System. *Journal of Virology*, July, 6021–6030.

Santos AC, Soares DJ, Rivemales MCC. 2017. (Des) conhecimento, adoecimento e limitações impostas pelo HTLV: experiências de mulheres soropositivas. *Cad. Saúde Colet.*, Rio de Janeiro, 25 (1): 45-50 4.

Santos MM *et al.* 2015. Aspectos epidemiológicos da infecção por HTLV-1 e HTLV-2. In: Proietti . *Cadernos Hemominas*. 6a.Ed. Fundação Hemominas, p. 117-140.

Santos S, Muniz A L, Carvalho E M. 2009. Immunopathogenesis of HTLV-I-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis. *Gazeta Médica da Bahia*; 79:1 (Jan-Dez): 11-17.

Santos NSO, Romanos MTV, Wigg MD. 2008. *Introdução à Virologia Humana*. Guanabara Koogan, 2a. Ed, Rio de Janeiro.

Santos F, Lima F 2005. Epidemiologia, fisiopatogenia e diagnóstico laboratorial da infecção pelo HTLV-1. *J Bras Pat Med e Lab* 41: 105 -116.

Santos SB, Porto AF, Muniz AL *et al.* 2004. Exacerbated inflammatory cellular immune response characteristics of HAM/TSP is observed in a large proportion of HTLV-I asymptomatic carriers. *BMC Infect Dis*, 4:7.

Saito M, Bangham C. 2012. Immunopathogenesis of Human T-Cell Leukemia Virus Type-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis: Recent Perspectives. *Leukemia Research and Treatment*. 7: 1-9.

Satou Y, Matsuoka M. 2013. Virological and immunological mechanisms in the pathogenesis of human T-cell leukemia virus type 1. *Rev Med Virol*; 23: 269-80.

Schneider-Hohendorf T, Stenner M P, Weidenfeller C, Zozulya A L, Simon O J, Schwab N, and Wiendl H. 2010. Regulatory T cells exhibit enhanced migratory characteristics, a feature impaired in patients with multiple sclerosis. *Eur. J. Immunol*. 40:3581–3590.

Shirabe S, Nakamura T, Tsujino A, Nishiura, Y., Furuya T, Goto H., et al. 1997. Successful

application of pentoxifylline in the treatment of HTLV-I associated myelopathy. *J. Neurol. Sci.* 151, 97–101.

Sonoda S, H C Li, L Cartier, L Nunez, and K Tajima. 2000. Ancient HTLV type 1 provirus DNA of Andean mummy. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 16: 1753– 1756.

Souza A *et al.* 2012. Immunopathogenesis and neurological manifestations associated to HTLV-1 infection. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*; 45 (5): 545-552.

Slater C M *et al.* 2012. Difficulties in HAM/TSP diagnosis. *Arq Neuropsiquiatr*; 70 (9): 686-690.

Stump BP, Carneiro-Proietti AB, Proietti FA, Rocha FL, and the Interdisciplinary HTLV Research Group. 2008. Higher rate of major depression among blood donor candidates infected with human T-cell lymphotropic virus type 1. *Int. J. Psychiatry Med.* 38: 345–355.

Tanajura C D *et al.* 2012. Neurological symptoms and signs in HtlV-1 patients with overactive bladder syndrome. *Arq Neuropsiquiatr*; 70 (4): 252-256.

Takatsumi K, Uchiyama T, Sagawa K, Yodoi J. 1977. In Seno (es) topics in hematology. *Amst Excerpta Medica*; 1: 73–7.

Takenouchi N, Yamano Y, Usuku K, Osame M, and Izumo S. 2003. Usefulness of proviral load measurement for monitoring of disease activity in individual patients with Human T-Lymphotropic Virus type-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J. Neurovirol.* 9:29–35.

Tarasevich A, Filatov A, Pichugin A, Mazurov D. 2015. Monoclonal antibody profiling of cell surface proteins associated with the viral biofilms on HTLV-1 transformed cells. *Acta Virology, Sep*; 59 (3): 247-56.

Taylor GP, Goon P, Furukawa Y, Green H, Barfield A, Mosley A, Nose H, Babiker A, Rudge P, Usuku K, Osame M, Bangham CR, and Weber JN. 2006. Zidovudine plus lamivudine in Human T-Lymphotropic Virus type-I-associated myelopathy: a randomised trial. *Retrovirology* 3: 63.

Toulza F, Heaps A, Tanaka Y, Taylor GP, Bangham CR. 2008. High frequency of

CD4+FoxP3+ cells in HTLV-1 infection: inverse correlation with HTLV-1-specific CTL response. *Blood*; 111: 5047-53.

Vakili R, Sabet F, Aahmadi S, Boostani R, Rafatpanah H, Shamsian A, Rahim Rezaee SA. 2013. Human T-lymphotropic Virus Type I (HTLV-I) Proviral Load and Clinical Features in Iranian HAM/TSP Patients: Comparison of HTLV-I Proviral Load in HAM/TSP Patients. *Iran J. Basic Med. Sci*; 16, 268–272.

Vallinoto A C R *et al.* Serological and molecular evidence of HTLV-1 infection among Japanese immigrants living in the Amazon region of Brazil. 2004. *Jpn J Inf Dis*, 57, 156-159.

Varrin-Doyer, M., C.M. Spencer, U. Schulze-Toppoff, P.A. Nelson, R.M. Stroud, B.A.C. Cree, and S.S. Zamvil. 2012. Aquaporin 4-specific T cells in neuromyelitis optica exhibit a Th17 bias and recognize Clostridium ABC transporter. *Ann. Neurol.* 72:53–64.

Viana *et al.* 2015. Endemic transmission of HTLV-2 in blood donors from São Luís do Maranhão, northeastern Brazil: report of two asymptomatic individuals. *Rev Bras Hematol Hemoter*; 37 (2):130–131.

Vine AM, Heaps AG, Kaftantzi L, Mosley A, Asquith B, Witkover A, et al. 2004. The role of CTLs in persistent viral infection: cytolytic gene expression in CD8+ lymphocytes distinguishes between individuals with a high or low proviral load of human T cell lymphotropic virus type 1. *J. Immunol*; 173: 5121-9.

Vogt M & Dubecco R. 1954. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J Exp Med*, Feb; 99 (2): 167-82.

Von Andrian UH, Mackay, CR. 2000. T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *NEJM*; 343:1020–34.

Wilson, E.H., W. Weninger, and C.A. Hunter. 2010. Trafficking of immune cells in the central nervous system. *J. Clin. Invest.* 120:1368–1379.

Wycuff D R, Goff M D, Marriot S J. 2001. Identification of an initiator-like element within the HTLV-I promoter. *Virology*, feb 1; 280 (1):72-9.

Wolfe ND, Heneine W, Carr JK, Garcia AD, Shanmugam V, Tamoufe U *et al.* 2005. Emergence of unique primate T-Lymphotropic Viruses among central African bushmeat hunters. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 102: 7994-9.

Yakova M, Lezin A, Dantin F, Lagathu G, Olindo S, Jean-Baptiste G, *et al.* 2005. Increased proviral load in HTLV-1-infected patients with rheumatoid arthritis or connective tissue disease. *Retrovirology*; 2: 4.

Yamamoto K, Utsunomiya A, Tobinai K, Tsukasaki K, Uike N, Uozumi K *et al.* (2010). Phase I study of KW-0761, a defucosylated humanized anti-CCR4 antibody, in relapsed patients with adult T-cell leukemia-lymphoma and peripheral T-cell lymphoma. *J. Clin. Oncol.* 28, 1591–1598.

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

Yamamoto- Taguchi *et al.* 2013. HTLV-1 bZIP Factor Induces Inflammation through Labile Foxp3 Expression. *Plos Pathogens*; vol. 09, no. 09.

Yamano Y, Sato T. 2012. Clinical pathophysiology of Human T-Lymphotropic virus-type 1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis. *Frontiers In Microbiology*, november 2012, volume 3, Article 389, p. 1-10.

Yamashita M *et al.* 1999. Molecular Epidemiology of Human T-cell Leukemia virus type I (HTLV-I) in Brazil: the predominant HTLV-Is in South America differ from HTLV-Is of Japan and Africa, as well as those of Japanese immigrants and their relatives in Brazil. *Virology*, 261, 59-69.

Yednock, T A, C. Cannon, L C. Fritz, F. Sanchez-Madrid, L. Steinman, and N. Karin. 1992. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature*. 356:63–66.

Yonekawa K, Harlan JM. 2005. Targeting leukocyte integrins in human diseases. *J Leukoc Biol*; 77:129-40.

Yoshida M, Miyoshi I, Hinuma Y. 1982. Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. Proc Natl Acad Sci USA 79:2031±2035.

Yoshioka A, Hirose G, Ueda Y, Nishimura Y, Sakai K. Neuropathological studies of the spinal cord in early stage HTLV- I-associated myelopathy (HAM). J Neurol Neurosurg Psychiatry 56: 1004 - 7, 1993.

Younis I, Green PL. 2005. The Human T-cell Leukemia Virus Rex protein. Front Biosci; 10: 431-45.

Zaidi MR, Merlino G. 2011. The two faces of interferon-gamma in cancer. Clinical cancer research - an official journal of the American Association for Cancer Research; 17 (19): 6118–24.

Índices de prostituição no estado do Pará. Disponível em: <http://g1.globo.com/pa/para/noticia/2013/04/para-e-o-segundo-estado-em-numero-de-pontos-de-prostituicao-infantil.html>. Acessado em 13/03/17. 10: 29.

Comunidades quilombolas no Pará. Disponível em: acaivip.blogspot.com.br/2013/01/comunidades-quilombolas-do-estado-do.html. Acessado em 13/03/17. 09: 53.

Imigração japonesa no estado do Pará. Disponível em: jubiart.com.br/2011/09/imigracao-japonesa-no-para.html. Acessado em 13/03/17. 10: 01.

10. ANEXOS

ANEXO I

Ficha de Avaliação e acompanhamento de Portadores de HTLV

Instituição: Fundação Oswaldo Cruz e Núcleo de Medicina Tropical

Projeto de Pesquisa: Infecção pelo HTLV-1: estudo comparativo sobre o perfil fenotípico e funcional de linfócitos em portadores sintomáticos e pacientes diagnosticados com Paraparesia Espástica Tropical

Pesquisadores: Lila Teixeira de Araújo Janahú, Alda Maria da Cruz, Wilson Savino, Adriano Gomes da Costa

Informações sobre o estudo

Você foi convidado a participar de um estudo clínico sobre o vírus HTLV. Estas informações já foram explicadas no documento chamado "TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E INFORMADO, que você assinou concordando em participar da pesquisa. Agora precisamos que você responda a este questionário simples, que será preenchido juntamente com seu pesquisador, caso você tenha alguma dúvida.

Matrícula () HTLV: () 1 () 2 Data: _____ / _____ / _____

Nome: _____ Idade: _____

Endereço: _____

Contatos telefônicos ou outros: _____

Tempo de Doença: _____ Filhos: () Sim () Não Quantos ? _____

Estado Civil: _____ Quantos anos de união? _____

Tem outros parceiros? () Sim () Não Quantos ? _____

Utiliza preservativo na relação sexual? () Sim () Não

Hipertensão () Diabetes ()

Doenças associada ao sangue () Sim () Não Quais? _____

Apresenta algum sintoma do HTLV? () Sim () Não Quanto Tempo? _____

Quais? _____

Utiliza algum medicamento? () Sim () Não Quais? _____

Outros: _____

ANEXO II

Termo de Consentimento Livre e esclarecido

Instituição: Fundação Oswaldo Cruz e Núcleo de Medicina Tropical

Projeto de Pesquisa: Infecção pelo HTLV-1: estudo comparativo sobre o perfil fenotípico e funcional de linfócitos em portadores sintomáticos e pacientes diagnosticados com Paraparesia Espástica Tropical

Pesquisadores: Lila Teixeira de Araújo Janahú, Alda Maria da Cruz, Wilson Savino, Adriano gomes da Costa

Eu _____ fui convidado a participar do projeto de pesquisa: “Infecção pelo HTLV-1: estudo comparativo sobre o perfil fenotípico e funcional de linfócitos em portadores sintomáticos e pacientes diagnosticados com Paraparesia Espástica Tropical”.

Informações sobre o estudo

Você está sendo convidado a participar de um estudo clínico sobre o vírus HTLV. A sua participação é voluntária, isto é, você só participa se quiser e mesmo se não quiser ou desistir de participar não terá nenhum prejuízo para o seu tratamento. É importante você saber que antes do projeto ser iniciado ele será avaliado e só poderá ser colocado em prática após a autorização do **Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto Oswaldo Cruz / Fundação Oswaldo Cruz** (CEP FIOCRUZ/IOC), localizado à Avenida Brasil, 4.036 - sala 705 (Expansão) - Manguinhos - Rio de Janeiro-RJ - CEP: 21.040-360, Tel.: (21) 3882-9011, e-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br. Agora leia abaixo sobre o vírus estudado e a pesquisa.

O vírus Linfotrópico de Células T, conhecido como HTLV, é um vírus que se instala no organismo do homem e é transmitido de várias formas, por exemplo: pelo contato com sangue, uso de agulhas contaminadas, relações sexuais sem uso de preservativo e também de mãe para filho, especialmente através da amamentação. Só se descobre que o indivíduo possui o vírus através de um exame de sangue. A infecção causada pelo HTLV encontra-se presente em todas as regiões brasileiras, mas o Pará é um dos estados que apresenta o maior número de casos (está em terceiro lugar). Esse vírus que ainda é pouco conhecido causa doenças sérias, como o câncer do sangue (Leucemia/Linfoma de células T do adulto - LLTA) e a paralisia com enrijecimento total das pernas (Paraparesia Espástica Tropical/Mielopatia Associada ao HTLV - PET/MAH), onde a pessoa acometida pode ficar sem andar e depender de cadeira de rodas. Além disso, o HTLV também pode levar a inflamações na visão, doenças de pele e outras.

Essa pesquisa em qual você foi convidado a participar será desenvolvida por mim, Lila Teixeira de Araújo Janahú, por ocasião do Doutorado que estou desenvolvendo numa instituição de pesquisa do Rio de Janeiro chamada FUNDAÇÃO/ INSTITUTO OSWALDO CRUZ, e orientada pelos professores doutores Wilson Savino, Alda Maria da Cruz e Adriano Gomes da Silva (FIOCRUZ). Você responderá a 1 questionário, onde as perguntas serão feitas pela pesquisadora, ou seja, você não terá que fazer nada sozinho. O exame de sangue é bem simples, sendo realizado uma única vez, e, caso surja alguma dúvida, no máximo uma segunda vez. Portanto, os riscos a sua saúde são mínimos. As informações de tudo o que você nos contar sobre si mesmo serão mantidas em segredo e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Quando formos divulgar os resultados, não identificaremos o nome de nenhum participante. Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço institucional do pesquisador principal, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento. Sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com os pesquisadores ou com as instituições parceiras.

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

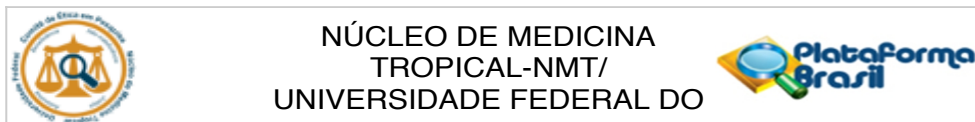
Data/Assinatura ou impressão digital do Paciente

Testemunha

Pesquisadora: MSc. Lila Teixeira de Araújo Janahú
Telefones: (091) 8185-1765, (091) 8821-667

ANEXO III

Parecer consubstanciado do CEP/NMT e número CAAEE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: INFECÇÃO PELO HTLV-1: ESTUDO COMPARATIVO SOBRE O PERFIL FENOTÍPICO E FUNCIONAL DE LINFÓCITOS EM PORTADORES SINTOMÁTICOS E PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM PARAPARESIA ESPÁSTICA TROPICAL

Pesquisador: Lila Teixeira de Araujo Janahu

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 30762614.0.3001.5172

Instituição Proponente: FUNDACAO OSWALDO CRUZ

Patrocinador Principal: FUNDACAO OSWALDO CRUZ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.069.881

Data da Relatoria: 25/03/2015

Apresentação do Projeto:

o presente estudo pretende identificar o grau de ativação e perfil funcional de linfócitos T de pacientes portadores de HTLV-1 com alterações da função motora, porém sem critérios para HAM/TSP, e determinar se há associação com o prognóstico de progressão para a doença neuromuscular;

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Identificar o grau de ativação e perfil funcional de linfócitos T de pacientes portadores de HTLV-1 com alterações da função motora, porém sem critérios para HAM/TSP, e determinar se há associação com o prognóstico de progressão para a doença neuromuscular; Objetivo Secundário: a) Identificar o perfil fenotípico dos linfócitos, em relação a moléculas envolvidas com migração em pacientes infectados pelo HTLV-1 portadores de HAM/TSP, e verificar se podem ser utilizadas como parâmetros prognósticos para diferenciá-los de portadores oligossintomáticos e de pacientes que apresentam alterações de função motora, mas sem os critérios para HAM/TSP; b) Analisar os níveis de ativação celular e citocinas pro-inflamatórias circulantes de pacientes portadores de HAM/TSP, soropositivos assintomáticos e sintomáticos sem critérios definidos para HAM/TSP (denominados aqui como ζ intermediários ζ), determinando associadamente o estado de ativação linfocitária das moléculas de migração. c) Verificar se o grau

Endereço: Av. Generalíssimo Deodoro, 92
Bairro: Umarizal **CEP:** 66.055-240
UF: PA **Município:** BELEM
Telefone: (91)3201-0961 **E-mail:** cepbel@ufpa.br