

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

AVALIAÇÃO FENOTÍPICA E FUNCIONAL DOS LINFÓCITOS T
CITOTÓXICOS DE INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HTLV-1 COM
DIAGNÓSTICO DE HAM/TSP.

MARCUS VINÍCIUS ALVES LIMA

Salvador - Bahia

2014

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

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

MARCUS VINÍCIUS ALVES LIMA

AVALIAÇÃO FENOTÍPICA E FUNCIONAL DOS LINFÓCITOS T
CITOTÓXICOS DE INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HTLV-1 COM
DIAGNÓSTICO DE HAM/TSP.

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

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rita Elizabeth Moreira Mascarenhas

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

Salvador - Bahia

2014

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

L732a Lima, Marcus Vinícius Alves
Avaliação fenotípica e funcional dos linfócitos T citotóxicos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 com diagnóstico de HAM/TSP / Marcus Vinícius Alves Lima. - 2014.
118 f.: il.; 30 cm.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rita Elizabeth Moreira Mascarenhas, Laboratório Avançado de Saúde Pública.

Dissertação (mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2014.

1. Linfócitos T citotóxicos. 2. HTLV-1. 3. Mielopatia associada ao HTLV-1.
I.Título.

CDU 616.98

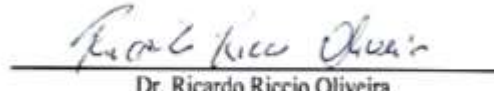
“AVALIAÇÃO FENOTÍPICA E FUNCIONAL DOS LINFÓCITOS T CITOTÓXICOS DE
INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HTLV-1 COM DIAGNÓSTICO DE HAM/TSP.”


MARCUS VINÍCIUS ALVES LIMA

Folha de aprovação

Comissão Examinadora


Dra. Silvane Maria Braga Santos
Pesquisadora
UFBA


Dr. Ricardo Riccio Oliveira
Pesquisador
CPqGM/FIOCRUZ


Dra. Milena Botelho Pereira Soares
Pesquisadora Titular
CPqGM/FIOCRUZ

Salvador, 08 de Julho de 2014.

FONTES DE FINANCIAMENTO

FAPESB

FIOCRUZ

Aos meus pais, João e Eliete, meus grandes mentores e fonte de força, fé, coragem e determinação.

AGRADECIMENTOS

Esta dissertação marca o término de mais uma etapa importante da minha vida profissional. Agradeço aos que contribuíram para a concretização deste sonho.

Ao Grande Criador pelas bênçãos concedidas que permitiram a realização deste trabalho.

À minha estimada orientadora e amiga, Prof.^a Dra. Rita Elizabeth M. Mascarenhas, pela confiança, paciência, liberdade, atenção e compreensão dispensadas nestes últimos dois anos. Lembro-me do primeiro dia que cheguei ao LASP e fui recebido com afeto. Agradeço veementemente pelos valiosos ensinamentos transmitidos e pelo crescimento profissional proporcionado. Tenho orgulho em dizer que fui seu orientado!

À Prof.^a Dra. Sandra Gadelha pela gentileza da interlocução que culminou com a minha inserção neste grupo.

À Prof.^a Dra. Maria Fernanda R. Grassi pela oportunidade de trabalhar no LASP.

Ao Dr. Bernardo Galvão, coordenador do Centro de Referência de Portadores do HTLV (CHTLV) da EBMSp, pela generosa colaboração na condução deste estudo.

À Prof.^a Dra. Jane Lima que me ensinou a apreciar a Imunologia.

Aos meus pais, João e Eliete, pelo amor incondicional oferecido em todos os momentos de minha vida e pela oportunidade de concluir mais uma etapa da minha carreira profissional.

À minha querida noiva, Regina, pelo companheirismo, alegria, amor, paciência e pelas palavras de coragem e perseverança que motivaram a concretização deste trabalho.

Aos meus familiares pelo carinho e orações.

Aos amigos, em especial Igor, Candace, Afrânio, Jaqueline, Carol, Maíra, Tayane, Rosana e Raíza, pelo incentivo e pelos momentos de descontração que tornaram mais leve esta caminhada.

Aos colegas do mestrado pelas discussões e contribuição em minha formação profissional.

Aos colegas de laboratório, Luana, Lorena, Raimundo e Viviana, pelo acolhimento e treinamento no período inicial deste trabalho.

À Dra. Micely Hermida, Dr. Jorge Clarêncio, Dr. Raimundo Coutinho e Me. Liliane Cunha, pelo auxílio na aquisição das amostras na Plataforma de Citometria de Fluxo.

Às funcionárias da secretaria do PPgBSMI e do LASP, especialmente Iumara, Geiqsa e Rita, pela disponibilidade, simpatia e gentileza.

À Prof.^a Dra. Cláudia Brodskyn e ao Prof.^o Dr. Lucas Carvalho pelas importantes contribuições durante a etapa de qualificação.

À Noilson Lázaro e Sônia Gurgel, do Centro de HTLV, pela presteza e solicitude.

Aos professores do PPgBSMI pelos ensinamentos e aprimoramento científico.

Às fontes de financiamento deste estudo.

A todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Não haveria criatividade sem a curiosidade que nos move e que nos põe
pacientemente impacientes diante do mundo que não fizemos, acrescentando
a ele algo que fazemos.”*

Paulo Freire.

LIMA, Marcus Vinícius Alves. Avaliação fenotípica e funcional dos linfócitos T citotóxicos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 com diagnóstico de HAM/TSP. 118 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

RESUMO

O Brasil representa uma das áreas endêmicas para o vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1) e a cidade de Salvador, Bahia, possui a maior prevalência nacional da infecção por este retrovírus (1,8%), com cerca de 50.000 pessoas infectadas. O HTLV-1 foi o primeiro retrovírus humano descrito e está classicamente associado à leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL) e à mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP). A HAM/TSP é uma doença inflamatória do sistema nervoso central, cujos mecanismos imunopatogênicos não estão completamente elucidados. O papel dos linfócitos T citotóxicos na patogênese desta doença ainda não está bem definido. Neste estudo, foram avaliados o fenótipo e a função de linfócitos T citotóxicos de pacientes infectados pelo HTLV-1 com HAM/TSP. Ensaios de imunofenotipagem por citometria de fluxo foram conduzidos para avaliar a proporção das subpopulações de memória dos linfócitos T citotóxicos e mensurar potencial citotóxico destas células. Foram analisados 13 indivíduos não infectados e 49 infectados pelo HTLV-1 (18 sem mielopatia - ASS, 6 diagnosticados como HAM/TSP provável - HAM-PB - e 25 como HAM/TSP definido - HAM-D). Os indivíduos infectados apresentaram aumento da proporção de linfócitos T citotóxicos e de suas subpopulações de memória efetora em detrimento das células *naive* e de memória central. Não foi observada diferença na distribuição das subpopulações de memória dos CTLs entre os indivíduos infectados pelo HTLV-1. A quantidade de CTLs com atividade de degranulação foi significativamente menor nos pacientes HAM-D em comparação aos indivíduos ASS. O grupo HAM-D também apresentou redução (50%) da produção de IFN- γ pelos CTLs em relação ao grupo ASS. O grupo HAM-PB apresentou resultados similares ao grupo ASS quanto à atividade de degranulação e produção de IFN- γ . Aumento da expressão de IL-15 em células mononucleares do sangue periférico e em células CD14⁺ foi observado em todos os grupos de pacientes infectados em comparação com os indivíduos soronegativos para o HTLV-1. Estes resultados sugerem que os pacientes infectados pelo HTLV-1 com HAM/TSP apresentam prejuízo da resposta imune celular, caracterizado pela diminuição da quantidade de linfócitos T CD8⁺ com atividade de degranulação.

Palavras-chave: CTL, HTLV-1, HAM/TSP.

LIMA, Marcus Vinícius Alves. Fenotípico and functional assessment of cytotoxic T-lymphocytes from HTLV-1-infected patients with HAM / TSP. 118 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

ABSTRACT

Brazil represents one of the largest endemic areas for human T-lymphotropic virus cells type 1 (HTLV-1) infection and associated diseases. Salvador, Bahia, is considered as the Brazilian city with the highest national HTLV-1 prevalence (around 1.8% in the general population). HTLV-1 was the first human retrovirus described and is classically associated with adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL) and HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). HAM/TSP is a chronic and progressive inflammatory disease of the central nervous system and your immunopathogenic mechanisms are not completely understood. The role of cytotoxic T-lymphocytes (CTLs) in the pathogenesis of this disease is still undefined. In this study we evaluated the phenotype and function of cytotoxic T-lymphocytes from HTLV-1-infected patients with HAM/TSP. Assays immunophenotyping by flow cytometry were conducted to assess the proportion of cytotoxic T-lymphocytes memory subsets and the cytotoxic potential of such cells. We analyzed 13 uninfected subjects (controls) and 49 HTLV-1-infected patients (18 without myelopathy (asymptomatic-ASS), 6 diagnosed as probable-HAM/TSP (HAM-PB) and 25 as defined-HAM/TSP (HAM-D)). Infected patients showed an increased proportion of cytotoxic T-lymphocytes and their subpopulations of effector memory cells at the expense of naive and central memory cells. The distribution of CTLs memory subsets resembled between HTLV-1-infected patients. The amount of CTLs with recent degranulation activity was significantly lower in HAM-D patients when compared to ASS group. The HAM-D group also showed IFN- γ production decrease (50%) by CTLs relative to the ASS group. The degranulation activity and IFN- γ production by cytotoxic T-lymphocytes were similar between the HAM-PB patients and ASS patients. Increased expression of IL-15 on peripheral blood mononuclear cells and CD14⁺ cells was observed in all groups of infected patients when compared to not infected subjects. These results suggest that HTLV-1-infected individuals with HAM/TSP have cellular immune response impaired, characterized by decrease of CD8⁺ T-lymphocytes with degranulation activity.

Key-words: CTL, HTLV-1, HAM/TSP.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática da partícula viral do HTLV-1 e suas principais proteínas estruturais	22
Figura 2	Estrutura genômica do HTLV-1	23
Figura 3	Sinapse viral	24
Figura 4	Distribuição do HTLV-1 no mundo	25
Figura 5	Taxa de prevalência, por Elisa, para HTLV-1/2 em doadores de sangue no Brasil	26
Figura 6	Hipóteses da patogênese da HAM/TSP	30
Figura 7	Vias de apoptose induzidas por granzima B	37
Figura 8	Fluxograma da estratégia experimental	44
Figura 9	Fluxograma da estratégia de análise das subpopulações de linfócitos T CD8⁺ naive e de memória	46
Figura 10	Fluxograma da estratégia utilizada para análise da frequência de células CD8⁺ positivas para Granzima B e perforina	47
Figura 11	Fluxograma da estratégia utilizada para análise da frequência de linfócitos T citotóxicos positivos para CD107a e INF-γ	48
Figura 12	Fluxograma da estratégia utilizada para análise da frequência de CMSP e células CD14⁺ positivas para IL-15	49
Figura 13	Frequência de linfócitos T citotóxicos	53
Figura 14	Distribuição das subpopulações naive e de memória dos CTLs em indivíduos infectados pelo HTLV-1	55
Figura 15.	Frequência das subpopulações naive e de memória dos CTLs de pacientes infectados pelo HTLV-1 de acordo com a expressão de CD45RA e CCR7...	56
Figura 16	Expressão ex vivo de Granzima B (GrzB) e Perforina (Perf) em células CD8⁺ de indivíduos não infectados (NI) e infectados pelo HTLV-1.....	58
Figura 17	Expressão ex vivo de Granzima B (GrzB) e Perforina (Perf) em células CD8⁺ de indivíduos infectados pelo HTLV-1	59
Figura 18.	Degranulação espontânea e produção de IFN-γ em linfócitos T citotóxicos de indivíduos não infectados e infectados pelo HTLV-1	61
Figura 19	Degranulação espontânea e produção de IFN-γ em linfócitos T citotóxicos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 com e sem HAM/TSP	62
Figura 20	Expressão de IL-15 de superfície em CMSP e em células CD14⁺ de indivíduos não infectados e infectados pelo HTLV-1	65

Figura 21 Expressão de IL-15 em CMSP e em células CD14⁺ de pacientes infectados 66
pelo HTLV-1 com HAM/TSP

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Níveis de definição diagnóstica da HAM/TSP	31
Tabela 2. Sequência de primers e sondas utilizados na PCR em tempo real.....	50
Tabela 3. Características dos indivíduos incluídos nos grupos de estudo	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

nm	=Nanômetros
NRP-1	=Neutrofilina-1
OMS	=Organização Mundial da Saúde
PBS	=Tampão salina fosfato
PCR	=Reação em cadeia da polimerase
PE	=Ficoeritrina
pol	=Polimerase
RNA	=Ácido ribonucléico
RNAm	=Ácido ribonucléico mensageiro
RPM	=Rotações por minuto
SEB	=Enterotoxina B de <i>Staphylococcus aureus</i>
SSC	= <i>Side scatter</i>
STLV	=Vírus linfotrópico de células T em Símios
TCM	=Células T de memória central
TCR	=Receptor de células T
TEM	=Células T de memória efetora
TEMRA	=Células T de memória efetora terminalmente diferenciada
TNF	=Fator de necrose tumoral
Treg	=Células T regulatórias

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2.	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	HISTÓRICO DO HTLV	20
2.2	CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DO HTLV-1	21
2.3	EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO PELO HTLV-1	24
2.4	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS ASSOCIADAS AO HTLV-1	26
2.4.1	Leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL)	27
2.4.2	Mielopatia associada ao HTLV-1/ Paraparesia espástica tropical (HAM/TSP).....	28
2.5	LINFÓCITOS T CITOTÓXICOS.....	32
2.5.1	Perforina.....	34
2.5.2	Granzima B.....	35
2.6	OS LINFÓCITOS T CITOTÓXICOS E A RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA INFECÇÃO PELO HTLV-1	38
3.	JUSTIFICATIVA	42
4.	OBJETIVOS	43
4.1	GERAL.....	43
4.2	ESPECÍFICOS	43
5.	MATERIAL E MÉTODOS	44
5.1	DESENHO DO ESTUDO	44
5.2	PACIENTES	44
5.3	IMUNOFENOTIPAGEM DOS LINFÓCITOS T CD8 ⁺	45
5.4	QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO INTRACELULAR DE GRANZIMA B E PERFORINA.....	46
5.5	OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO	47
5.6	ENSAIO DE MOBILIZAÇÃO DE CD107A E QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE IFN- γ	47
5.7	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE IL-15 EM CÉLULAS CD14 ⁺ E EM CMSP	48
5.8	QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PROVIRAL DO HTLV-1	49

5.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	50
5.10	ASPECTOS ÉTICOS	51
6	RESULTADOS	52
6.1	CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO	52
6.2	FREQUÊNCIA DE LINFÓCITOS T CITOTÓXICOS	53
6.3	DISTRIBUIÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES DE CTLs DE MEMÓRIA	54
6.4	EXPRESSÃO DE PERFORINA E GRANZIMA B NAS CÉLULAS CD8 ⁺	57
6.5	AVALIAÇÃO DA DEGRANULAÇÃO RECENTE E QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE IFN- γ	60
6.6	EXPRESSÃO DE IL-15 EM CÉLULAS CD14 ⁺ E EM CMSP	64
7.	DISCUSSÃO	67
8.	SUMÁRIO DOS RESULTADOS	74
9.	CONCLUSÃO	75
10.	PERSPECTIVAS	76
	REFERÊNCIAS	77
	APÊNDICE	94
	ANEXOS	115

1 INTRODUÇÃO

A infecção pelo HTLV-1 acomete cerca de 20 milhões de pessoas no mundo, sendo endêmica em várias regiões geográficas como sudoeste do Japão, ilhas do Caribe, África e América do Sul (DE THE; BOMFORD, 1993; GESSAIN; MAHIEUX, 2012; MUELLER et al., 1996). Estimativas apontam que aproximadamente 2,5 milhões de pessoas estejam infectadas pelo vírus no Brasil, sendo Salvador a cidade que apresenta a mais alta prevalência na população geral – 1,76% (CARNEIRO-PROIETTI et al., 2002; CATALAN-SOARES; CARNEIRO-PROIETTI; PROIETTI, 2004; DOURADO et al., 2003).

Dentre as principais manifestações clínicas causadas pelo HTLV-1, destacam-se a leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL) e a mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP), que é uma neuropatia crônica que causa perda progressiva da função motora em membros inferiores (BANGHAM, 2000).

Uma vez que a infecção pelo HTLV-1 tem sido associada a manifestações neoplásicas, inflamatórias, neurológicas e reumáticas, acredita-se que múltiplos fatores inerentes ao hospedeiro e ao vírus estejam envolvidos no desenvolvimento dessas doenças, cujos mecanismos de patogênese ainda não foram esclarecidos. A resposta imune, os polimorfismos genéticos do indivíduo infectado e a carga proviral são fatores que podem influenciar o desfecho da infecção (BANGHAM; OSAME, 2005; LEPOUTRE et al., 2009; NAGAI et al., 1998). Como a maioria dos indivíduos infectados acometidos pela mielopatia apresenta uma elevada carga proviral, estudos apontam este fator como um importante preditor para o desenvolvimento da HAM/TSP. O estabelecimento de uma resposta imunológica eficiente dos linfócitos T citotóxicos (CTL), os quais se encontram cronicamente ativados, pode suprimir a frequência de células infectadas, reduzindo a carga proviral e o risco de desenvolvimento da doença (BANGHAM, 2009; PARKER et al., 1992).

Apesar dos CTLs desempenharem função importante no *clearance* viral, existem evidências sobre o papel destas células na imunopatogênese da HAM/TSP. A alta taxa de CTLs específicos para o HTLV-1, os quais reconhecem como alvo principalmente a proteína viral Tax, associada à elevada produção de citocinas inflamatórias encontrada nos pacientes com HAM/TSP, comparados aos indivíduos infectados pelo vírus sem mielopatia, sugerem que uma resposta imune exacerbada contribui para o dano tecidual observado no sistema nervoso central dos indivíduos com esta doença (JACOBSON, 2002; KUBOTA et al., 1998).

Para auxiliar na compreensão do papel dos linfócitos T citotóxicos na infecção pelo HTLV-1 e na patogênese da HAM/TSP, este estudo avaliou o fenótipo e a função dos CTLs de indivíduos não infectados e de portadores do HTLV-1 assintomáticos para a mielopatia e acometidos pela HAM/TSP, diagnosticados como HAM/TSP-provável (HAM-PB) e HAM/TSP-definido (HAM-D) de acordo com os critérios de Belém (DE CASTRO-COSTA et al., 2006).

Nossa hipótese é que os indivíduos acometidos pela mielopatia, diagnosticados como HAM-PB e HAM-D, apresentam comprometimento funcional dos linfócitos T citotóxicos, suscitando controle ineficiente da carga proviral e contribuindo para o desenvolvimento e manutenção da doença.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HISTÓRICO DO HTLV

Na primeira década do século XX, um estudo conduzido por Ellerman e Bang sobre a etiologia da leucemia em galinhas revelou que a leucose aviária poderia ser transmitida através de filtrados livres de células, sugerindo o envolvimento de vírus. Em 1911, o pesquisador Peyton Rous do Instituto Rockefeller para Pesquisas Médicas, nos Estados Unidos, ratificou a etiologia infecciosa em processos neoplásicos ao induzir sarcoma em aves a partir dos filtrados livres de células (ROUS, 1910). Cinco décadas depois, o médico veterinário William Jarrett da Universidade de Glasgow, no Reino Unido, reportou a descoberta de um vírus que causava leucemia e linfoma em felinos (FeLV) (JARRETT; MARTIN, 1964). Em 1970, a descoberta da enzima transcriptase reversa em neoplasias causadas por retrovírus despertou a atenção da comunidade científica para esta classe de vírus (BALTIMORE, 1970; TEMIN; MIZUTANI, 1970). Nesta década, estudos identificaram retrovírus associados a leucemias em bovinos (FERRER et al., 1975), equinos (CHEEVERS; MCGUIRE, 1985), caprinos (CRAWFORD et al., 1980) e em uma espécie de macaco (CHARMAN et al., 1975).

Os achados neste decênio fomentaram a ideia de que retrovírus poderiam também estar envolvidos na etiologia da leucemia humana. Em 1979, um grupo de pesquisa do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos, chefiado pelo pesquisador Robert Gallo, isolou um retrovírus a partir de células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de um paciente com linfoma cutâneo de células T (POIESZ et al., 1980). Este retrovírus, denominado de vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV), foi apontado como o agente etiológico da leucemia após a observação de anticorpos específicos no soro dos pacientes e do DNA proviral integrado ao material genético das células infectadas (POIESZ et al., 1980). Concomitante a investigação conduzida por Gallo, pesquisadores japoneses descreveram uma manifestação clínica - linfoma/leucemia de células T do adulto (ATLL) – ocasionada por um vírus denominado de vírus da leucemia de células T do adulto (ATLV) (HINUMA et al., 1981; UCHIYAMA et al., 1977). Estudos subsequentes revelaram que o ATLTV e o HTLV se tratavam de um mesmo agente patogênico, que foi denominado de HTLV-1 (WATANABE; SEIKI; YOSHIDA, 1984).

O HTLV-2 foi isolado a partir de linfócitos de um paciente com leucemia de células pilosas (KALYANARAMAN et al., 1982). Apesar de compartilhar 65% de similaridade na sequência de nucleotídeos com o HTLV-1, o HTLV-2 não foi associado até o momento a nenhuma patologia humana (SODROSKI, 1992). No entanto, já foram reportados casos de indivíduos infectados por este vírus com linfocitose benigna e alguns sintomas neurológicos (BIGLIONE et al., 2003; BISWAS et al., 2009; DOONEIEF et al., 1996; HJELLE et al., 1992; JACOBSON et al., 1993; PETERS et al., 1999). Outros dois tipos virais, HTLV-3 (CALATTINI et al., 2009; CALATTINI et al., 2005; ZHENG et al., 2010) e HTLV-4 (WOLFE et al., 2005), foram isolados de células de indivíduos camaronenses, África Central, na primeira década do século XXI. Ainda não foi estabelecida associação entre estes dois tipos virais a condições patológicas.

Entre os anos de 1985 e 1986, o HTLV-1 foi associado a outras duas manifestações clínicas: a paraparesia espástica tropical (TSP), na Martinica (GESSAIN et al., 1985) e a mielopatia associada ao HTLV-1 (HAM), em Kagoshima no Japão (OSAME et al., 1986). Em 1989, especialistas na área concluíram que se tratava de uma mesma doença neurológica, sendo denominada de paraparesia espástica tropical /mielopatia associada ao HTLV-1 (HAM/TSP) (OSAME, 1990). A HAM/TSP é uma neuropatia crônica, caracterizada por lesão inflamatória e desmielinizante dos neurônios motores longos da medula, que causa perda progressiva da função motora em membros inferiores (GESSAIN et al., 1985; HINUMA et al., 1981).

2.2 CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DO HTLV-1

O HTLV-1 está classificado no gênero *Deltaretrovirus*, família Retroviridae e subfamília Oncovirinae (COFFIN, 1996). A morfologia esférica do vírus é similar a de outros retrovírus. A estrutura da partícula viral é constituída por um envelope, uma matriz proteica e um nucleocapsídeo.

O envelope é composto por uma bicamada lipídica, na qual se encontram presentes duas subunidades proteicas glicosiladas - a proteína transmembrana gp21, ancorada na glicoproteína de superfície gp46 - codificadas pelo gene *env*. Logo abaixo do envelope encontra-se a matriz viral, composta pela proteína p19, e o capsídeo de simetria icosaédrica, que constitui o cerne da partícula viral, composto pela proteína p24 (**Figura 1**). No interior do

capsídeo encontra-se o genoma viral, constituído por duas fitas simples de RNA senso positivo associadas às proteínas p15 do nucleocapsídeo e a outras proteínas importantes para a transcrição do RNA viral em DNA e sua incorporação no genoma das células hospedeiras, como a transcriptase reversa, integrase e RNase H.

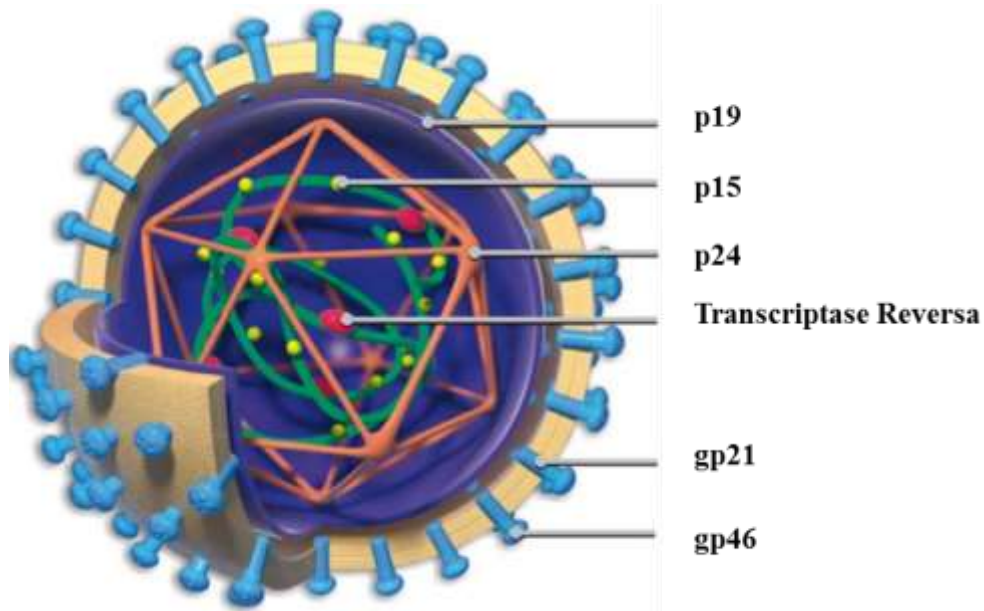


Figura 1. Representação esquemática da partícula viral do HTLV-1 e suas principais proteínas estruturais. Adaptado de (LAIRMORE; HAINES; ANUPAM, 2012).

O genoma do vírus contém cerca de nove mil pares de bases (SEIKI et al., 1983) e possui os genes estruturais *gag* (grupo antigênico), *pol* (polimerase), *env* (envelope) e a região *pX*, flanqueados por duas sequências terminais repetitivas, denominadas de LTR (*long terminal repeats*) (**Figura 2**) (KOHTZ et al., 1988; YOSHIDA, 2001). A região *pX* contém genes que codificam as proteínas virais Tax, Rex, HBZ, p12, p13, p30 e p21, as quais estão relacionadas com a patogênese viral (MATSUOKA; JEANG, 2007).

A entrada do vírus na célula hospedeira ocorre por meio de interações específicas entre a glicoproteína de superfície do envelope viral e receptores celulares como as moléculas de proteoglicanas de heparan sulfato (HSPGs) e neurofilina-1 (NRP-1). O transportador de glicose-1 (GLUT-1) é recrutado para o local de adesão do vírus e parece facilitar o processo de adsorção (COSKUN; SUTTON, 2005; MANEL et al., 2003). No entanto, não está esclarecido se o GLUT-1 se comporta como um receptor para a partícula viral ou apenas como um correceptor/cofator (JIN et al., 2006).

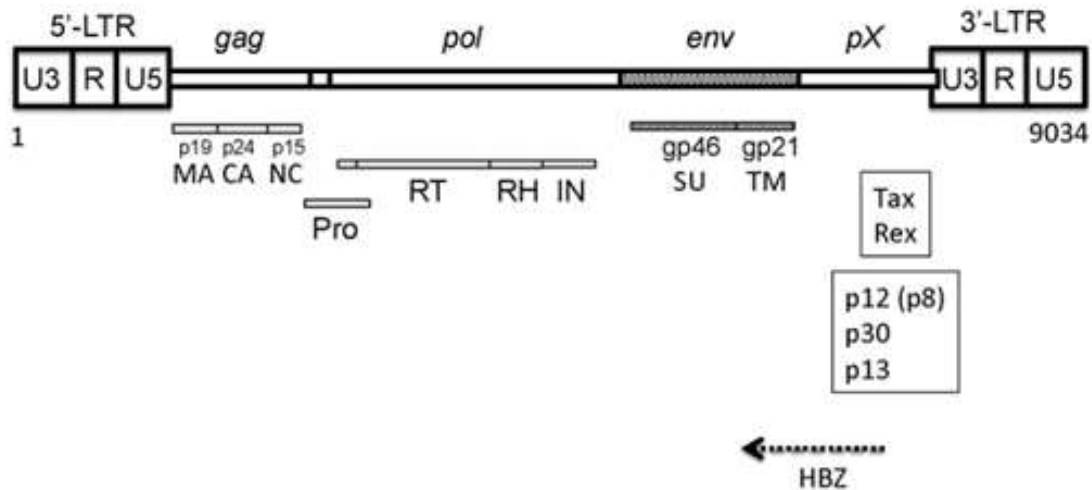


Figura 2. Estrutura genômica do HTLV-1. MA – matriz. CA – capsídeo. NC – nucleocapsídeo. RT – transcriptase reversa. RH – Rnase H. IN – integrase (HOSHINO, 2012).

A entrada do vírus na célula é seguida pelo desnudamento do capsídeo, o qual é liberado no citoplasma da célula hospedeira (COSKUN; SUTTON, 2005). A fita de RNA viral é transcrita em DNA de fita dupla pela enzima transcriptase reversa e o RNA molde é removido pela atividade da RNase H. A integrase, então, insere o DNA viral no genoma da célula hospedeira, constituindo o DNA proviral. A partir deste material genético será sintetizado o RNA genômico e o RNA mensageiro (RNAm), o qual será traduzido em proteínas virais (SEIKI et al., 1984). Após a montagem da partícula viral, ocorre a liberação do vírus por brotamento. No entanto, dados sugerem que o HTLV-1 é um vírus pouco replicativo e que a replicação viral *in vivo* ocorre principalmente devido à expansão clonal das células infectadas via mitose em detrimento da via de transcrição reversa, descrita acima (CIMARELLI et al., 1996; WATTEL et al., 1995). Além disso, o HTLV-1 pode ser transmitido célula-célula por um fenômeno denominado de sinapse viral (BANGHAM, 2003). Por esta via, o vírus induziria eventos de polarização nas células infectadas e formação de um canal proteico, facilitando a junção de células e permitindo a passagem de proteínas virais das células infectadas para outras não infectadas (**Figura 3**). A identificação de aglomerados de estruturas ricas em carboidratos e partículas virais maduras, semelhantes a biofilmes na superfície de células infectadas, sugere uma nova via de disseminação do HTLV-1, uma vez que essas estruturas favorecem o contato entre linfócitos e podem facilitar a transmissão viral (PAIS-CORREIA et al., 2010).

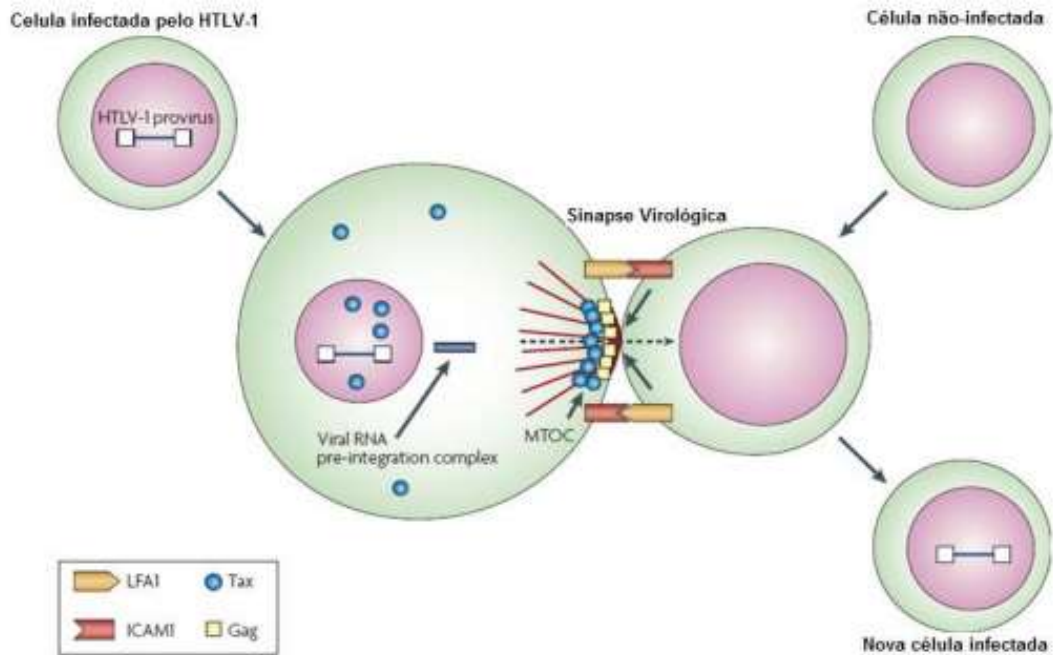


Figura 3. Sinapse viral. MTOC: centro organizador dos microtúbulos. Adaptado de (MATSUOKA; JEANG, 2007)

2.3 EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO PELO HTLV-1

O tipo 1 do HTLV é o mais disseminado e apresenta ampla distribuição mundial. Estima-se que cerca de 10 a 20 milhões de pessoas em todo o mundo estejam infectadas (DE THE; BOMFORD, 1993). Entretanto, esta estimativa foi realizada há duas décadas e pode não refletir a prevalência atual na população geral. Outros estudos revelam prevalências menores, porém foram realizados com populações específicas como candidatos a doação de sangue e mulheres grávidas (GESSAIN; MAHIEUX, 2012; PROIETTI et al., 2005).

A prevalência da infecção pelo vírus varia de acordo com a área geográfica, características demográficas, condições socioeconômicas e comportamentos de risco da população avaliada. São consideradas áreas endêmicas para o HTLV-1 o sudoeste do Japão (YAMAGUCHI, 1994), ilhas do Caribe, África equatorial (GESSAIN, 1996) e América do Sul (GESSAIN; MAHIEUX, 2012) (**Figura 4**).



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

No Brasil, o HTLV-1 foi primeiramente descrito em uma comunidade japonesa residente em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, com soroprevalência de 13% (KITAGAWA et al., 1986). A prevalência da infecção pelo vírus no país é variável, dependendo tanto da região quanto do grupo analisado. Estima-se que 2,5 milhões de pessoas estejam infectadas por este vírus no país (CARNEIRO-PROIETTI et al., 2002; CATALAN-SOARES et al., 2004), sendo as maiores prevalências observadas, em doadores de sangue, nos estados do Maranhão, Bahia, Pará e Pernambuco (CATALAN-SOARES; CARNEIRO-PROIETTI; PROIETTI, 2005) (**Figura 5**). Um estudo multicêntrico, realizado em doadores de sangue de cinco capitais de diferentes regiões do Brasil, demonstrou uma prevalência de 0,41% no país e apontou Salvador como a cidade que apresentava a maior prevalência (1,35%) (GALVAO-CASTRO et al., 1997). Cinco anos depois, um estudo de base populacional demonstrou que a prevalência geral da infecção na capital Baiana era de 1,76% (DOURADO et al., 2003). Este estudo evidenciou ainda que a soroprevalência foi maior no sexo feminino (2%), quando comparado ao sexo masculino (1,2%), e que estava relacionada com idade, uma vez que mulheres com mais de 50 anos apresentaram prevalência de 8,4%. Uma possível explicação para a diferença entre os sexos é a maior eficácia da transmissão sexual do homem para a mulher do que o inverso (KAPLAN et al., 1996).

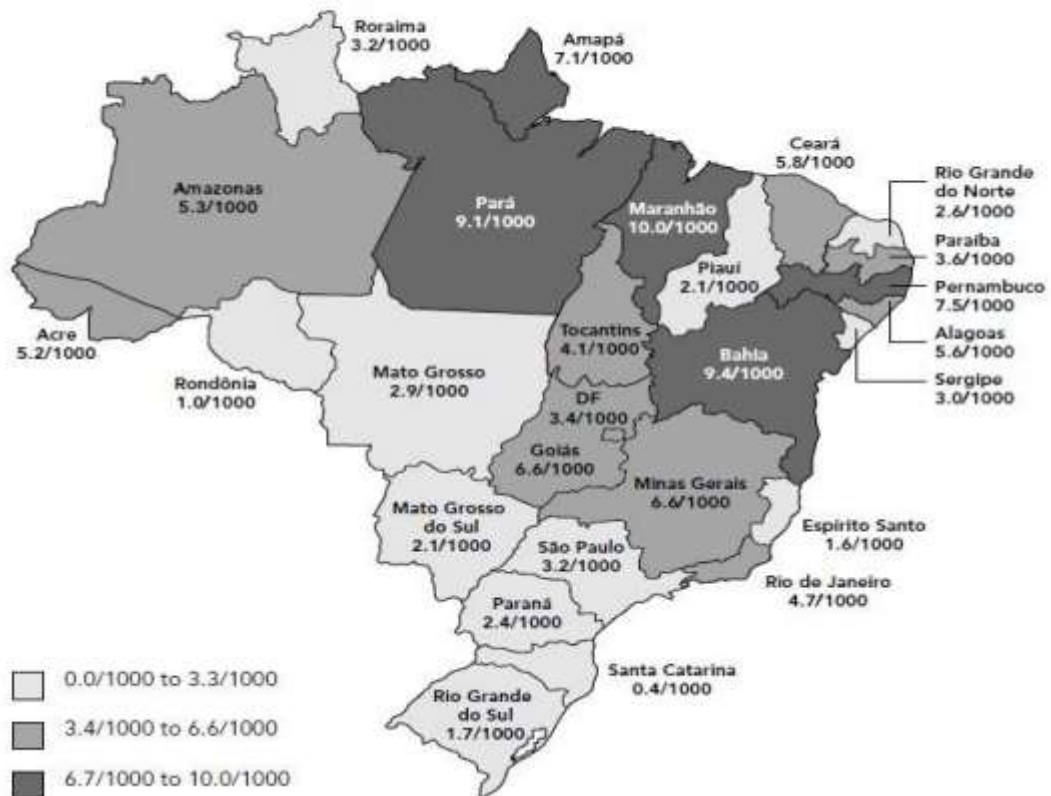


Figura 5. Taxa de prevalência, por Elisa, para HTLV-1/2 em doadores de sangue no Brasil.(CATALAN-SOARES et al., 2005)

A transmissão do HTLV-1 ocorre principalmente por três vias: vertical, especialmente pela amamentação (KINOSHITA et al., 1984; SAJI et al., 1990; TAJIMA et al., 1982), horizontal (contato sexual) (NAKANO et al., 1984) e parenteral, através do contato com sangue e hemoderivados ou perfuro-cortantes contaminados (MANNNS et al., 1992; SCHREIBER et al., 1996). Uma vez que evidências demonstram que o contato célula-célula é essencial para a infecção pelo HTLV-1, sugere-se que a transmissão parenteral ocorra somente via fração celular do sangue (MANNNS et al., 1992).

2.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS ASSOCIADAS AO HTLV-1

A infecção pelo HTLV-1 não implica necessariamente o desenvolvimento de patologias. A maioria dos indivíduos infectados pelo vírus permanece sem manifestações

clínicas evidentes durante toda a vida e pode desconhecer sua condição de portador, representando um grande problema de saúde pública e um impasse na determinação real da disseminação deste retrovírus no mundo.

Desde a sua descoberta na década de 1980, o HTLV-1 tem sido associado principalmente à leucemia de células T do adulto (ATL) e à mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP). Estima-se que até 5% dos indivíduos infectados, dependendo da área geográfica, desenvolvam HAM/TSP ou ATL (KAPLAN et al., 1990; MURPHY et al., 1989). Entretanto, vários estudos demonstram associação com outras doenças como uveíte (MOCHIZUKI et al., 1992), ceratoconjuntivite seca (BUGGAGE, 2003), polimiosite (OSAME et al., 1997), artropatia (MURPHY et al., 2004; NISHIOKA; SUMIDA; HASUNUMA, 1996), síndrome de *Sjögren* (NAKAMURA et al., 1997) e dermatite infecciosa (BITTENCOURT et al., 2006; GONCALVES et al., 2003). Em geral, as patologias relacionadas ao HTLV-1 ocorrem após 20 a 30 anos de latência viral. No entanto, casos de dermatite infecciosa podem ocorrer em pacientes durante a infância e adolescência (PRIMO et al., 2009).

2.4.1 Leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL)

A ATLL foi a primeira doença humana identificada tendo como agente etiológico um retrovírus (UCHIYAMA et al., 1977). É definida como uma forma agressiva de neoplasia causada por uma expansão oligoclonal ou monoclonal de células T CD4⁺ ativadas (HIGUCHI; FUJII, 2009; SHEMBADE; HARHAJ, 2010). Caracteriza-se pela infiltração destes linfócitos T nos linfonodos, fígado, baço, trato gastrointestinal, pulmões e pele, além da presença de células T anormais com núcleo lobulado ou em forma de flor (*flower cells*) (MATSUOKA, 2005).

A doença, cujo início é precedido por um longo período de latência, possui quatro apresentações clínicas descritas: a indolente ou *smouldering*, a crônica, a aguda e a linfomatosa (SHIMOYAMA, 1991). De modo geral, estas manifestações se diferenciam de acordo com a extensão da doença e nível de cálcio sérico (SHIMOYAMA, 1991; TAKATSUKI et al., 1985). Além desses tipos clínicos, um estudo recente identificou outra categoria conhecida como ATLL cutânea, cujas manifestações são restritas à pele (BITTENCOURT et al., 2007). As formas aguda e linfomatosa são mais agressivas e

apresentam pior prognóstico. A poliquimioterapia, tratamento existente até o momento, não aumenta a sobrevida média dos pacientes com ATLL (YAMAGUCHI; WATANABE, 2002)

O HTLV-1 não apresenta oncogenes derivados de seu genoma celular. Sua capacidade oncogênica está relacionada à atividade reguladora e transativadora de Tax, que é capaz de alterar a expressão de genes celulares envolvidos no controle do crescimento celular (YOSHIDA, 2001).

2.4.2 Mielopatia associada ao HTLV-1/ Paraparesia espástica tropical (HAM/TSP)

A HAM/TSP é uma doença inflamatória crônica e progressiva do sistema nervoso central, caracterizada por lesão e desmielinização da medula espinhal (GESSAIN et al., 1985; HINUMA et al., 1981). A prevalência desta desordem neurológica é de 0,3 a 4% em pacientes infectados pelo HTLV-1, sendo as mulheres mais acometidas que os homens (KAPLAN et al., 1990). O curso da doença é variável entre os pacientes, podendo se desenvolver de forma rápida ou muito lentamente (ARAUJO; SILVA, 2006).

Os sintomas iniciais característicos da HAM/TSP são fraqueza e rigidez dos membros inferiores (OSAME et al., 1997). Outros sintomas comumente presentes são dor lombar, um grau variável de perda sensorial e distúrbios da bexiga tal como urgência urinária e incontinência (LEPOUTRE et al., 2009). Com o progresso da doença, constipação, impotência sexual e decréscimo da libido podem se tornar aparentes. Hiperreflexia dos membros inferiores e sinal de Babinski são geralmente observados inicialmente no curso da mielopatia (FERREIRA; PLANELLES; ROSENBLATT, 1997). A doença frequentemente progride mais rapidamente após um período de 5-10 anos, estabilizando-se com níveis severos de disfunção motora (KIRA et al., 1991).

Do ponto de vista patológico, existe um comprometimento da medula torácica, com espessamento leptomeníngeo e atrofia medular em diferentes graus. Os achados histopatológicos incluem infiltração linfocitária perivascular, desmielinização, degeneração axonal e gliose. A intensidade da reação inflamatória está diretamente relacionada com o tempo da doença (GESSAIN; GOUT, 1992; IWASAKI, 1993).

Até o presente momento, os mecanismos de imunopatogênese da doença não foram totalmente elucidados. Entretanto, os achados anatomopatológicos suscitaram três hipóteses

principais para explicar a patogênese da HAM/TSP: citotoxicidade direta, autoimunidade e dano colateral (**figura 6**) (IJICHI et al., 1993; JACOBSON, 1996; OSAME, 2002). Na primeira hipótese, o dano neurológico é uma consequência direta da resposta antiviral dos CTLs. Deste modo, pressupõe-se que o HTLV-1 infecta as células residentes no sistema nervoso central, as quais apresentariam antígenos virais em sua superfície celular. Os CTLs circundantes específicos para o HTLV-1 atravessariam a barreira hematoencefálica e reconheceriam as células infectadas, destruindo-as. No mecanismo proposto para a segunda hipótese, uma resposta autoimune seria deflagrada pelas células T CD4⁺. Estes linfócitos, sensibilizados pelo antígeno viral no sangue periférico, atravessariam a barreira hematoencefálica e, por reação cruzada, deflagrariam uma resposta imune contra as células da glia. Na terceira, células T CD4⁺ infectadas pelo retrovírus e linfócitos T CD8⁺ específicos para o HTLV-1 atravessariam a barreira hematoencefálica e uma resposta imune ocorreria neste nível. Células da glia seriam destruídas pela ação dos mediadores citotóxicos liberados pelos CTLs contra as células T CD4⁺ infectadas. Poucas evidências suportam a primeira hipótese, mas as duas últimas podem estar presentes no curso da patogênese da HAM/TSP (JACOBSON, 2002; LEVIN et al., 1998; OSAME, 2002).

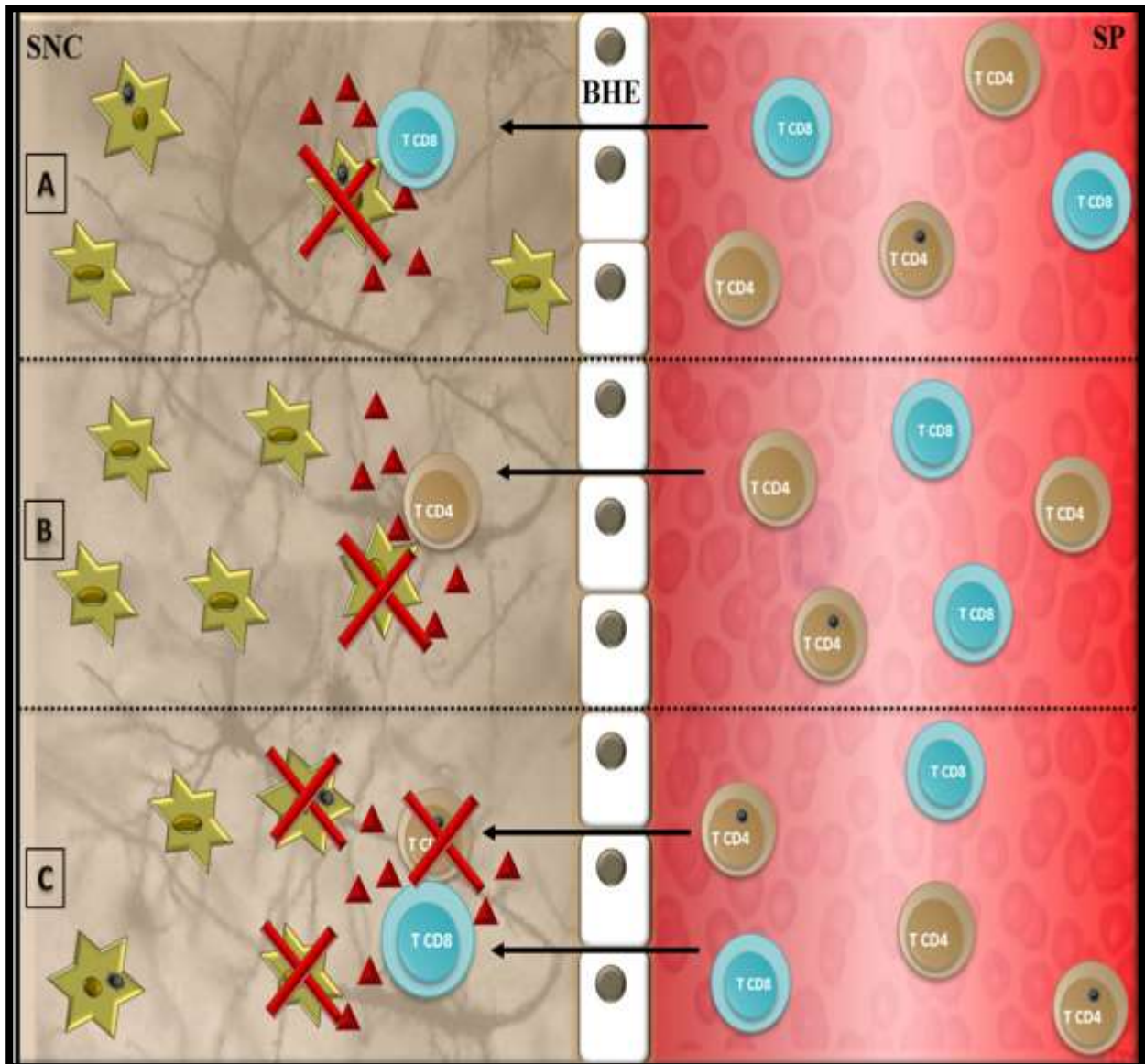


Figura 6. Hipóteses da patogênese da HAM/TSP. A – citotoxicidade direta; B – autoimunidade; C – dano circundante. Os três mecanismos foram descritos na página 29. SNC: Sistema nervoso central. BHE: Barreira hematoencefálica. SP: Sangue periférico.

Uma vez que a HAM/TSP pode levar os indivíduos acometidos à incapacidade motora permanente, constitui um sério problema de saúde pública. Em 1988, um grupo de pesquisadores junto a Organização Mundial da Saúde elaborou critérios de diagnóstico para a doença (**Anexo1**). Como o diagnóstico preconizado exige exames complexos, pesquisadores liderados pelo médico neurologista Carlos Maurício de Castro Costa propuseram, em 2006, uma classificação para o diagnóstico da HAM/TSP com o objetivo de criar uma ferramenta complementar aos critérios estabelecidos pela OMS que auxiliasse no segmento clínico dos

indivíduos infectados pelo HTLV-1 (DE CASTRO-COSTA et al., 2006). Os critérios utilizados nesta proposta brasileira, denominados de Critérios de Belém, caracterizam três níveis de certeza para a definição diagnóstica da HAM/TSP: definido (HAM-D), provável (HAM-PB) e possível (HAM-PS) (**Tabela 1**). Enquanto os critérios clínicos e laboratoriais utilizados para o diagnóstico de HAM-D foram os mesmos recomendados pela OMS, estabeleceu-se como critério diferencial para o diagnóstico de HAM-PB e HAM-PS a apresentação monossintomática ou oligossintomática e a não exclusão de outras doenças semelhantes à HAM/TSP, respectivamente.

Tabela 1 – Níveis de definição diagnóstica da HAM/TSP (DE CASTRO-COSTA et al., 2006).

Definido
1. Paraparesia espástica crônica, progressiva, não-remissiva com comprometimento suficiente da marcha que pode ser percebido pelo paciente. Sintomas ou sinais sensitivos podem ou não estar presentes. Quando presentes, eles permanecem leves e sem níveis sensitivos. Sinais ou sintomas urinários e intestinais podem ou não estar presentes.
2. Presença de anticorpos HTLV-1 no soro e líquido, confirmado por Western-blot e/ou PCR para HTLV-1 positivo no sangue e/ou líquido.
3. Exclusão de outras patologias que se assemelhem a HAM/TSP*.
Provável
1. Apresentação monossintomática: espasticidade ou hiperreflexia nos membros inferiores ou sinais de Babinski isolado com ou sem sinais sensitivos leves, ou bexiga neurogênica, somente confirmada por estudo urodinâmico.
2. Presença de anticorpos HTLV-1 no soro e/ou líquido, confirmado por Western-blot e/ou PCR para HTLV-1 positivo no sangue e/ou líquido.
3. Exclusão de outras patologias que se assemelhem a HAM/TSP*.
Possível
1. Apresentação clínica incompleta ou completa.
2. Presença de anticorpos HTLV-1 no soro e/ou líquido, confirmado por Western-blot e/ou PCR para HTLV-1 positivo no sangue e/ou líquido.
3. As outras patologias que se assemelham a HAM/TSP não foram excluídas*.

*Diagnóstico diferencial para HAM/TSP: esclerose múltipla, meningite carcinomatosa, paraparesia espástica familiar, mielite transversa, esclerose lateral amiotrófica, síndromes paraneoplásicas, siringomielia, doença de Lyme, deficiência de vitamina B12 e folato, doença de Behcet, neurosífilis, neurotuberculose, sarcoidose, mielopatia vacuolar pelo HIV, esclerose lateral primária, doença do colágeno vascular, mielopatia auto-imune, síndrome de Sjogren, mielopatias tóxicas, mielopatia fúngica, fistula arteriovenosa espinhal, mielopatia hepática, mielopatia parasitária (larva migrans visceral pelo *Toxocara canis* e *Ascaris suum*), compressão medular (tumor medular, espondilose cervical, tumor parasagital cerebral), mielopatia endêmica regional com manifestações clínicas similares (incluindo neurocisticercose e neuroesquistossomose).

2.5 LINFÓCITOS T CITOTÓXICOS

Os linfócitos T originam-se de precursores hematopoiéticos da medula óssea e passam pelo processo de maturação no timo, onde adquirem o complexo TCR/CD3. O TCR (receptor de células T) é responsável pelo reconhecimento do complexo peptídeo-MHC (complexo principal de histocompatibilidade) e o CD3 pela sinalização celular subsequente. O agrupamento CD3, composto por cinco cadeias polipeptídicas invariáveis (γ , δ , ϵ , ζ e η) associadas na forma de homodímero ($\zeta\zeta$) e heterodímeros ($\gamma\epsilon$, $\epsilon\delta$ e $\gamma\eta$), constitui o marcador de superfície mais sensível e específico utilizado como alvo para identificação dos linfócitos T (GOLDSBY; KINDT; OSBORN, 2008; JANEWAY et al., 2006)

A expressão da molécula CD8, glicoproteína dimérica de 30 kDA composta essencialmente por duas cadeias - α e β - unidas por ligações dissulfeto, em linfócitos T caracteriza especificamente uma subpopulação de células CD3⁺ denominadas de linfócitos T citotóxicos (CTLs) (AROSA; CARDOSO; PACHECO, 2006). Os CTLs desempenham um papel imprescindível na resposta imunológica do organismo contra tumores e patógenos intracelulares, como os vírus, uma vez que reconhecem antígenos intracitoplasmáticos apresentados por moléculas do MHC de classe I, expressas por praticamente todas as células nucleadas (JANEWAY et al., 2006). A ação efetora destas células ocorre através de três mecanismos complementares: produção de citocinas; interação entre moléculas de membrana (Fas-FasL) e citotoxicidade mediada por grânulos. As duas últimas vias de citotoxicidade necessitam do contato direto da célula efetora com a célula-alvo através da apresentação de peptídeos não-próprios pelo MHC de classe I ao TCR dos CTLs (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Durante a apresentação do antígeno aos linfócitos citotóxicos *naive*, a molécula CD8, presente na membrana do CTLs, atua como co-receptor na interação MHC-TCR e potencializa a transdução de sinal ao aumentar afinidade do complexo TCR e recrutar moléculas sinalizadoras. Após a adesão a célula-alvo e posterior ativação, estes linfócitos proliferam e entram em fase de expansão clonal pronunciada, gerando células efetoras e de memória específicas para o antígeno. Os clones dos CTLs efetores migram para os tecidos e contribuem para a eliminação do patógeno através de sua ação efetora (GOLDSBY et al., 2008; JANEWAY et al., 2006). As células de memória persistem por tempo prolongado no hospedeiro e conferem uma resposta imune mais rápida e potente após a reexposição ao antígeno, comparadas às células *naive* (AHMED; GRAY, 1996). De acordo com o fenótipo e

a função, as células de memória podem ser classificadas em três subtipos: memória central (TCM), efetora (TEM) e efetora terminalmente diferenciada (TEMRA) (GEGINAT; LANZAVECCHIA; SALLUSTO, 2003; SALLUSTO; GEGINAT; LANZAVECCHIA, 2004; SALLUSTO et al., 1999). Enquanto os linfócitos de memória central tem alta capacidade de proliferação e produzem principalmente a citocina IL-2, as células de memória efetora possuem função efetora imediata e secretam IL-2 e IFN- γ . Os linfócitos de memória altamente diferenciada, por sua vez, apresentam reduzida capacidade de proliferação e ação efetora potente, caracterizada pela elevada produção de IFN- γ . Para a identificação a partir do fenótipo, têm sido proposta a utilização combinada de diversos marcadores, como CD45RA, CD45RO, CCR7, CD62L, CD27, CD28 e CD127 (GEGINAT et al., 2003; KAECH; WHERRY, 2007; SALLUSTO et al., 1999). Apesar de existirem hipóteses sobre a origem das subpopulações dos linfócitos de memória, os mecanismos de geração e manutenção destas células ainda não foram totalmente esclarecidos.

A indução de apoptose nas células-alvo constitui a principal forma de controle de infecções pelos CTLs. Além deste mecanismo, estes linfócitos produzem e liberam citocinas, como IFN- γ , TNF- α e TNF- β , que contribuem para a defesa do hospedeiro, limitando a disseminação dos patógenos citoplasmáticos. O IFN- γ é um mediador químico que estimula a produção de proteínas intrínsecas ao processamento antigênico e induz um aumento da expressão de moléculas de MHC classe I, potencializando a apresentação de antígeno associada ao MHC e amplificando a fase de reconhecimento. Em sinergia com TNF- α e TNF- β , o IFN- γ também pode atuar no processo de ativação e recrutamento de macrófagos para os locais de infecção. Outras importantes ações biológicas desta citocina são a redução de triptofano nas células-alvo, a promoção da diferenciação das células T CD4⁺ *naive* em células T_H1, a ativação de células do endotélio vascular e a potencialização de ações do TNF em células endoteliais, promovendo a adesão e o extravasamento de linfócitos T para os locais de infecção (ABBAS et al., 2008; GOLDSBY et al., 2008; SCHRODER et al., 2004).

Um mecanismo utilizado pelos CTLs para citólise da célula-alvo é a interação Fas-FasL. O Fas (APO-1/CD95) é uma proteína transmembrana que integra a família de receptores do fator de necrose tumoral (TNF) (ITOH et al., 1991). Este receptor, assim como outros membros da família, possui um domínio de morte na sua região citoplasmática que é essencial para a indução da apoptose (NAGATA; GOLSTEIN, 1995). A interação do Fas, presente na membrana das células-alvo, com o seu ligante FasL (CD178), expresso na

superfície de CTLs ativados, promove sua ativação e posterior recrutamento e clivagem da pro-caspase-8. Na sua forma ativa, a caspase-8 pode clivar diretamente a pro-caspase-3 ou clivar o BID – membro da família BCL2, resultando na ativação da caspase-9 e caspase-3 (BARRY; BLEACKLEY, 2002; STRASSER; JOST; NAGATA, 2009). As duas vias culminam com a apoptose da célula-alvo.

A liberação de grânulos citotóxicos contra células-alvo desponta como o mecanismo principal de citotoxicidade mediado pelos CTLs (HENKART, 1985). Os grânulos citotóxicos são formas especializadas de lisossomos secretórios que contêm moléculas proteicas como granzimas, perforina, serglicina, catepsinas e granulicina. (DE SAINT BASILE; MENASCHE; FISCHER, 2010; KRENSKY, 2000; PETERS et al., 1991; TRAPANI, 2001). A membrana dos grânulos é formada por uma bicamada lipídica contendo glicoproteínas de membrana lisossomal – CD107a (LAMP-1), CD107b (LAMP-2) e CD63 (LAMP-3) – que se integram transitoriamente a membrana plasmática durante o processo de degranulação (AKTAS et al., 2009). A interação MHC-TCR (célula-alvo/efetora) e entre moléculas co-receptoras e co-estimulatórias no processo de sinapse imunológica ativa uma cascata de sinalização nos CTLs levando a uma reorganização do citoesqueleto com a mobilização do centro de organização dos microtúbulos para o polo da fenda sináptica e a concentração de grânulos citoplasmáticos na região. A fusão da membrana destes grânulos com a membrana plasmática libera o conteúdo dos mesmos na região da sinapse. Neste local, a perforina e granzima B desempenham papel essencial no processo de lise da célula-alvo (BARRY; BLEACKLEY, 2002).

2.5.1 Perforina

Descrita inicialmente na década de 1980, a perforina é uma glicoproteína de aproximadamente 67 KDa presente nos grânulos citotóxicos de células NK, CTL, T $\gamma\delta$ e em subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e NKT (DE ROSA et al., 2004; GROSSMAN et al., 2004; GUMPERZ et al., 2002; NAKATA et al., 1992; PODACK; KONIGSBERG, 1984). Esta proteína apresenta um papel fundamental no processo de citotoxicidade celular ao formar poros na membrana plasmática da célula-alvo através de um mecanismo dependente de cálcio.

No interior dos grânulos citotóxicos, a perforina encontra-se armazenada na forma de monômeros ligados a serglicinas. O ambiente ácido e a ausência de cálcio livre, o qual se

encontra ligado a calreticulina, mantêm a perforina na sua forma inativa (PIPKIN; LIEBERMAN, 2007). Quando a célula é estimulada e o conteúdo dos grânulos é liberado na fenda sináptica, os monômeros de perforina se dissociam das serglicinas, se ligam a moléculas de fosforilcolina na membrana da célula-alvo e, na presença de cálcio extracelular, polimerizam, formando poros na bicamada lipídica (JANEWAY et al., 2006; KAGI et al., 1994; LOWIN et al., 1994). Os poros, cujos diâmetros variam de 5 a 20 nm, são lipofílicos na parte externa e hidrofílicos no interior do canal, permitindo a passagem de água (SAUER et al., 1991). A formação de vários canais facilita a entrada de outros componentes pró-apoptóticos dos grânulos, compromete a integridade da membrana e provoca um distúrbio no equilíbrio hidroeletrólítico, levando a célula-alvo à morte.

A perforina tem homologia com componentes do sistema complemento, como o C9, e sua expressão é regulada positivamente por sinais deflagrados por receptores de ativação e por citocinas como IL-2, IL-15 e IL-21 (BARRY; BLEACKLEY, 2002; PIPKIN; LIEBERMAN, 2007). Opondo-se ao aspecto constitutivo em células NK, a expressão de perforina em células T periféricas demanda ativação prévia do gene PRF1 (LU et al., 1992; NAKATA et al., 1992; SALCEDO et al., 1993).

2.5.2 Granzima B

As granzimas compreendem um conjunto de serino-proteases com atividade proteolítica armazenadas na forma ativa em grânulos citoplasmáticos de células NK, T $\gamma\delta$, CTL, basófilos, mastócitos, linfócitos B e em subpopulações de células T CD4⁺ e NKT (DE ROSA et al., 2004; HAGN et al., 2009; PAUL et al., 2013; STRIK et al., 2007; TSCHOPP et al., 2006). Enquanto em alguns tipos celulares (NK e NKT) a síntese dessas proteínas é constitutiva, em outros a expressão do transcrito requer estimulação antigênica (GARCIA-SANZ et al., 1990). Até o momento foram descritos cinco tipos de Granzima (A, B, H, K e M) expressos em células humanas e onze tipos (A, B, C, D, E, F, G, K, L, M e N) em camundongos (ANTHONY et al., 2010).

Devido a sua relevância funcional e expressão abundante nos CTLs, a granzima B tem sido o tipo mais estudado. Descoberta no final da década de 1980, esta proteína foi caracterizada como uma serino-protease de 32 KDa com especificidade na clivagem de peptídeos adjacentes a resíduos de aspartato (POE et al., 1991). Funcionalmente, contribui

para o processo de citotoxicidade celular ao induzir apoptose em células-alvo (HEUSEL et al., 1994).

Após a sua síntese, a granzima B é direcionada pelo complexo de golgi aos grânulos citotóxicos (GRIFFITHS; ISAAZ, 1993). Nestes, a proteína torna-se ativada pela remoção da região N-terminal e é armazenada junto a moléculas de serglicinas (SMYTH; MCGUIRE; THIA, 1995). O ambiente ácido dos grânulos e a combinação com as serglicinas minimizam a atividade proteolítica da enzima no interior das células efetoras (BALAJI et al., 2002). Adicionalmente, inibidores específicos da granzima B, como o PI-9, que podem regular atividade da enzima, reduzem as chances de apoptose acidental mediada pela proteína (BIRD et al., 1998; SUN et al., 1996).

Após a ativação celular e liberação dos grânulos na fenda sináptica, a granzima B pode atingir o citoplasma da célula-alvo através dos poros formados pela perforina ou pela endocitose via ligação com os receptores membranares manose-6-fosfato (**Figura 7**) (MOTYKA et al., 2000; PINKOSKI et al., 1998). Em ambas as vias a perforina é indispensável, uma vez que também está envolvida na liberação da granzima B do compartimento endossomal (THIERY et al., 2011). Ademais, a formação de poros na membrana plasmática pode ativar um sistema de reparo de danos mediado por vesículas, facilitando a endocitose das granzimas (KEEFE et al., 2005).

No citoplasma da célula-alvo, a granzima B pode desencadear o processo de apoptose por vias diferentes (**Figura 7**). Na via extrínseca, a enzima cliva diretamente a pro-caspase 3 e ativa a cascata das caspases, promovendo a degradação de substratos proteicos e levando a célula à apoptose. Na via mitocondrial, a proteólise da BID pela granzima B resulta na liberação, pela mitocôndria, do citocromo c no citosol, formando o complexo apoptossomo com o Apaf-1 e a pro-caspase 9. Este complexo é capaz de clivar pro-caspase 9, que por sua vez pode ativar a pro-caspase 3, induzindo a morte celular (BARRY; BLEACKLEY, 2002).

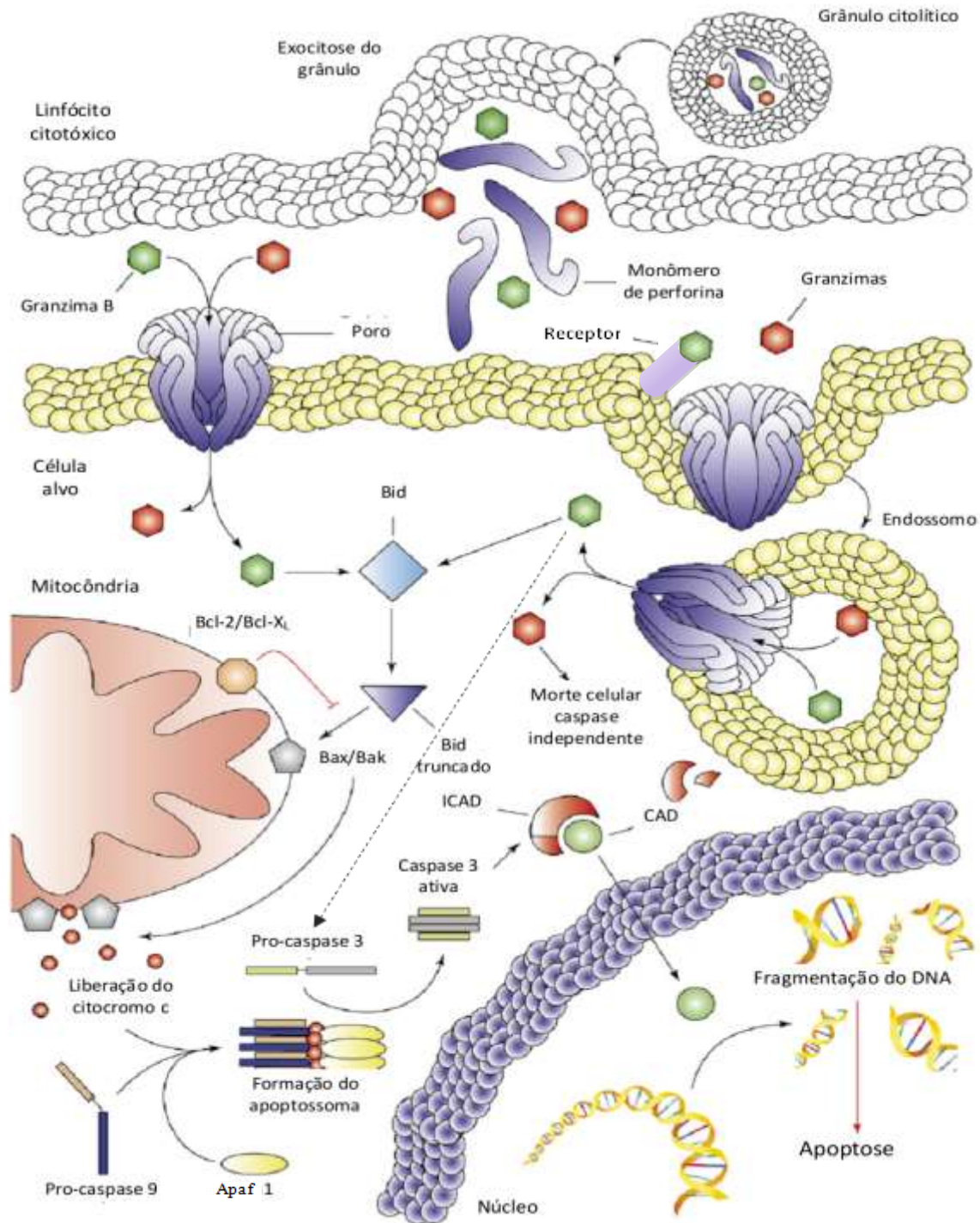


Figura 7. Vias de apoptose induzidas por granzima B. Uma vez liberada no citoplasma, a granzima B pode iniciar o processo de apoptose diretamente pela clivagem da pro-caspase 3 ou indiretamente pela proteólise da BID e desestruturação da mitocôndria. A perda da integridade da membrana mitocondrial promove a liberação do citocromo c no citosol. Em conjunto com o Apaf-1 e pro-caspase 9, o citocromo c constitui o complexo apoptossoma, que tem a capacidade de converter pro-caspase 3 em seu estado ativo. A caspase 3 promove a liberação e translocação da CAD para o núcleo, resultando na fragmentação do DNA e apoptose da célula-alvo. CAD: DNase ativada por caspase. ICAD: inibidor da CAD. Adaptado de (BOLITHO et al., 2007).

2.6 OS LINFÓCITOS T CITOTÓXICOS E A RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA INFECÇÃO PELO HTLV-1

O HTLV-1 apresenta tropismo para os linfócitos T, infectando preferencialmente os linfócitos T CD4⁺ (RICHARDSON et al., 1990). No entanto, outros tipos celulares como os CTLs, linfócitos B, células dendríticas, macrófagos e células da glia podem ser alvos do patógeno (HANON et al., 2000b; KNIGHT et al., 1993; KOYANAGI et al., 1993; LEHKY; JACOBSON, 1995; NATH et al., 2003). A infecção pelo vírus promove ativação e proliferação das células-alvo devido à ação transativadora da proteína viral Tax, a qual inibe proteínas regulatórias do ciclo celular, ativa as ciclinas D, suprime a apoptose pelo aumento de Bcl-2 e induz a produção de IL-2 e expressão de seu receptor IL-2R, desencadeando também a produção espontânea de citocinas (AZRAN; SCHAVINSKY-KHRAPUNSKY; ABOUD, 2004; BALLARD et al., 1988). Conquanto a infecção pelo HTLV-1 possa exibir um caráter latente, o sistema imunológico apresenta-se ativado com participação dos componentes da resposta celular e humoral. A ativação constante e persistente das células engendra altos títulos de anticorpos anti-HTLV-1 e uma frequência elevada de CTLs específicos para Tax (NAGAI et al., 1998). Além disso, os indivíduos acometidos pelo retrovírus podem apresentar proliferação espontânea, *in vitro*, de células da resposta imune inata e adquirida (NORRIS et al., 2010).

A carga proviral, representada pelo número de células mononucleares do sangue periférico que apresentam o DNA proviral integrado ao genoma celular, parece ser mantida, essencialmente, pela divisão mitótica das células contendo o provírus (ASQUITH; BANGHAM, 2007; CAVROIS et al., 1996). Na maior parte dos indivíduos infectados, a carga proviral apresenta-se estável, flutuando pouquíssimas vezes em torno do ponto de equilíbrio (ASQUITH et al., 2005; KUBOTA et al., 1993). Todavia, esta harmonia pode ser resiliada e um platô mais elevado alcançado quando há o desenvolvimento de manifestações clínicas associadas à infecção, como HAM/TSP (GRASSI et al., 2011; OLINDO et al., 2005), ceratoconjuntivite seca (CASTRO-LIMA VARGENS et al., 2011), artrite (YAKOVA et al., 2005), dermatite infectiva (PRIMO et al., 2009) e ATLL (OKAYAMA et al.).

A resposta imune celular específica para o HTLV-1 constitui um dos determinantes da estabilidade da carga proviral, sendo extremamente relevante no controle da infecção. Os CTLs, que se encontram cronicamente ativados, desempenham papel fundamental no

reconhecimento e lise das células HTLV-1⁺, no contexto do MHC de classe I, através dos mecanismos citotóxicos anteriormente citados (ASQUITH et al., 2005; HANON et al., 2000a). Uma resposta eficiente destes linfócitos poderia suprimir a frequência de células expressando a proteína Tax e conseqüentemente reduzir a carga proviral. Assim, a eficiência funcional dos CTLs estaria relacionada inversamente com o risco de desenvolvimento de doenças inflamatórias associadas à infecção, como a HAM/TSP (BANGHAM, 2000;2003; BANGHAM; OSAME, 2005).

Por outro lado, uma resposta imunológica exacerbada poderia contribuir para o dano tecidual observado no sistema nervoso central dos indivíduos portadores da HAM/TSP (JACOBSON, 2002). A frequência elevada de CTLs específicos para o HTLV-1 no sangue periférico e no líquido de pacientes com a mielopatia associada ao vírus e uma baixa frequência dos CTLs anti-Tax nos indivíduos infectados sem a mielopatia sugerem uma contribuição destas células na patogênese da HAM/TSP (BARMAK; HARHAJ; WIGDAHL, 2003; BIDDISON et al., 1997). Nos indivíduos infectados com a mielopatia, o aumento da expressão em células CD14⁺ da isoforma membranar da IL-15, que promove degranulação pelos CTLs, e a correlação diretamente proporcional entre a frequência de CTLs específicos para o HTLV-1 e a produção de citocinas como IFN- γ , TNF- α , IL-15 e IL-2, que contribuem para o ambiente pró-inflamatório e supostamente participam da desmielinização neuronal, avigoram a conjectura elencada (AZIMI et al., 1998; ENOSE-AKAHATA et al., 2008; KUBOTA et al., 1998). Adicionalmente, o relato de uma maior produção de citocinas pró-inflamatórias em pacientes com HAM/TSP apresentando carga proviral similar a indivíduos infectados sem a mielopatia reforça o papel destas proteínas na patogênese da doença (FURUKAWA et al., 2003).

A produção espontânea de citocinas pelos CTLs e linfócitos T CD4⁺ é uma característica frequente dos indivíduos infectados pelo HTLV-1. As células mononucleares dos indivíduos com HAM/TSP produzem níveis elevados de IFN- γ e TNF- α , na ausência de estímulo, comparados aos indivíduos sem a mielopatia (KUBOTA et al., 1998; NISHIURA et al., 1996). Concomitante à síntese de citocinas inflamatórias, as células mononucleares dos indivíduos portadores do HTLV-1 sem a mielopatia também produzem espontaneamente níveis elevados de IL-10 quando comparados a indivíduos não infectados (CARVALHO et al., 2001). Como a IL-10 foi capaz de modular negativamente, *in vitro*, a síntese de IFN- γ e TNF- α apenas em indivíduos infectados sem a mielopatia, sugeriu-se que a intensa produção

desta citocina poderia contribuir para manutenção do estado clínico assintomático para HAM/TSP (BRITO-MELO et al., 2007; SANTOS et al., 2006). De fato, a razão dos níveis séricos de citocinas pro-inflamatórias/regulatórias encontra-se maior no grupo HAM/TSP comparado aos infectados sem a mielopatia. No entanto, os níveis plasmáticos da IL-10 parecem não diferir entre os indivíduos infectados (STARLING et al., 2013).

Como os CTLs, as células NK (*Natural killer*) são capazes de destruir células infectadas através de mecanismos citotóxicos. Expressam, constitutivamente na membrana, receptores de ativação e inibição que ligados a outras moléculas-alvo controlam o processo de ativação celular, o qual prescinde sensibilização prévia (O'CONNOR; HART; GARDINER, 2006). As NKs podem reconhecer células infectadas que apresentem diminuição de moléculas de MHC de classe I ou que expressem moléculas (MICA/B) codificadas em situação de estresse por genes não clássicos relacionados às cadeias MHC de classe I. Na infecção pelo HTLV-1, o papel das células NK ainda não está esclarecido. Alguns trabalhos demonstraram que células T CD4⁺ infectadas pelo vírus expressam MICA/B e apresentam redução de MHC classe I, sugerindo que as células NK poderiam reconhecer e destruir as células HTLV-1⁺ (AZIMI et al., 2006; BANERJEE; FEUER; BARKER, 2007). Todavia, a depleção de células NK, *in vitro*, não afetou a quantidade de linfócitos T CD4⁺ positivos para Tax, implicando um caráter prescindível destas células para o controle da infecção (HANON et al., 2000a). Quanto aos indivíduos acometidos pela HAM/TSP, foi evidenciada diminuição da frequência de subpopulações de células NK em relação aos indivíduos infectados sem a mielopatia e da atividade funcional quando comparados com os indivíduos não infectados (NDHLOVU et al., 2009; YU et al., 1991).

As células T regulatórias (Treg) também podem estar envolvidas na imunopatogenia da infecção pelo HTLV-1, uma vez que são capazes inibir a ativação de CTLs e suprimir a síntese de citocinas pro-inflamatórias (HORI; NOMURA; SAKAGUCHI, 2003; VON BOEHMER, 2005). Existem relatos de aumento da frequência de células Treg CD4⁺FoxP3⁺ em pacientes com HAM/TSP, que pode ser explicado como uma tentativa de controlar a ativação celular desencadeada por Tax (BEST et al., 2009; TOULZA et al., 2008). Contraditoriamente, outros estudos em pacientes infectados pelo vírus apontam uma redução das células Treg (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ e CD4⁺CD25^{high}CTLA-4⁺), principalmente nos pacientes com HAM/TSP (MICHAELSSON et al., 2008; YAMANO et al., 2005). Adicionalmente, foi demonstrada uma correlação inversa da frequência de células Treg com a

atividade citolítica dos CTLs (TOULZA et al., 2008) e com a carga proviral (MICHAELSSON et al., 2008). Corroborando estes achados, ensaios *in vitro* revelaram um efeito supressor da proteína viral Tax na expressão de fatores críticos para o desenvolvimento das células Treg (GRANT et al., 2008; YAMANO et al., 2005). Deste modo, o comprometimento da imunoregulação e da tolerância imunológica poderia contribuir para o ambiente inflamatório observado na HAM/TSP.

3. JUSTIFICATIVA

O Brasil representa uma das maiores áreas endêmicas para o HTLV-1 e doenças associadas, como a HAM/TSP, e Salvador é considerada a cidade brasileira com maior prevalência da infecção por este retrovírus. Embora diversos estudos sobre a temática tenham sido conduzidos nas últimas décadas, a patogênese da HAM/TSP não foi totalmente elucidada. Permanece indeterminado o motivo pelo qual uma pequena parcela dos indivíduos infectados desenvolve a mielopatia. Além disso, até o momento, não existe tratamento eficaz para a doença.

Os linfócitos T citotóxicos são células que desempenham papel primordial na resposta imune celular em infecções virais. Na infecção pelo HTLV-1, os trabalhos pertinentes demonstram resultados discordantes sobre a legítima função destas células e sua repercussão na patogênese da HAM/TSP. Além disso, não existem estudos sobre estes linfócitos nos pacientes diagnosticados como HAM-PB, de acordo com os critérios de Belém.

Diante da ausência de um consenso sobre o aspecto funcional das células diretamente envolvidas na resposta imunológica à infecção pelo HTLV-1, o estudo do fenótipo e da função dos CTLs de indivíduos infectados com e sem a mielopatia associada ao vírus torna-se extremamente relevante para a compreensão da resposta imune e da imunopatogênese da HAM/TSP.

4. OBJETIVOS

4.1 GERAL

Avaliar o fenótipo e a função dos linfócitos T citotóxicos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 com diagnóstico de HAM-PB e HAM-D, comparando-os com os das células de portadores sem mielopatia e de indivíduos não infectados.

4.2 ESPECÍFICOS

- ⇒ Quantificar a frequência dos linfócitos T citotóxicos;
- ⇒ Avaliar a distribuição das subpopulações de memória dos CTLs;
- ⇒ Quantificar a expressão de granzima B e perforina nos CTLs;
- ⇒ Avaliar a atividade de degranulação recente e quantificar a proporção de linfócitos T citotóxicos produtores de IFN- γ ;
- ⇒ Quantificar a proporção de células mononucleares do sangue periférico e células CD14⁺ que expressam a isoforma membranar da IL-15;
- ⇒ Correlacionar a frequência de células e a atividade de degranulação à carga proviral do HTLV-1.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo de corte transversal, com abordagem analítica, sobre o fenótipo e função dos linfócitos T citotóxicos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 com HAM/TSP. A estratégia de análise utilizada no estudo está exposta na **Figura 8**.

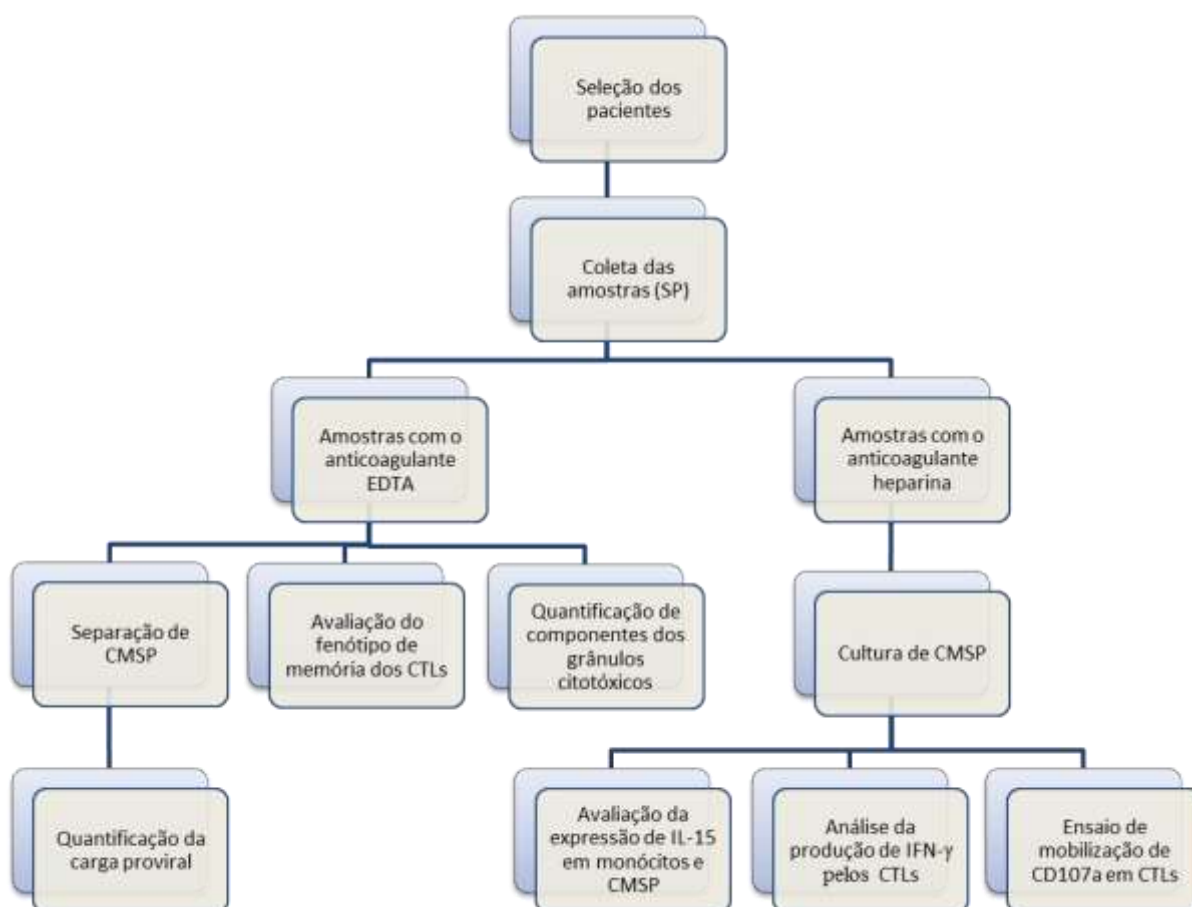


Figura 8. Fluxograma da estratégia experimental. SP: sangue periférico. CMSP: células mononucleares de sangue periférico. CTLs: linfócitos T citotóxicos.

5.2 PACIENTES

Trata-se de uma amostra de conveniência. Participaram do estudo treze voluntários não infectados e quarenta e nove pacientes portadores do HTLV-1: dezoito indivíduos

assintomáticos para a mielopatia, seis pacientes com diagnóstico de HAM/TSP-provável e vinte e cinco pacientes com diagnóstico de HAM/TSP-definido. Os pacientes, provenientes do Centro de Referência de Portadores do HTLV (CHTLV) da Fundação Bahiana para o Desenvolvimento das Ciências (FBDC), foram avaliados por um neurologista e o diagnóstico de HAM/TSP foi determinado segundo os critérios da classificação clínica estabelecida por De Castro-Costa em 2006 (**Tabela 1**). Foram excluídos indivíduos acometidos por outras infecções virais crônicas como HIV-1 e hepatite B ou C.

5.3 IMUNOFENOTIPAGEM DOS LINFÓCITOS T CD8⁺

A frequência dos linfócitos T citotóxicos e de suas subpopulações *naive*, memória central (TCM), memória efetora (TEM) e memória efetora altamente diferenciada (TEMRA) foi avaliada por citometria de fluxo, utilizando para marcação membranar os anticorpos monoclonais anti-CD3^{APC-CY7}, anti-CD8^{APC}, anti-CCR7^{PE-CY7} e anti-CD45RA^{PE} (Becton Dickinson Pharmingen, San Jose, CA, EUA), bem como controles isotípicos para cada fluorocromo empregado. Para a marcação de moléculas presentes na superfície das células, foi utilizada uma alíquota de 100 µL de sangue total por tubo de experimento. Em cada tubo, após a adição dos anticorpos ou controles isotípicos e incubação por 15 minutos à temperatura ambiente e sob proteção da luz, foi adicionado o reagente FACS Lysing Solution (1X) (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA) para lise dos eritrócitos, de acordo com as instruções do fabricante. Adicionou-se 2 mL de PBS/BSA 0,5% para lavagem dos anticorpos não ligados e os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o procedimento de lavagem repetido mais uma vez. Ao final, as células foram ressuspensas em 300 µL de PBS/BSA/Paraformaldeído 0,4% e acondicionadas a 4°C, ao abrigo da luz, até o momento da aquisição em citômetro de fluxo (BD FACSAriaTM, San Jose CA, EUA). Foram adquiridos 20.000 eventos dos tubos controles com os anticorpos isotípicos e no mínimo 50.000 eventos dos tubos com os anticorpos para as moléculas de interesse. Os eventos foram plotados em função dos parâmetros FSC x SSC e analisados pelo software FlowJo (Tree Star), conforme estratégias representadas na **Figura 9**.

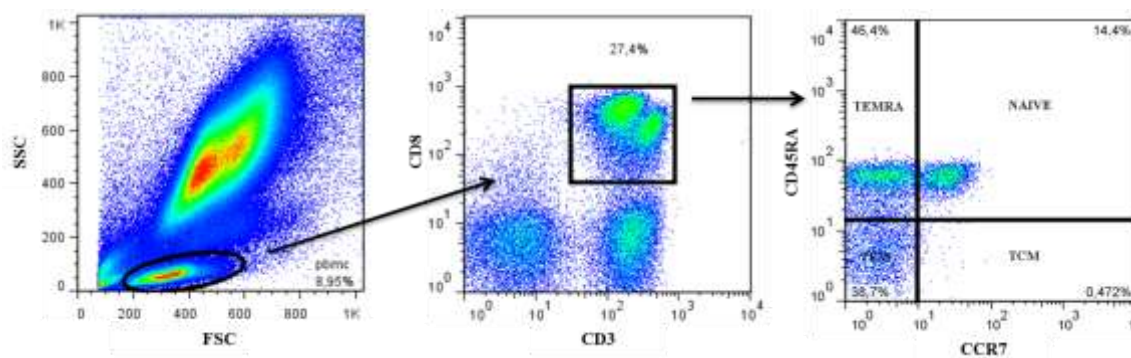


Figura 9. Fluxograma da estratégia de análise das subpopulações de linfócitos T $CD8^+$ *naive* e de memória. TEM: células T de memória efetora. TCM: células T de memória central. TEMRA: células T de memória terminalmente diferenciadas.

5.4 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO INTRACELULAR DE GRANZIMA B E PERFORINA

A expressão de granzima B e perforina em células $CD8^+$ foi quantificada a partir de amostras de sangue total de acordo com os procedimentos de marcação membranar, descritos no item 4.3, seguido da marcação intracelular. Foram utilizados os anticorpos monoclonais anti- $CD8^{APC}$, anti-Granzima B^{FITC} e anti-Perforina^{PE} (Becton Dickinson Pharmingen, San Jose, CA, EUA). Após a etapa de marcação de moléculas da superfície celular com o anticorpo anti- $CD8$, as células foram incubadas a temperatura ambiente com 200 μ L de PBS/BSA/Paraformaldeído 2% para fixação. Posteriormente, as células foram lavadas com 1 mL de PBS/BSA/Saponina 0,2%, para permeabilização membranar, e incubadas durante 30 minutos com os anticorpos anti-Granzima B^{FITC} e anti-Perforina^{PE}. Ao término do período, mais duas lavagens foram realizadas e o *pellet* ressuspensionado em 300 μ L de PBS/BSA 0,5%. Para cada amostra foi utilizado um tubo controle com os anticorpos isotípicos. Os critérios de aquisição das amostras foram descritos no item 4.3. A estratégia utilizada para análise da frequência de células citotóxicas positivas para os constituintes dos grânulos citotóxicos está representada na **Figura 10**. Para quantificar a expressão proteica de Granzima B e perforina foi avaliada a intensidade de fluorescência destes parâmetros.

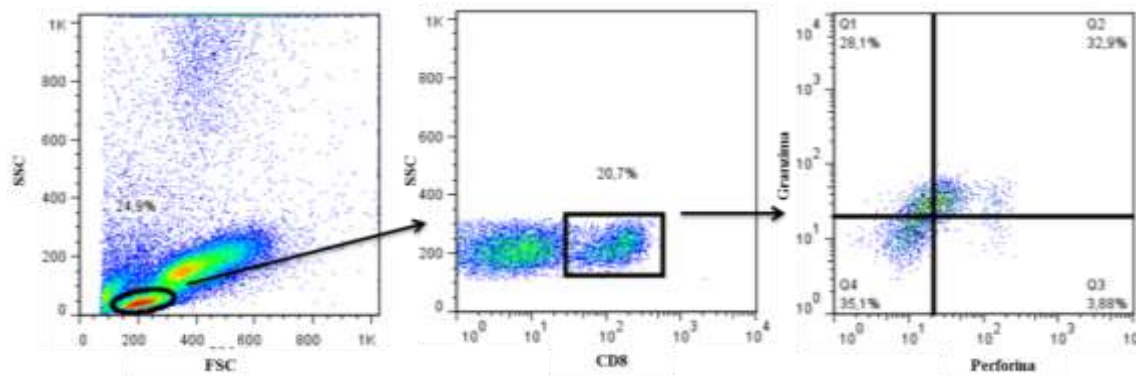


Figura 10. Fluxograma da estratégia utilizada para análise da frequência de células $CD8^+$ positivas para Granzima B e perforina.

5.5 OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO

As células mononucleares de sangue periférico (CMSPs) dos indivíduos incluídos no estudo foram obtidas por gradiente de densidade, utilizando-se o reagente Ficoll-Hypaque (densidade 1,077g/mL) (*Sigma-Aldrich*, Saint Louis, Missouri - EUA), a partir de amostras de sangue total. As amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 1500 rpm para separação e remoção do plasma. Em seguida, a fração celular do sangue foi diluída 1:2 (v/v) em tampão fosfato pH 7,5 (PBS, 1X) em tubos de polipropileno de 15mL e 50 mL. Ao sangue diluído, foram adicionados 4 a 8mL de Ficoll-Hypaque e procedeu-se uma nova centrifugação por 28 minutos a 1800 rpm à temperatura ambiente e com desaceleração nula, para obtenção da camada de CMSP, visualizada em forma de anel na interface ficoll-PBS. Este anel foi cuidadosamente coletado, com auxílio de uma pipeta pasteur, transferido para outro tubo de polipropileno, e submetido a três lavagens com 12 mL de PBS (1X) e centrifugação a 1500 rpm por 10 minutos. O *pellet* de CMSP foi ressuspensionado em 1 mL de PBS (1X) e a contagem e avaliação da viabilidade celular foram realizadas em câmara de Neubauer com azul de Tripan.

5.6 ENSAIO DE MOBILIZAÇÃO DE CD107A E QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE $IFN-\gamma$

A atividade de degranulação de linfócitos T citotóxicos foi avaliada através do ensaio de mobilização da molécula CD107a (BURKETT et al., 2005). CMSP (2×10^6 cells/mL) foram cultivadas em meio RPMI 1640 (*Sigma-Aldrich*, Saint Louis, Missouri - EUA)

suplementado com 10 % de soro AB inativado na presença de 2 ug/mL de CD28/CD49d (Becton Dickinson Pharmingen, San Jose, CA, EUA) e anti-CD107a^{FITC} por 6 horas a 37°C e 5% de CO₂. Em outro tubo, nas mesmas condições, foi adicionado SEB (enterotoxina B de *Staphylococcus aureus*) (*Sigma-Aldrich*) para controle positivo. Monensina e Brefeldina A (*Sigma-Aldrich*) foram adicionadas às culturas após a primeira hora de incubação. Ao término do período, as CMSP foram lavadas e incubadas com os anticorpos anti-CD3^{APC-CY7} e anti-CD8^{APC}. Em seguida, as células foram fixadas com paraformaldeído 2%, permeabilizadas com saponina 0,2%, marcadas com o anticorpo anti-IFN- γ ^{PE} (ebioscience) - conforme protocolo para marcação intracelular descrito no item 4.3 - e acondicionadas a 4°C até a aquisição em citômetro de fluxo. Controles isotípicos foram utilizados para cada fluorocromo empregado. Os critérios de aquisição das amostras foram descritos no item 4.3. A estratégia utilizada para análise da frequência de células positivas para CD107a e IFN- γ está representada na **Figura 11**. A quantificação da expressão de CD107a e IFN- γ foi realizada através da análise da intensidade de fluorescência destes parâmetros.

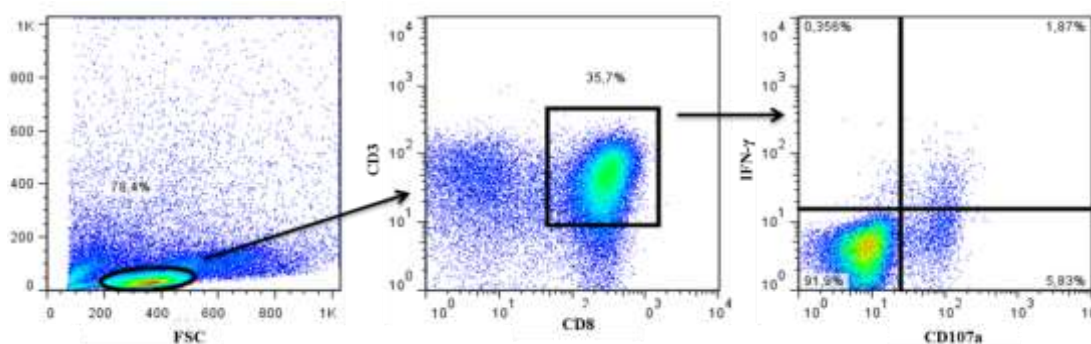


Figura 11. Fluxograma da estratégia utilizada para análise da frequência de linfócitos T citotóxicos positivos para CD107a e/ou IFN- γ .

5.7 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE IL-15 EM CÉLULAS CD14⁺ E EM CMSP

A expressão da isoforma da interleucina 15 de superfície foi avaliada seguindo um protocolo adaptado à metodologia descrita por pesquisadores do NIH (ENOSE-AKAHATA et al., 2008). CMSP (2×10^6 cells/mL) foram cultivadas em meio RPMI 1640 (*Sigma-Aldrich*) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Hyclone, Logan Utah – EUA) na presença de anti-IL-15^{PE} (R&D Systems, EUA) por 5 horas a 37°C e 5% de CO₂. Em outro tubo, nas mesmas condições, foi adicionado SEB (*Sigma-Aldrich*) para controle positivo. Ao

término do período, as CMSP foram lavadas, incubadas com o anticorpo anti-CD14^{FITC} por 15 minutos e fixadas com paraformaldeído 0,4%. Os critérios de aquisição das amostras foram descritos no item 4.3. A estratégia de análise da frequência de células positivas para IL-15 está representada na **Figura 12**. A expressão de IL-15 foi quantificada através da intensidade de fluorescência.

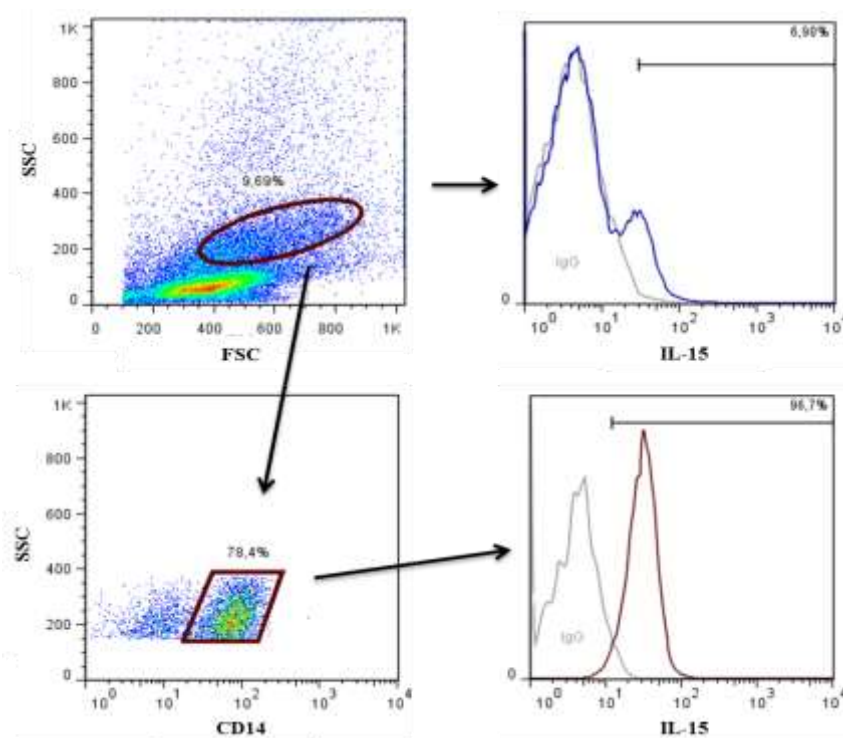


Figura 12. Fluxograma da estratégia utilizada para análise da frequência de CMSP e células CD14⁺ positivas para IL-15.

5.8 QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PROVIRAL DO HTLV-1

O DNA de 1×10^6 de CMSP foi extraído utilizando o QIAAMP DNA MINI KIT (QIAGEN), de acordo com as instruções do fabricante. A carga proviral foi determinada pelo método de PCR quantitativo em tempo real, utilizando o ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, Califórnia - EUA), através do sistema TaqManTM (Applied Biosystems), conforme descrito anteriormente por outros pesquisadores (DEHEE et al., 2002). Foram utilizados para a quantificação do DNA proviral os primers *forward* SK110 e *reverse* SK111 e a sonda TaqMan marcada com FAM (6-carboxy fluorescein) para a sequência referência do HTLV-1 (HTLVATK), localizada no fragmento 4829-4858 pb (**Tabela 2**).

O DNA da albumina foi quantificado em paralelo como controle interno da reação. A quantidade de provírus foi calculada através da razão entre o número de cópias do gene pol do HTLV-1 e o número de cópias de albumina, obedecendo à seguinte fórmula: $CPV = \frac{\text{número de cópias do HTLV-1 (gene pol)} \times 10^6}{\text{número de cópias da albumina} / 2}$. A carga proviral tem sido considerada baixa se a proporção de células mononucleares do sangue periférico infectadas é $< 1\%$, intermediária se compreendida entre 1 e 5% e alta se $> 5\%$ (GONCALVES et al., 2008). Neste estudo, para avaliar o fenótipo e a função dos CTLs de acordo com a carga proviral, os indivíduos infectados pelo HTLV-1 foram estratificados em dois grupos: $CPV < 1\%$ e $CPV \geq 1\%$.

Tabela 2 – Sequência de primers e sondas utilizados na PCR em tempo real.

Gene	Primer	Sequência (5'-3')
Pol	HTLV S	CCCTACAATCCAACCAGCTCAG
	HTLV AS	GTGGTGAAGCTGCCATCGGGTTTT
	Sonda	R-CTT TACTGACAAACCCGACCTACCCATGGA-Q
Albumina	Alb S	GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGT
	Alb AS	AAACTCATGGGAGCTGCT GGTT
	Sonda	R-CCTGTCATGCCACACAAATCTC TCC-Q

S: primer sense. AS: primer anti-sense. R: fluorocromo repórter. Q: *quencher*.

5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis foram testadas para distribuição Gaussiana, pelo teste de Shapiro-Wilk, e expressas em percentual, média, mediana, desvio padrão e intervalo interquartil. O teste não paramétrico Mann Whitney foi utilizado para comparar um parâmetro entre dois grupos. O teste *One way anova* - Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste *Dunn's Multiple Comparison*, foi utilizado para analisar possíveis diferenças entre mais de dois grupos de pacientes estudados. As correlações foram avaliadas pelo teste de correlação de Spearman. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes para valores de $p \leq 0,05$. A análise dos dados foi realizada no software GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Inc., San Diego, CA).

5.10 ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz/FIOCRUZ e aprovado sob o número de registro 307/2009. Todos os pacientes incluídos assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e foram informados sobre os procedimentos de coleta e utilização da amostra biológica, bem como sobre os riscos e benefícios do estudo (**ANEXO 2**).

6 RESULTADOS

6.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO

Foram coletadas amostras sanguíneas de treze voluntários não infectados e quarenta e nove pacientes portadores do HTLV-1, dos quais dezoito eram assintomáticos para a mielopatia (ASS), vinte e cinco tinham o diagnóstico de HAM/TSP definido (HAM-D) e seis de HAM/TSP provável (HAM-PB). Os grupos foram analisados quanto ao sexo, idade e carga proviral (**Tabela 3**). Dos sessenta e dois indivíduos incluídos neste estudo, quarenta e dois eram do sexo feminino (70%) e vinte do sexo masculino (30%). O percentual de mulheres nos grupos de indivíduos infectados (71,4%) foi maior que no grupo controle soronegativo para o HTLV-1 (53,8%) ($p=0,01$). A idade dos participantes variou entre 21 e 88 anos, com 49% dos indivíduos na faixa etária acima de 50 anos. A média de idade dos indivíduos não infectados ($40,1\pm 13,7$) foi inferior a dos indivíduos infectados ($53,86 \pm 14,54$) ($p=0,004$). Não houve diferença de idade entre os grupos de indivíduos infectados ($p=0,197$).

Tabela 3 – Características dos indivíduos incluídos nos grupos de estudo.

Grupos	Idade (anos) média \pm DP	Sexo - n(%)		Carga proviral (cópias/ 10^6 CMSP)	
		F	M	n	Mediana (IQ 25-75)
NI (n=13)	40,1 \pm 13,7	7 (53,8)	6 (46,2)	-	-
ASS (n=18)	48,7 \pm 14,1	14 (77,7)	4 (22,3)	13	13.269 (710-101.493)
HAM-D (n=25)	56,4 \pm 14,6	17 (68)	8 (32)	17	68.476 (36.008-193.465)
HAM-PB (n=6)	57,7 \pm 13,7	4 (66,7)	2 (33,3)	4	62.856 (43.024-111.792)

DP: desvio padrão. F: feminino. M: masculino. CMSP: células mononucleares do sangue periférico. IQ: intervalo interquartil. NI: indivíduos não infectados. ASS: portadores do HTLV-1 assintomáticos para mielopatia. HAM-D: pacientes com diagnóstico de HAM/TSP definido. HAM-PB: pacientes com diagnóstico de HAM/TSP provável.

A quantificação da carga proviral por PCR em tempo real foi realizada em treze indivíduos ASS, em dezessete HAM-D e em quatro HAM-PB. Em média, a carga proviral do grupo HAM-D foi cerca de duas vezes superior a do grupo assintomático. No entanto, a análise estatística realizada pelo teste de Kruskal-Wallis não revelou diferença entre os três grupos ($p=0,081$).

6.2 FREQUÊNCIA DE LINFÓCITOS T CITOTÓXICOS

A frequência da população de linfócitos T citotóxicos foi determinada pela técnica de imunofenotipagem por citometria de fluxo a partir de sangue fresco. A **Figura 13.A-B** representa os resultados das análises do percentual de CTLs no sangue periférico de doze indivíduos não infectados e quarenta e seis infectados pelo HTLV-1, sendo dezessete sem a mielopatia, vinte e três diagnosticados como HAM-D e seis como HAM-PB.

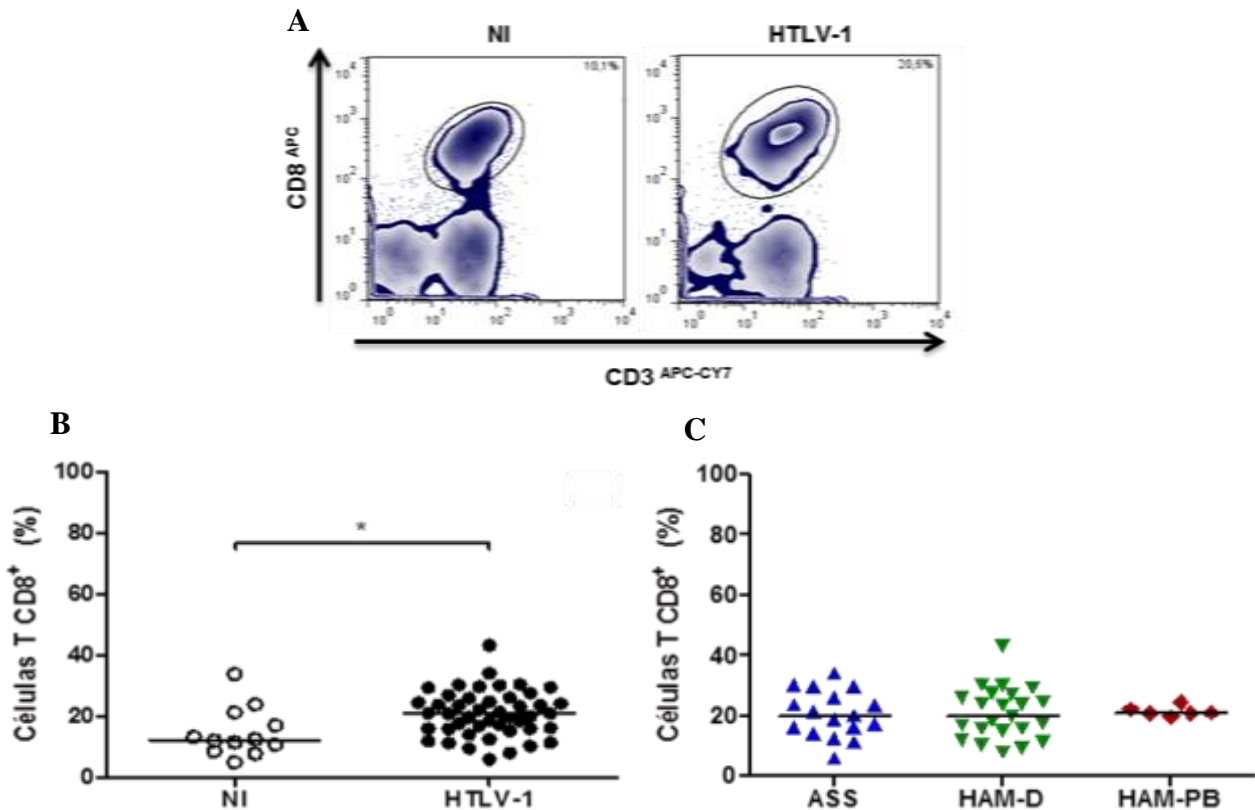


Figura 13. Frequência de linfócitos T citotóxicos. A/B) Plots representativos e gráfico da frequência de CTLs nos grupos não infectados (NI=12) e infectados (HTLV-1=46). C) Comparação da frequência de CTLs entre os grupos ASS (n=17), HAM-D (n=23) e HAM-PB (n=6). As linhas horizontais correspondem as medianas das frequências. Análise estatística realizada através dos testes de Mann-Whitney (B) e Kruskal-Wallis (C). Diferenças consideradas significantes se $p \leq 0,05$. * $p=0,016$.

Os pacientes infectados pelo HTLV-1 apresentaram uma maior quantidade de linfócitos T citotóxicos em relação aos indivíduos não infectados (aproximadamente 1,5 vezes, $p=0,016$). Os grupos HAM-D e HAM-PB apresentaram frequências semelhantes às encontradas no grupo ASS ($p>0,05$). Não foi observada diferença nas frequências destas células citotóxicas entre os indivíduos infectados com carga proviral menor e maior que 1% (dados não mostrados).

6.3 DISTRIBUIÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES DE CTLs DE MEMÓRIA

Para analisar os fenótipos de memória dos CTLs, foram conduzidos ensaios *ex vivo* de imunofenotipagem por citometria de fluxo. As subpopulações de memória avaliadas neste estudo foram caracterizadas de acordo com a expressão das moléculas CD45RA e CCR7. Enquanto os linfócitos T CD8⁺ *naive* expressam simultaneamente os dois marcadores, os de memória efetora (TEM) não apresentam nenhuma das duas moléculas. Os linfócitos T CD8⁺ de memória altamente diferenciada (TEMRA) expressam apenas CD45RA e os de memória central (TCM) o CCR7.

A **Figura 14** apresenta uma análise comparativa das diferentes subpopulações de CTLs estudadas. Foram incluídos nesta avaliação dez indivíduos não infectados e trinta e seis pacientes infectados pelo HTLV-1. Os dados mostram que os pacientes infectados por este vírus apresentam redução da frequência de CTLs *naive* ($p=0,003$) e de memória central ($p<0,0001$), bem como aumento da subpopulação de memória efetora CD45RA⁺ (TEMRA) ($p=0,03$) em relação aos indivíduos não infectados. Quanto à subpopulação TEM, não foi observada diferença estatística entre os grupos.

Nos pacientes infectados, os resultados apontam uma distribuição das populações de CTLs *naive* e de memória semelhante entre os grupos com e sem a mielopatia associada à infecção pelo HTLV-1 (**Figura 15**). No entanto, os indivíduos dos grupos HAM-D e HAM-PB apresentaram uma redução da frequência de CTLs de memória central em relação aos indivíduos não infectados. Uma redução do percentual de células T CD8⁺ *naive* também foi observada nos pacientes diagnosticados como HAM-D quando comparados ao grupo controle não infectado.

Como já foi descrito na literatura associação entre a carga proviral e o desenvolvimento da HAM/TSP (NAGAI et al., 1998), as frequências das subpopulações de memória dos CTLs foram avaliadas em função da carga proviral. Foram incluídos nesta análise vinte e quatro indivíduos infectados. Conforme demonstrado no **Apêndice 1**, a carga proviral não apresentou correlação com a frequência de CTLs *naive* ($p=-0,41$; $r=-0,17$), TCM ($p=0,72$; $r=0,08$), TEM ($p=0,07$; $r=0,37$) ou TEMRA ($p=0,31$; $r=-0,21$).

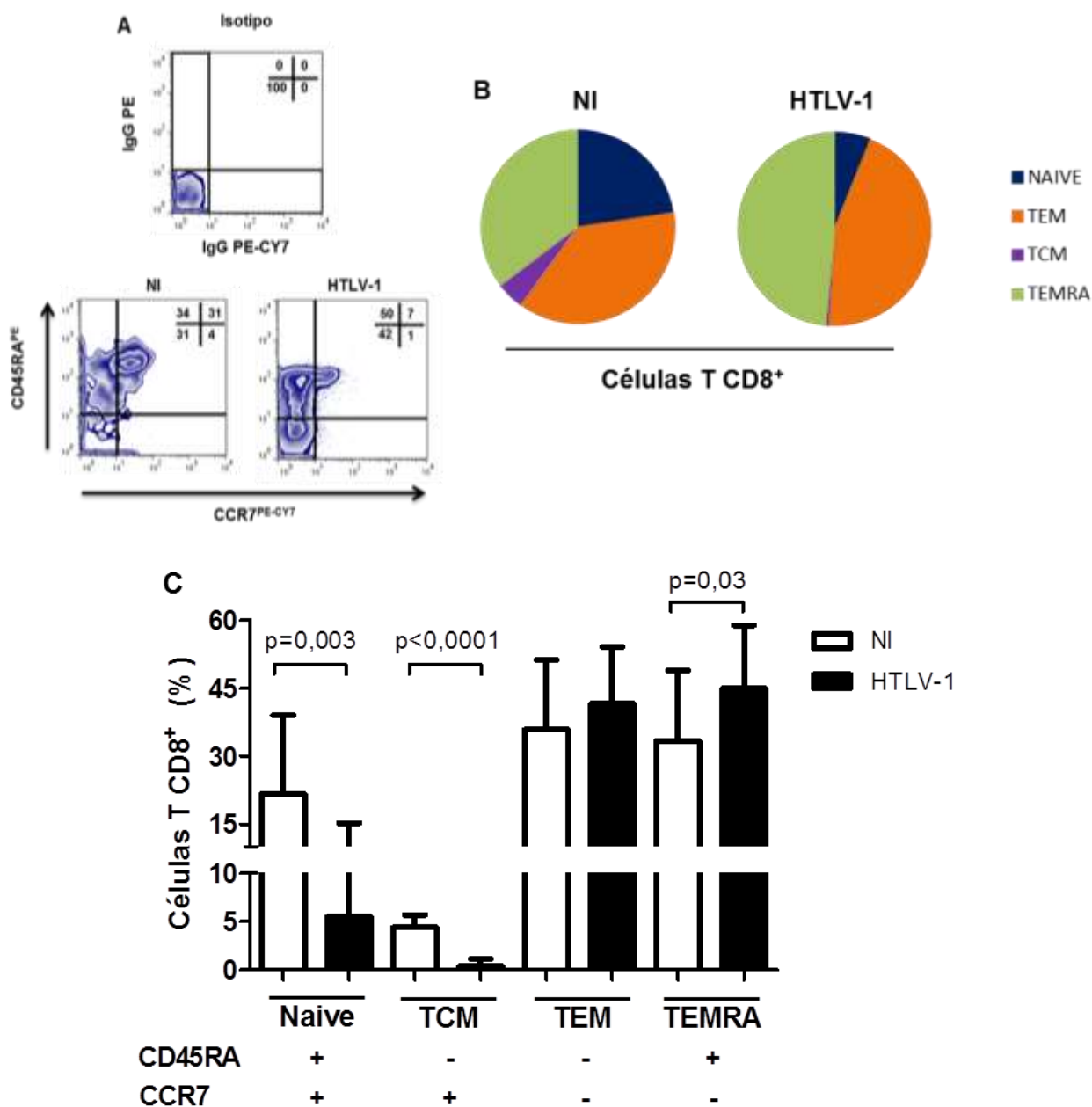
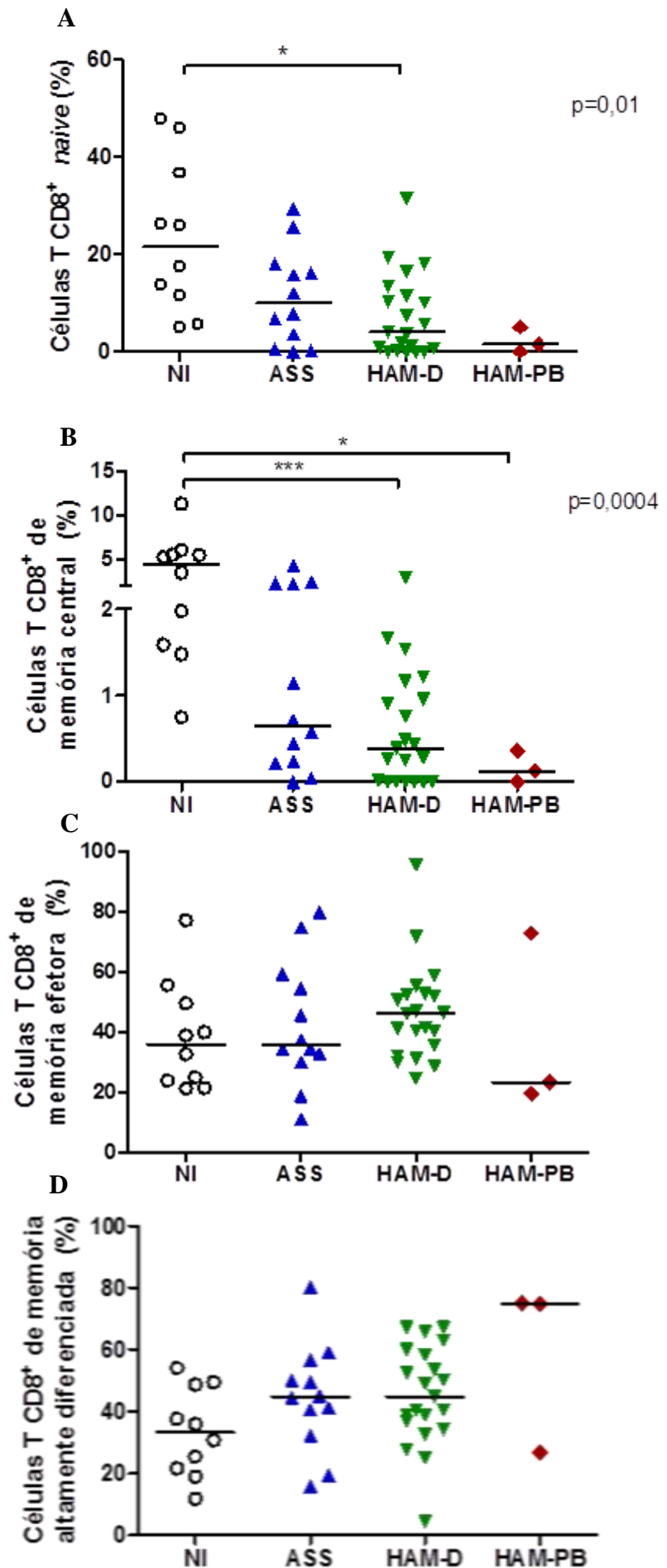


Figura 14. Distribuição das subpopulações *naive* e de memória dos CTLs de indivíduos infectados pelo HTLV-1. (A) Plots representativos das análises dos controles isotípicos e dos grupos NI (não infectado) e HTLV-1 (infectado pelo HTLV-1). (B) Distribuição das populações de linfócitos T CD8⁺ *naive*, TCM (memória central), TEM (memória efetora) e TEMRA (memória efetora altamente diferenciada) nos grupos NI e HTLV-1. (C) Análise comparativa das frequências das subpopulações de CTL *naive* e de memória entre os grupos NI e HTLV-1. As barras representam as medianas das frequências com o intervalo interquartil. Análise estatística realizada através do teste de Mann-Whitney. Diferenças consideradas significantes se $p \leq 0,05$.

Figura 15. Frequência das subpopulações *naive* e de memória dos CTLs de pacientes infectados pelo HTLV-1 com e sem mielopatia. (A) Linfócitos T CD8⁺ *naive* (CD45RA⁺CCR7⁺). (B) Linfócitos T CD8⁺ de memória central (CD45RA⁻CCR7⁺). (C) Linfócitos T CD8⁺ de memória efetora (CD45RA⁻CCR7⁻). (D) Linfócitos T CD8⁺ de memória altamente diferenciada (CD45RA⁺CCR7⁻). As linhas horizontais indicam as medianas de cada grupo. Análise estatística realizada através do teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn. Diferenças consideradas significantes se $p \leq 0,05$. * $p < 0,05$. *** $p < 0,0005$.



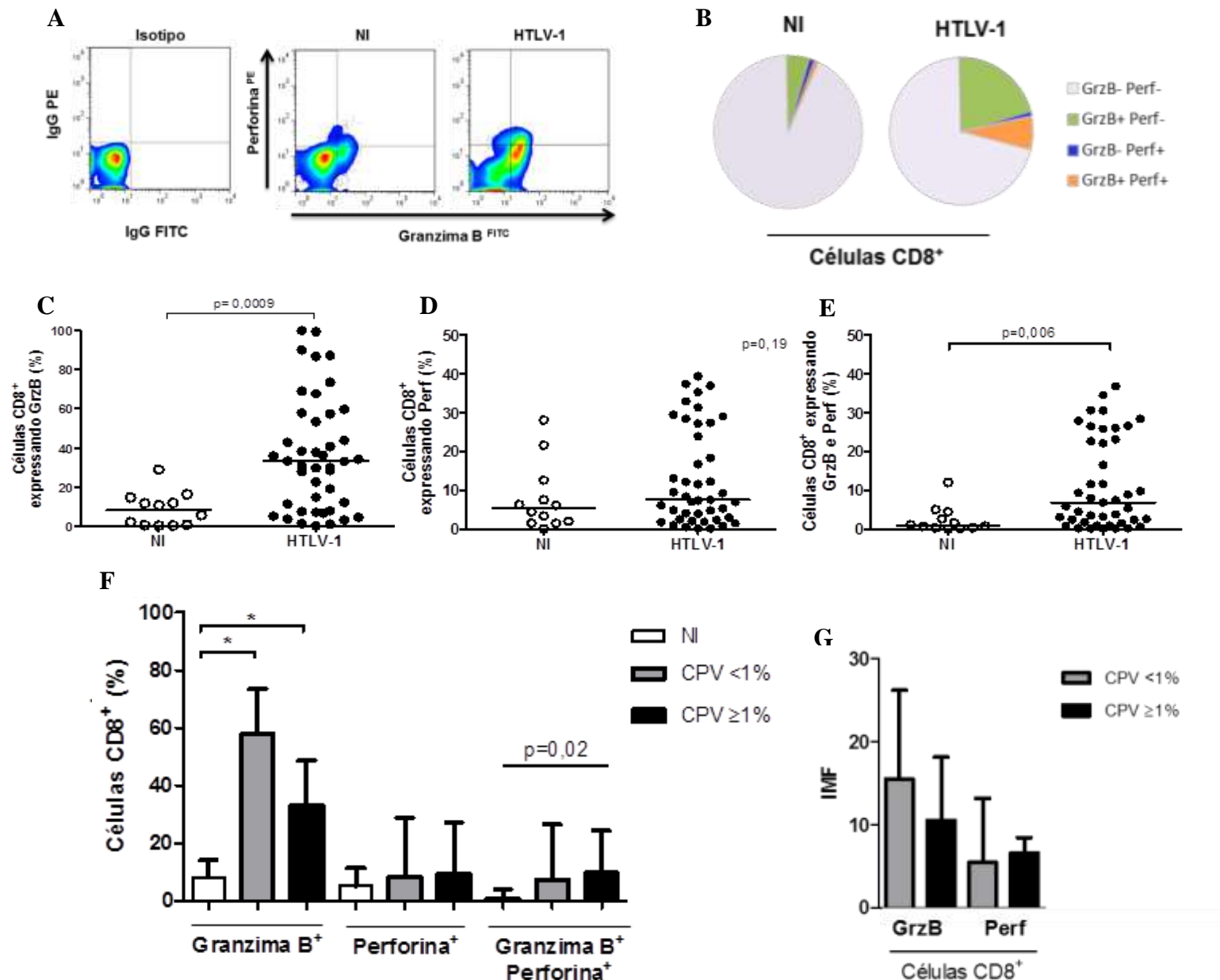
6.4 EXPRESSÃO DE PERFORINA E GRANZIMA B NAS CÉLULAS CD8⁺

As células CD8⁺ expressando os mediadores citotóxicos granzima B e perforina foram quantificadas em sangue total por citometria de fluxo. Foram avaliados 12 indivíduos não infectados e quarenta e três infectados pelo HTLV-1. Conforme exposto na **Figura 16. C-E**, a frequência de células CD8⁺ expressando granzima B foi cerca de quatro vezes maior nos pacientes infectados (33,2%) comparados aos indivíduos não infectados (8,4%, $p=0,0009$). A frequência destas células expressando perforina apresentou-se semelhante entre os grupos ($p=0,19$). Todavia, o percentual de células CD8⁺ contendo granzima B e perforina foi aproximadamente oito vezes maior nos indivíduos infectados (0,9% - 6,8%, $p=0,006$), sugerindo um aumento do potencial citotóxico.

A avaliação dos indivíduos infectados de acordo com a carga proviral evidenciou que os indivíduos categorizados no subgrupo carga proviral intermediária ou alta ($CPV \geq 1\%$) apresentam uma menor frequência de células CD8⁺ contendo granzima B, bem como uma menor expressão desta proteína, que os indivíduos com carga proviral baixa ($CPV < 1\%$), porém sem diferença estatística ($p > 0,05$, 33,2% e 57,8%, respectivamente). A expressão de perforina e o percentual de células CD8⁺ apresentando esta proteína foram semelhantes entre os dois subgrupos.

Como observado na **Figura 17. A-C**, os indivíduos infectados com diagnóstico de HAM-D ($n=24$) e HAM-PB ($n=5$) apresentaram frequências de células CD8⁺ produtoras de granzima B e de perforina equivalentes aos indivíduos infectados sem a mielopatia ($n=14$). Quando comparado ao grupo controle não infectado, o grupo ASS apresentou maior percentual de células CD8⁺ expressando granzima B ($p=0,03$) e co-expressando ambas as proteínas ($p=0,04$). Através da análise da intensidade de fluorescência, não foram verificadas diferenças significantes na expressão proteica destes mediadores citotóxicos entre os três grupos de indivíduos infectados (**Figura 17. D-E**).

Figura 16. Expressão *ex vivo* de Granzima B (GrzB) e Perforina (Perf) em células CD8⁺ de indivíduos não infectados (NI) e infectados pelo HTLV-1. Representação da análise (A) e da distribuição (B) de células CD8⁺ positivas para GrzB e Perf dos grupos NI (n=12) e HTLV-1 (n=43). (C-F) Frequência de células CD8⁺ expressando GrzB e/ou Perf. (G) Avaliação da intensidade de fluorescência (IMF) de GrzB e Perf nas células CD8⁺ de indivíduos infectados com carga proviral (CPV) menor (n=7) e igual ou maior (n=21) que 1% (10.000 cópias/10⁶ células mononucleares do sangue periférico). As linhas horizontais e as barras indicam as medianas e intervalo interquartil de cada grupo. Análise estatística realizada através dos testes de Mann-Whitney (C-E, G) e Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn (F). Diferenças consideradas significantes se $p \leq 0,05$. * $p < 0,05$.



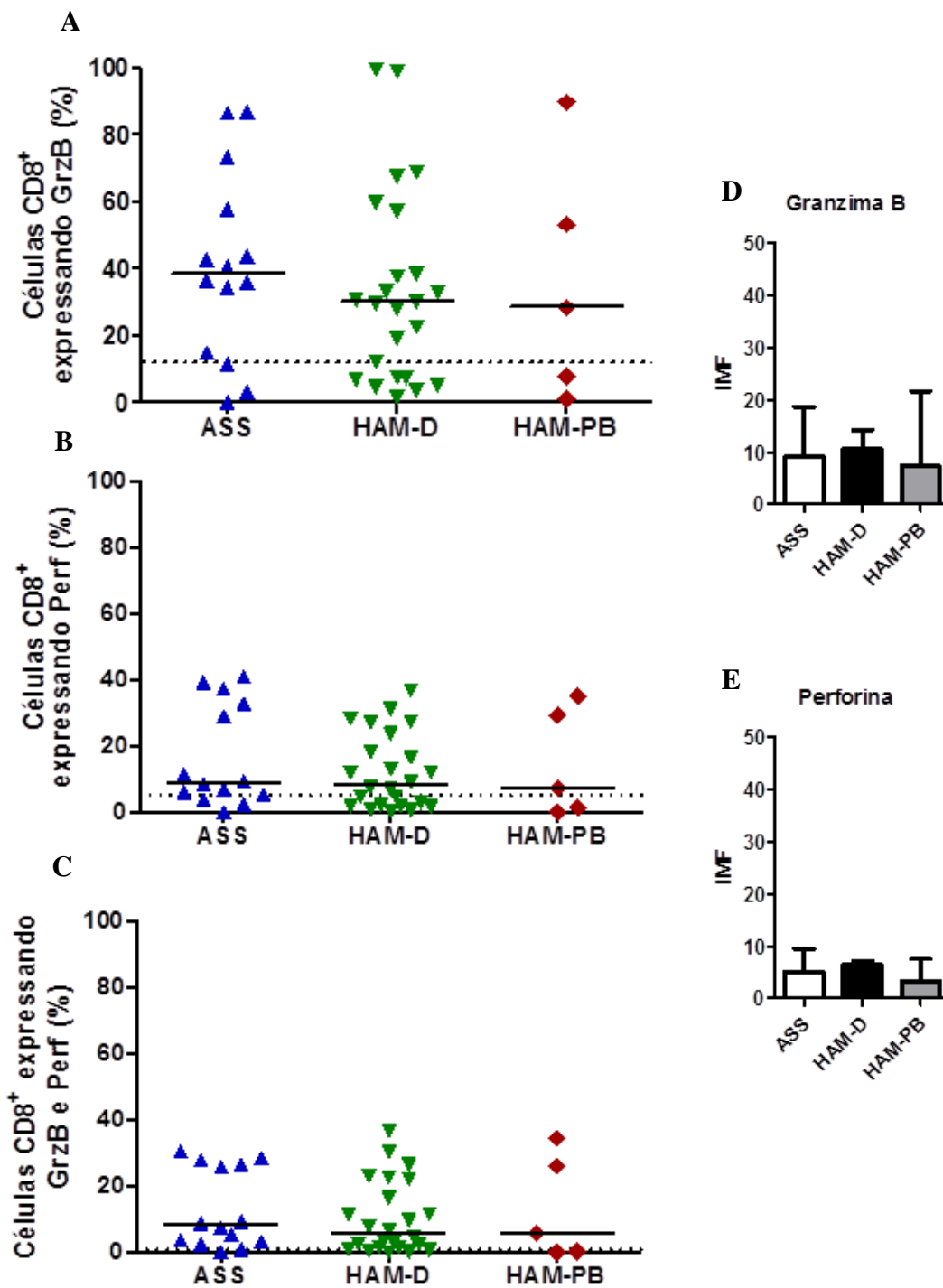


Figura 17. Expressão *ex vivo* de Granzima B (GrzB) e Perforina (Perf) em células CD8⁺ de indivíduos infectados pelo HTLV-1. Frequência de células CD8⁺ expressando GrzB (A), Perf (B) e GrzB+Perf (C). Avaliação da intensidade de fluorescência (IMF) de GrzB (D) e Perf (E) nas células CD8⁺ de indivíduos infectados sem a mielopatia (ASS=14) e com a mielopatia classificados como HAM/TSP definido (HAM-D=24) e HAM/TSP provável (HAM-PB= 5). As linhas horizontais e as barras indicam as medianas e intervalo interquartil de cada grupo. A linha pontilhada representa a mediana do grupo não infectado. Análise estatística realizada através do teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn. Diferenças consideradas significantes se $p \leq 0,05$.

6.5 AVALIAÇÃO DA DEGRANULAÇÃO RECENTE E QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE IFN- γ

Para estudar a função dos linfócitos T citotóxicos, a capacidade de degranulação e a produção intracelular de IFN- γ foram avaliadas na ausência de estímulo. A atividade de degranulação recente dos linfócitos T citotóxicos foi mensurada por citometria de fluxo através do ensaio de mobilização da molécula de CD107a (LAMP-1).

Como demonstrado na **Figura 18.B**, a mediana da frequência de CTLs expressando a molécula CD107a foi 18 vezes maior no grupo de pacientes infectados pelo HTLV-1 (n=34) comparado ao grupo de indivíduos não infectados (n=10) (p<0,0004 - 39,9% e 2,2%, respectivamente). Os indivíduos infectados também apresentaram maior percentual de CTLs produtores de IFN- γ (p=0,06) (**Figura 18.C**). Em relação aos CTLs polifuncionais (CD107a⁺IFN- γ ⁺), os pacientes infectados apresentaram em média uma frequência 248 vezes maior que a dos indivíduos não infectados (p=0,0005) (**Figura 18.D**).

Após a análise comparativa com o grupo controle não infectado, os pacientes infectados foram analisados de acordo com a carga proviral (**Figura 18. E**). Não foram constatadas diferenças estatísticas nos percentuais de CTLs CD107a⁺ ou IFN- γ ⁺ entre os grupos com carga proviral menor (n=6) e igual ou maior (n=16) que 1%. No entanto, as medianas das frequências de CTLs CD107a⁺, IFN- γ ⁺ e CD107a⁺IFN- γ ⁺ foram menores no subgrupo com CPV \geq 1%. Além disso, a expressão da molécula CD107a apresentou-se menor nos linfócitos T citotóxicos dos pacientes infectados com carga proviral igual ou maior que 1% (**Figura 18. E**).

O grupo ASS (n=14) apresentou mediana da frequência de CTLs CD107a⁺ aproximadamente 25 vezes maior que a dos indivíduos não infectados (p<0,0005) (**Figura 19. A**). Nos pacientes diagnosticados como HAM-PB (n=5), o percentual de CTLs CD107a⁺ foi semelhante ao do grupo ASS, 2,5 vezes maior que o do grupo HAM-D e 22 vezes maior que o do grupo controle não infectado. Comparando os três grupos de indivíduos infectados, não foram constatadas diferenças significativas (p>0,05, Kruskal-Wallis). No entanto, uma análise comparativa do grupo ASS com o grupo de pacientes com diagnóstico de HAM/TSP-definido (HAM-D, n=15) revelou que os indivíduos infectados com a mielopatia apresentaram uma frequência de CTLs

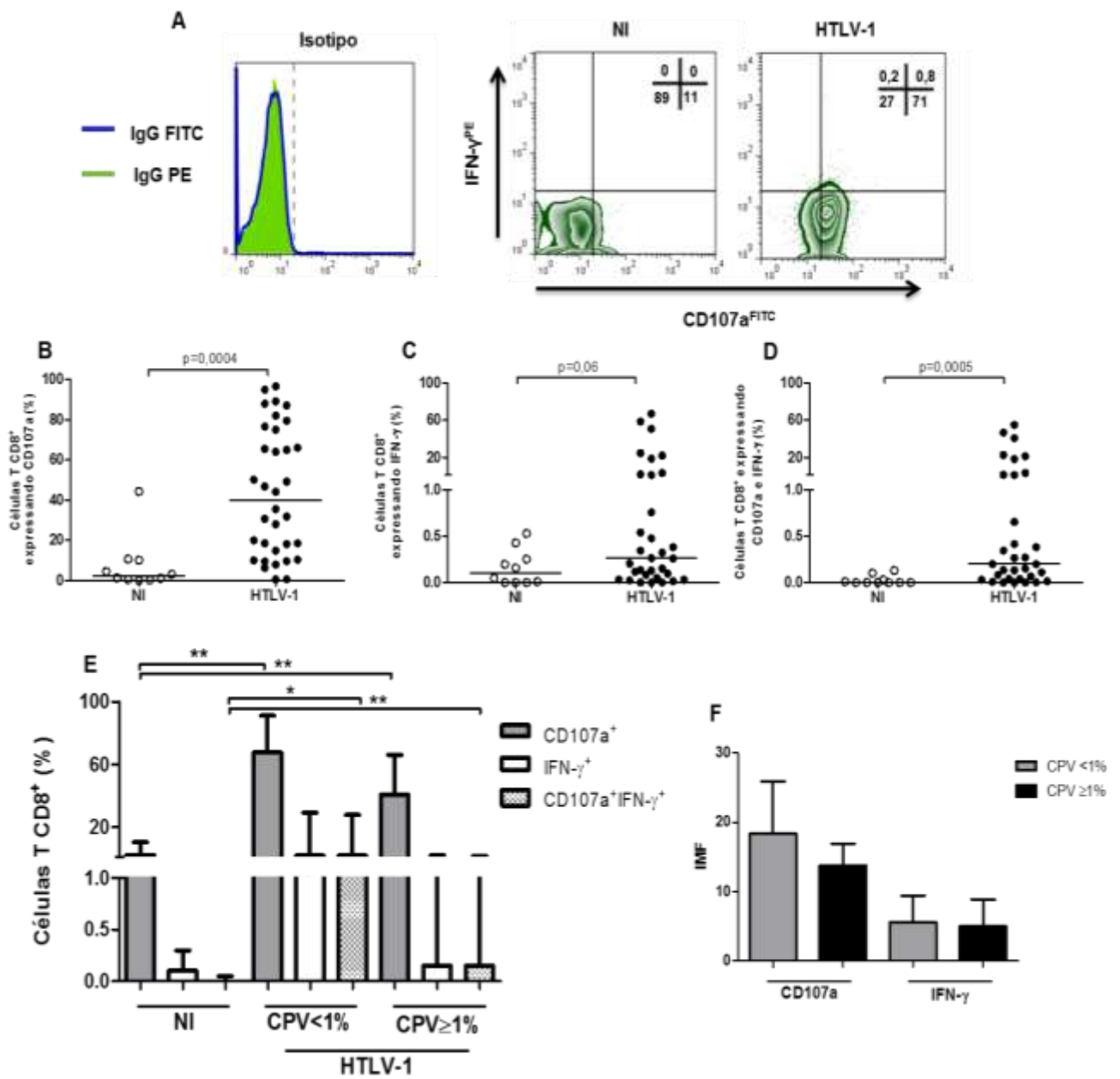


Figura 18. Degranulação espontânea e produção de IFN- γ em linfócitos T citotóxicos de indivíduos não infectados e infectados pelo HTLV-1. As células mononucleares do sangue periférico foram obtidas através do gradiente de ficoll e colocadas em cultura na ausência de estímulo extrínseco por 6 horas. A frequência de CTLs produtores de IFN- γ ou expressando CD107a foi determinada por citometria de fluxo. **(A)** Plots representativos das análises dos controles isotípicos e dos grupos NI (não infectado, n=10) e HTLV-1 (infectado pelo HTLV-1, n=34). Frequência de células T CD8⁺ expressando CD107a **(B)**, IFN- γ **(C)** e CD107a+IFN- γ **(D)**. **(E)** Comparação do percentual de CTLs CD107a⁺ e/ou IFN- γ ⁺ de indivíduos infectados com carga proviral (CPV) menor (n=6) e igual ou maior (n=16) que 1% (10.000 cópias/10⁶ células mononucleares do sangue periférico). **(F)** Avaliação da intensidade de fluorescência (IMF) de CD107a e IFN- γ nos CTLs. As linhas horizontais e as barras indicam as medianas e intervalo interquartil de cada grupo. Análise estatística realizada através dos testes de Mann-Whitney **(B-D, F)** e Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn **(E)**. Diferenças consideradas significantes se $p \leq 0,05$. * $p < 0,05$. ** $p < 0,005$.

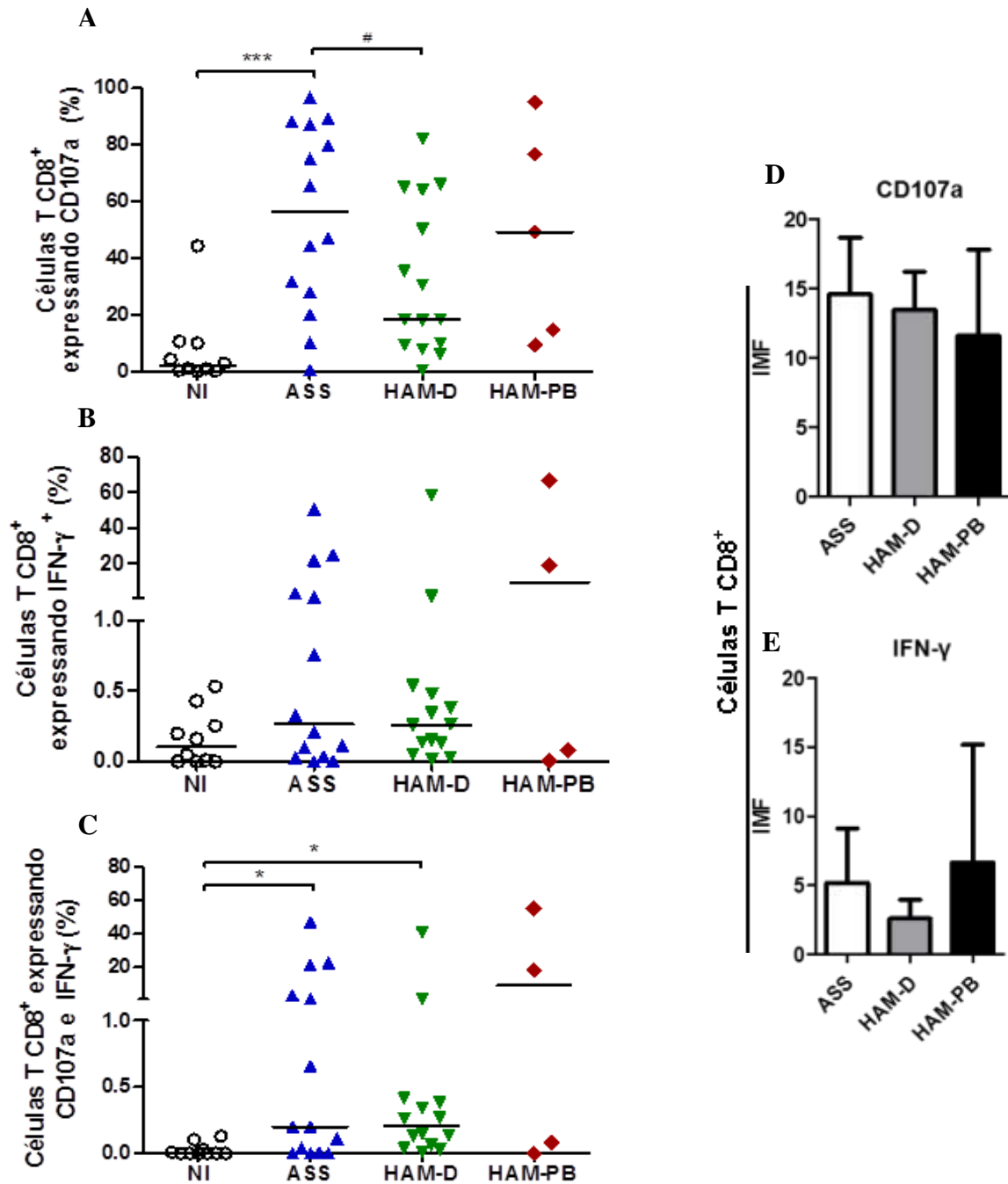


Figura 19. Degranulação espontânea e produção de IFN-γ em linfócitos T citotóxicos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 com e sem HAM/TSP. As células mononucleares do sangue periférico foram obtidas através do gradiente de ficoll e colocadas em cultura na ausência de estímulo extrínseco por 6 horas. Foram analisados 10 indivíduos não infectados, 14 ASS (infectados sem HAM/TSP), 15 HAM-D (HAM/TSP definido) e 5 HAM-PB (HAM/TSP provável). A frequência de CTLs produtores de IFN-γ ou expressando CD107a foi determinada por citometria de fluxo. (A-C) Frequência de células T CD8⁺ expressando CD107a, IFN-γ e CD107a+IFN-γ. (E) Avaliação da intensidade de fluorescência (IMF) de CD107a e IFN-γ nos CTLs dos três grupos de indivíduos infectados estudados. As linhas horizontais e as barras indicam as medianas e intervalo interquartil de cada grupo. Análise estatística realizada através do teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn. Diferenças consideradas significantes se $p \leq 0,05$. * $p < 0,05$. *** $p < 0,0005$. # Mann-Whitney, $p < 0,05$.

CD107a⁺ 3 vezes menor que a dos indivíduos infectados sem a mielopatia ($p=0,047$, Mann-Whitney). Não houve diferença na expressão da molécula CD107a nos CTLs dos três grupos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 (**FIGURA 19. D**).

Quanto à frequência de CTLs expressando IFN- γ e CD107a + IFN- γ , os quatro indivíduos do grupo HAM-PB avaliados apresentaram resultados distintos (**FIGURA 19. B-C**). Os grupos ASS e HAM-D apresentaram medianas semelhantes de linfócitos T citotóxicos produtores de IFN- γ (0,265% e 0,262%, respectivamente) e percentuais significativamente maiores de CTLs CD107a⁺IFN- γ ⁺ em relação ao grupo não infectado (0,20%, 0,21% e 0,01%, respectivamente). Como exposto na **FIGURA 19. E**, a produção de IFN- γ pelos linfócitos T citotóxicos dos pacientes HAM-D foi 2 vezes menor que a dos pacientes ASS (2,6 e 5,2, respectivamente).

6.6 EXPRESSÃO DE IL-15 EM CÉLULAS CD14⁺ E EM CMSP

Para determinar a expressão da isoforma da IL-15 de superfície na membrana dos monócitos, células mononucleares do sangue periférico foram colocadas em cultura por 5 horas e depois submetidas à marcação membranar. Foram incluídos nessa análise 11 indivíduos não infectados e 38 pacientes infectados pelo HTLV-1.

Como demonstrado na **Figura 20.B**, a frequência de células mononucleares do sangue periférico expressando IL-15 foi três vezes maior nos indivíduos infectados pelo HTLV-1 (15,2%) comparados aos controles não infectados (4,1%, $p=0,0001$). A frequência de células CD14 positivas para IL-15 também foi mais elevada no grupo de pacientes infectados por este vírus ($p=0,0005$) (**Figura 20. C**). A maioria (89%) dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 apresentou mais de 90% das células CD14 expressando a isoforma membranar da IL-15. A avaliação estratificada dos pacientes infectados de acordo com a carga proviral não revelou diferenças entre os subgrupos com a CPV menor ($n=7$) e igual ou maior ($n=21$) que 1% (**Figura 20. D**).

Os indivíduos infectados ASS ($n=14$), HAM-D ($n=18$) e HAM-PB ($n=6$) não diferiram quanto ao percentual de CMSP ou de células CD14⁺ expressando IL-15 de superfície (**Figura 21. A-B**). Estes três grupos apresentaram frequências de células positivas para IL-15 maiores que a dos indivíduos não infectados, apesar da diferença entre o grupo HAM-PB e NI não ter sido significativa. A análise da intensidade de fluorescência não revelou diferenças significativas na expressão da IL-15 nas CMSP ou nas células CD14⁺ entre os indivíduos infectados (**Figura 21. C-D**). No entanto, o grupo HAM-PB mostrou discreta redução na expressão da isoforma da citocina supracitada nas células CD14⁺ comparado aos grupos ASS e HAM-D.

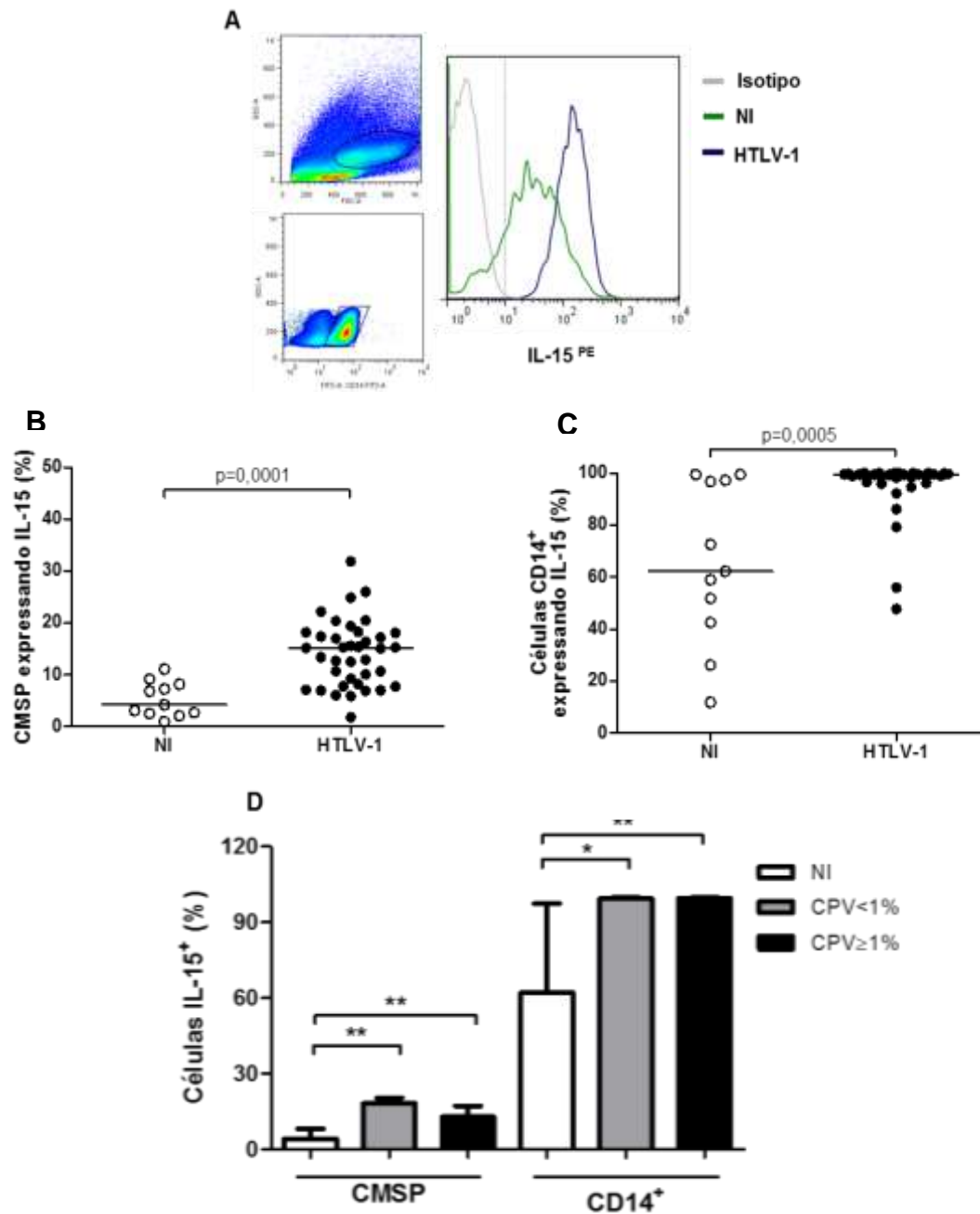


Figura 20. Expressão de IL-15 de superfície em CMSP e em células CD14⁺ de indivíduos não infectados e infectados pelo HTLV-1. As células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram obtidas através do gradiente de ficoll e colocadas em cultura sem estímulo adicional por 5 horas. Posteriormente, as células foram marcadas com anticorpos e analisadas por citometria de fluxo. Foram avaliados 11 indivíduos não infectados (NI) e 38 pacientes infectados pelo HTLV-1. (A) Representação das análises dos controles isotípicos e das células CD14⁺ IL-15⁺ dos grupos NI e HTLV-1. Percentual de CMSP (B) e de células CD14⁺ (C) expressando IL-15. (D) Comparação do percentual de células IL-15⁺ de indivíduos infectados com carga proviral (CPV) menor (n=7) e igual ou maior (n=21) que 1% (10.000 cópias/10⁶CMSP). As linhas horizontais e as barras indicam as medianas e intervalo interquartil de cada grupo. Análise estatística realizada através dos testes de Mann-Whitney (B, C) e Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn (D). Diferenças consideradas significantes se $p \leq 0,05$. * $p < 0,05$. *** $p < 0,0005$.

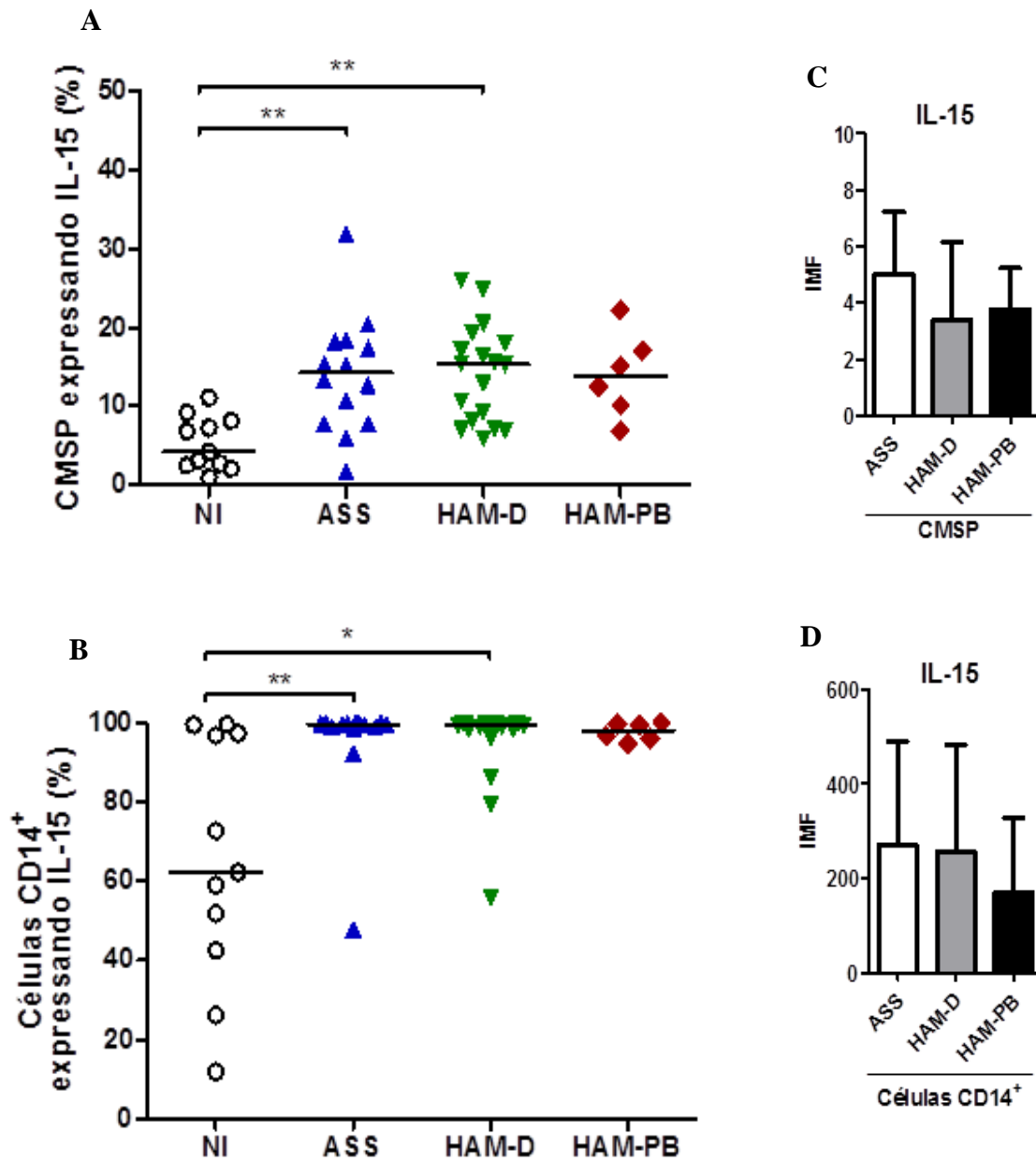


Figura 21. Expressão de IL-15 em CMSP e em células CD14⁺ de pacientes infectados pelo HTLV-1 com HAM/TSP. As células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram obtidas através do gradiente de ficoll e colocadas em cultura sem estímulo adicional por 5 horas. Posteriormente, as células foram marcadas com anticorpos e analisadas por citometria de fluxo. Foram avaliados 10 indivíduos não infectados, 14 ASS (infectados sem HAM/TSP), 18 HAM-D (HAM/TSP definido) e 6 HAM-PB (HAM/TSP provável). **(A-B)** Percentual de CMSP e de células CD14⁺ expressando IL-15. **(C-D)** Avaliação da intensidade de fluorescência (IMF) de IL-15 nas CMSP e nas células CD14⁺ dos três grupos de indivíduos infectados estudados. As linhas horizontais e as barras indicam as medianas e intervalo interquartil de cada grupo. Análise estatística realizada através do teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn. Diferenças consideradas significantes se $p \leq 0,05$. * $p < 0,05$. ** $p < 0,005$.

7. DISCUSSÃO

Os linfócitos T citotóxicos (CTLs) são células do sistema imunológico que desempenham papel importante no combate a infecções ocasionadas por patógenos intracelulares. No contexto da infecção pelo HTLV-1, estes linfócitos podem reconhecer e destruir células infectadas por este vírus, limitando a replicação viral e favorecendo o controle da carga proviral (BANGHAM; OSAME, 2005). Por outro lado, a ativação persistente destas células de defesa implica síntese e liberação de quantidades elevadas de citocinas inflamatórias, que podem contribuir para o desenvolvimento de doenças associadas à infecção pelo HTLV-1, como a HAM/TSP (JACOBSON, 2002). Diante do impasse quanto ao papel dos CTLs na patogênese da HAM/TSP, avaliamos neste estudo o fenótipo e função dos linfócitos T citotóxicos de pacientes infectados pelo HTLV-1 que desenvolveram a mielopatia. Nossos resultados apontam redução da frequência de CTLs com atividade de degranulação no grupo HAM-D comparado ao grupo infectado sem acometimento neurológico.

A diversidade de manifestações clínicas associadas à infecção pelo HTLV-1 sugere que múltiplos fatores inerentes ao hospedeiro e ao vírus estejam envolvidos no desfecho da infecção. A carga proviral elevada constitui um dos fatores preditivos para o desenvolvimento da HAM/TSP, uma vez que muitos estudos demonstram que a carga proviral é superior neste grupo quando comparado aos indivíduos infectados sem a mielopatia (GRASSI et al., 2011; NAGAI et al., 1998; OLINDO et al., 2005). Corroborando estes dados, nosso estudo demonstrou que as médias da carga proviral dos grupos HAM-D e HAM-PB foram mais elevadas que a do grupo ASS (2,2 e 1,5 vezes, respectivamente). No entanto, a ausência de um resultado estatístico significativo pode ser devido ao pequeno número de pacientes que compõe o grupo HAM-PB, pois um trabalho anterior do nosso grupo também demonstrou que os pacientes infectados com diagnóstico de HAM/TSP provável e definido possuíam carga proviral superior a dos portadores do vírus sem a mielopatia (GRASSI et al., 2011).

Ao mensurarmos o percentual de células T CD8⁺ circulantes no sangue periférico, verificamos que a frequência destes linfócitos nos pacientes infectados foi significativamente maior que a observada nos indivíduos soronegativos. A análise comparativa entre os grupos de indivíduos infectados com e sem a mielopatia não demonstrou diferenças quanto à frequência de CTLs, ratificando dados de outro trabalho realizado em nosso país (SOUZA,

2009). Contrapondo este achado, o estudo conduzido por Brito-Melo e colaboradores mostrou aumento do percentual de linfócitos T CD8⁺ nos pacientes com HAM/TSP comparados aos oligoassintomáticos, assintomáticos para a mielopatia e soronegativos para o HTLV-1 (BRITO-MELO et al., 2002). O aumento observado da população de CTLs nos pacientes infectados pelo retrovírus possivelmente reflete consequência da contínua estimulação característica da infecção pelo HTLV-1, que desencadeia ativação e expansão de células do sistema imune (AZRAN et al., 2004). No entanto, em nosso estudo, esta alteração quantitativa de CTLs não foi associada à presença de sintomas neurológicos ou à carga proviral.

As células T CD8⁺ periféricas podem ser classificadas como células *naive* (virgens), efetoras ou de memória com base na expressão de marcadores de superfície específicos e na resposta a antígenos durante a exposição primária ou secundária (JANEWAY et al., 2006). Os linfócitos T de memória são heterogêneos e compreendem subpopulações distintas quanto ao fenótipo e função efetora. Neste estudo, avaliamos o impacto da infecção pelo HTLV-1 na distribuição das populações de memória dos CTLs, considerando a classificação baseada na capacidade de deslocamento para os órgãos linfoides, proliferação, produção citocinas e na citotoxicidade (GEGINAT et al., 2003; SALLUSTO et al., 2004; SALLUSTO et al., 1999). De acordo com a expressão das moléculas CCR7 e CD45RA, investigamos os percentuais das subpopulações de CTLs *naive* e de memória central (TCM), efetora (TEM) e terminalmente diferenciada (TEMRA). Nos indivíduos soronegativos para o HTLV-1, a subpopulação de maior frequência foi a TEM, seguida da TEMRA, *naive* e TCM. Como demonstrado na sessão resultados, a infecção pelo HTLV-1 promoveu expansão das subpopulações de CTLs TEMRA e TEM em detrimento das subpopulações *naive* e TCM, semelhante à distribuição fenotípica de memória dos CTLs específicos relatada na infecção pelo Citomegalovírus e pelo HTLV-2 (CHAMPAGNE et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2009). Este resultado já era esperado, pois a estimulação antigênica persistente em infecções crônicas influencia diretamente na expansão de células T CD8⁺ efetoras e de memória efetora. Um estudo conduzido nos Estados Unidos demonstrou aumento do percentual de CTLs TEM e TEMRA nos pacientes infectados pelo HTLV-1 com HAM/TSP comparados a indivíduos não infectados (JOHNSON-NAUROTH et al., 2006). Aqui, nós ratificamos a frequência elevada do fenótipo TEM nos CTLs do grupo HAM-D comparado ao grupo não infectado e propomos que a predominância de CTLs de memória efetora terminalmente diferenciada está relacionada à infecção pelo HTLV-1, independente da presença de danos neurológicos.

Como o principal mecanismo efetor dos CTLs é a citotoxicidade mediada por grânulos líticos, avaliamos o percentual destas células produtoras de granzima B e perforina, bem como a expressão proteica destes dois mediadores citotóxicos. Os indivíduos infectados com carga proviral intermediária ou alta ($CPV \geq 1\%$) apresentaram menor percentual de linfócitos T $CD8^+$ produtores de granzima B e menor expressão proteica deste mediador em relação aos pacientes infectados com carga proviral baixa ($CPV < 1\%$). Estes achados são concordantes com os resultados de um estudo conduzido no México sobre expressão de genes de linfócitos T citotóxicos de pacientes infectados pelo HTLV-1. Neste trabalho, foi descrita hiperexpressão de genes que codificam proteínas envolvidas na lise mediada por estes linfócitos em pacientes infectados com baixa carga proviral (VINE et al., 2004). A partir destes dados, os autores sugeriram que uma forte resposta imune mediada por CTLs estava associada à diminuição da carga proviral. Outro estudo conduzido no continente Americano revelou diminuição da expressão de perforina em CTLs de indivíduos infectados pelo HTLV-1 em relação aos controles soronegativos para este retrovírus (SABOURI et al., 2008). Estes autores descreveram também diminuição da expressão deste mediador citotóxico nos pacientes infectados pelo HTLV-1 acometidos pela HAM/TSP comparados aos portadores do vírus sem a mielopatia. Todavia, um trabalho realizado por Malta e colaboradores, em São Paulo, demonstrou aumento da expressão de granzima B e perforina nos CTLs do grupo HAM/TSP comparado ao grupo infectado sem a mielopatia, bem como aumento da quantidade de CTLs produtores de granzima B nos pacientes infectados em relação aos controles soronegativos para o HTLV (MALTA et al., 2013). Este último dado referente à frequência de linfócitos T $CD8^+$ produtores de granzima B é concordante com nossos resultados, os quais revelam ainda que não existem diferenças na expressão dos mediadores de citotoxicidade avaliados entre os grupos ASS, HAM-D e HAM-PB, contrastando os dados dos trabalhos citados anteriormente.

No que concerne ao aspecto funcional dos CTLs, além da mensuração *ex vivo* de granzima B e perforina, avaliamos a atividade de degranulação recente e a capacidade de produção de $IFN-\gamma$. A degranulação de células T $CD8^+$ ativadas ocorre rapidamente após a estimulação do TCR como um resultado da mobilização polarizada dos microtúbulos que transportam os grânulos líticos para a região da sinapse formada entre a célula efetora e a célula alvo (BARRY; BLEACKLEY, 2002). Esta atividade de degranulação foi analisada através do ensaio de mobilização da molécula CD107a, que indica fusão de vesículas com a membrana plasmática ocasionada pela secreção de moléculas efetoras como a perforina e a

granzima B, implicando atividade citotóxica recente destas células. Os indivíduos infectados com carga proviral maior que 1% apresentaram discreta redução da frequência de CTLs positivos para CD107a, bem como diminuição da expressão desta molécula na membrana plasmática. Este achado é condizente com o relato da hipoexpressão de genes que codificam mediadores citotóxicos em indivíduos infectados com carga proviral elevada (VINE et al., 2004). Quanto à análise dos indivíduos infectados com e sem a mielopatia, os resultados sugerem que os CTLs dos pacientes HAM-D degranulam com maior intensidade, pois neste grupo foi observada uma diminuição da frequência de CTLs CD107a⁺, em relação ao grupo ASS, com expressão equivalente da proteína aos demais grupos. No Japão, um estudo conduzido por Sabouri e colaboradores evidenciou redução dos linfócitos T citotóxicos específicos para o HTLV-1 positivos para CD107a nos pacientes com HAM/TSP comparados aos infectados sem sintomas neurológicos (SABOURI et al., 2008). Estes autores demonstraram ainda que esta alteração na degranulação não estava associada à carga proviral, uma vez que o resultado se manteve quando foram avaliados pacientes com a carga proviral pareada. De forma complementar, nosso estudo demonstrou pela primeira vez que ocorre redução da população total de células T citotóxicas com atividade de degranulação nos pacientes HAM-D em relação aos infectados sem a mielopatia.

A secreção de citocinas inflamatórias, como IFN- γ , configura outro mecanismo efetor dos CTLs. Como a infecção pelo HTLV-1 promove ativação celular e conseqüentemente superprodução de citocinas inflamatórias, investigamos a capacidade de síntese de IFN- γ pelos CTLs de indivíduos infectados por este vírus. Nossos resultados sugerem que as células T CD8⁺ dos pacientes HAM-D expressam uma quantidade menor de IFN- γ em relação ao grupo ASS. Confrontando este achado, outro estudo conduzido na cidade de Salvador reportou que a produção de citocinas inflamatórias, incluindo IFN- γ , por linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ foi superior nos pacientes com HAM/TSP comparados aos indivíduos infectados sem danos neurológicos (SANTOS et al., 2004). Esta discrepância nos resultados de indivíduos de uma mesma região geográfica pode ter sido ocasionada por diferenças metodológicas. Além do tempo de cultura superior, estes autores avaliaram apenas quatro indivíduos com HAM/TSP. Reiterando o resultado da análise de granzima B, o grupo com carga proviral acima de 1% apresentou uma quantidade menor de células T CD8⁺ polifuncionais (CD107a⁺IFN- γ ⁺) e produtoras de IFN- γ em relação ao grupo com carga proviral abaixo de 1%. Estes dados sugerem disfunção dos CTLs diante da carga proviral elevada. Em nosso estudo, mostramos ainda que os indivíduos infectados pelo HTLV-1 possuem quantidade de

CTLs polifuncionais CD107a⁺IFN- γ ⁺ superior a dos controles soronegativos para este vírus. Contudo, Manuel e colaboradores não relataram diferenças entre os indivíduos infectados e não infectados (MANUEL et al., 2013). Além disso, evidenciamos que os grupos ASS e HAM-D apresentam quantidades análogas de CTLs polifuncionais CD107a⁺IFN- γ ⁺. Corroborando estes dados, Manuel e colaboradores documentaram que a HAM/TSP não configurava um fator modificante da frequência de CTLs CD107a⁺IFN- γ ⁺ (MANUEL et al., 2013). Por outro lado, já foi descrito na literatura que os indivíduos infectados sem a mielopatia apresentam redução do percentual de células T CD8⁺ polifuncionais CD107a⁺IFN- γ ⁺ em relação aos pacientes com HAM/TSP (ENOSE-AKAHATA et al., 2008). Porém, vale destacar que o tempo de cultura celular utilizado nesse trabalho foi superior ao estabelecido em nosso protocolo experimental. Quanto ao grupo HAM-PB, a interpretação do resultado da análise comparativa com os demais grupos torna-se inexecutável porque os quatro indivíduos avaliados foram bastante heterogêneos quanto ao parâmetro estudado.

A ativação e expansão dos linfócitos T citotóxicos são moduladas positivamente pela interleucina 15 (IL-15) (FEHNIGER; CALIGIURI, 2001; WALDMANN; DUBOIS; TAGAYA, 2001). A interação desta citocina com seu receptor presente na membrana dos CTLs desencadeia efeitos semelhantes aos que sucedem o reconhecimento do antígeno via complexo TCR-CD3. Deste modo, a IL-15 exerce papel relevante na manutenção das células de memória e na produção dos grânulos citotóxicos (LIU et al., 2002). Neste trabalho, foi avaliada a expressão da isoforma de superfície da IL-15 em células CD14⁺ e em células mononucleares do sangue periférico. Os pacientes infectados pelo HTLV-1 apresentaram aumento de CMSP e de células CD14⁺ expressando IL-15, bem como maior expressão desta isoforma da citocina em relação aos controles não infectados. Os grupos de pacientes infectados não diferiram quanto ao percentual de células expressando IL-15. Estes achados são discordantes dos resultados de um estudo realizado nos Estados Unidos, o qual reportou aumento da frequência de células CD14⁺ expressando a isoforma membranar da IL-15 em pacientes HAM/TSP comparados aos assintomáticos (ENOSE-AKAHATA et al., 2008). Vale destacar que nesse trabalho os autores avaliaram apenas três indivíduos de cada grupo e verificaram a expressão da citocina em células CD14⁺ previamente isoladas. Entendendo o sistema imune como uma rede de sinalizações, em nosso estudo realizamos a mensuração da citocina a partir de culturas não estimuladas de células mononucleares do sangue periférico com o intuito de minimizar as alterações no ambiente e mimetizar as condições *in vivo*. Em nosso estudo, entendemos que o aumento do percentual de células positivas para IL-15 é uma

consequência da infecção pelo HTLV-1, pois não está associado ao desenvolvimento da HAM/TSP. Outro estudo conduzido nos Estados Unidos evidenciou que os monócitos de pacientes com HAM/TSP estão mais ativados do que os dos indivíduos assintomáticos e controles não infectados (ENOSE-AKAHATA et al., 2012). A adição de um inibidor de fagócitos mononucleares, a minociclina, diminuiu a produção de citocinas, como TNF- α e IL-1 β , pelas células CD14⁺, modulando negativamente a proliferação espontânea de células T CD8⁺ e a produção de IFN- γ por estas células apenas em pacientes com HAM/TSP. Apesar de não ter sido avaliada a citocina IL-15, os autores demonstraram que a inibição da função de fagócitos mononucleares atenua a atividade dos linfócitos T citotóxicos dos pacientes com HAM/TSP, sugerindo uma susceptibilidade maior dos CTLs destes pacientes a ação das citocinas produzidas pelas células CD14⁺ (ENOSE-AKAHATA et al., 2012). Destarte, esta susceptibilidade pode estar associada à expressão diferencial de receptores de IL-15 nos CTLs entre os indivíduos infectados.

A estimulação antigênica persistente pode induzir exaustão dos CTLs na infecção pelo HTLV-1, assim como demonstrado em outras infecções crônicas (DAY et al., 2006; GOLDEN-MASON et al., 2009). O estado de exaustão pode ser caracterizado pelo comprometimento funcional e aumento de moléculas co-inibitórias modulando negativamente a resposta à infecção (JIN et al., 2010). Este assunto tem gerado debates entre os especialistas da área, uma vez que os resultados publicados sobre os linfócitos T citotóxicos são controversos. Nos indivíduos HAM/TSP, foi reportado que os linfócitos T citotóxicos específicos para a proteína viral Tax expressam níveis reduzidos de TIM-3, imunoglobulina de membrana de células T, comparado aos indivíduos infectados sem a mielopatia (NDHLOVU et al., 2011). O aumento da expressão de TIM-3 em CTLs já foi descrito em infecções virais crônicas, como HIV, e associado à redução da capacidade proliferativa e da produção de citocinas do perfil Th1, características do estado de exaustão (JONES et al., 2008). A expressão reduzida de TIM-3 nos indivíduos com HAM/TSP poderia estar associada a um estado de maior ativação dos linfócitos T citotóxicos específicos para o HTLV-1, corroborando a contribuição destas células no desenvolvimento de patologias associadas à infecção por este retrovírus. Por outro lado, Manuel e colaboradores demonstraram que a expressão de PD-1 nos CTLs, outro marcador de exaustão celular, está correlacionada diretamente com a carga proviral nos indivíduos infectados pelo HTLV-1 (MANUEL et al., 2013). Estes autores evidenciaram aumento da expressão desta molécula nos linfócitos T CD8⁺ do grupo HAM/TSP, após estímulo com Tax, comparado aos pacientes infectados sem

a mielopatia. Assim, os CTLs do grupo HAM/TSP estariam em um estado de exaustão, condição que corroboraria a redução da quantidade de CTLs com atividade de degranulação observada em nosso trabalho. Estudos futuros devem ser realizados para avaliar a eficiência da atividade de degranulação nos CTLs específicos para o HTLV-1 e para investigar a expressão de marcadores de exaustão, bem como receptores de citocinas e moléculas de superfície de ativação e de inibição presentes nos CTLs.

Em nosso estudo, todos os experimentos foram realizados a partir de sangue fresco, diferindo de muitos dos trabalhos da área. Este é um ponto importante do nosso trabalho, uma vez que o processo de criopreservação de células pode modificar o fenótipo e o metabolismo celular. A pequena quantidade de pacientes no grupo HAM-PB representa uma das nossas principais limitações, pois não permitiu a comparação de algumas variáveis estudadas com os demais grupos. Como exposto na sessão resultados, os indivíduos infectados pelo HTLV-1 apresentam variabilidade expressiva em relação a alguns parâmetros mensurados. Assim, a análise de um número maior de pacientes permitiria uma caracterização mais fidedigna dos linfócitos T citotóxicos do grupo HAM-PB. Além disso, estudos longitudinais poderiam auxiliar melhor na compreensão da resposta imune, em especial dos CTLs, na infecção pelo HTLV-1 e no desenvolvimento da HAM/TSP.

8. SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Comparados aos indivíduos não infectados, os pacientes infectados pelo HTLV-1 apresentaram:

- ✓ Maior frequência de linfócitos T citotóxicos;
- ✓ Aumento da proporção das subpopulações de CTL de memória efetora (TEM e TEMRA) e diminuição das subpopulações *naive* e de memória central;
- ✓ Aumento do percentual de CTLs GrzB⁺ e GrzB⁺PERF⁺;
- ✓ Aumento do percentual de CTLs CD107a⁺ e/ou IFN- γ ⁺;
- ✓ Aumento da quantidade de células mononucleares de sangue periférico e CD14⁺ expressando a isoforma de superfície da IL-15.

Comparados aos indivíduos infectados pelo HTLV-1 sem a mielopatia, os pacientes diagnosticados como HAM/TSP definido apresentaram:

- ✓ Maior proporção de CTLs de memória efetora e redução da subpopulação *naive*;
- ✓ Redução significativa da proporção de CTLs com atividade de degranulação;
- ✓ Diminuição da expressão de IFN- γ pelos CTLs.

9. CONCLUSÃO

Nossos resultados evidenciam que a infecção pelo HTLV-1 induz ativação dos linfócitos T CD8⁺ e sugerem que os pacientes infectados por este retrovírus com diagnóstico de HAM/TSP definido apresentam resposta imune celular deficiente à infecção pelo HTLV-1 devido a redução do potencial citotóxico, refletido pela diminuição da quantidade de linfócitos T CD8⁺ com atividade de degranulação em relação aos indivíduos infectados sem a mielopatia.

10. PERSPECTIVAS

- Ampliar o número de pacientes com diagnóstico de HAM/TSP provável;
- Avaliar a atividade lítica dos linfócitos T citotóxicos específicos para o HTLV-1 e correlacionar com a carga proviral;
- Analisar os mecanismos de modulação da citotoxicidade e quantificar a produção de mediadores citotóxicos pelos CTLs;
- Investigar a presença de marcadores de exaustão celular nos CTLs;
- Estudar o papel de outras células com atividade citotóxica na resposta imune à infecção pelo HTLV-1.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 6ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

AHMED, R.; GRAY, D. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. **Science**, v. 272, n. 5258, p. 54-60, 1996.

AKTAS, E. et al. Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. **Cellular immunology**, v. 254, n. 2, p. 149-154, 2009.

ANTHONY, D. A. et al. Functional dissection of the granzyme family: cell death and inflammation. **Immunol Rev**, v. 235, n. 1, p. 73-92, May 2010.

ARAUJO, A. Q.; SILVA, M. T. The HTLV-1 neurological complex. **Lancet Neurol**, v. 5, n. 12, p. 1068-76, 2006.

AROSA, F. A.; CARDOSO, E. M.; PACHECO, F. C. Linfócitos T. In: (Ed.). **Fundamentos de Imunologia**. 1ª edição. Lisboa: Lidel, 2006. p.376.

ASQUITH, B.; BANGHAM, C. R. Quantifying HTLV-I dynamics. **Immunol Cell Biol**, v. 85, n. 4, p. 280-6, Jun 2007.

ASQUITH, B. et al. A functional CD8+ cell assay reveals individual variation in CD8+ cell antiviral efficacy and explains differences in human T-lymphotropic virus type 1 proviral load. **J Gen Virol**, v. 86, n. Pt 5, p. 1515-23, May 2005.

AZIMI, N. et al. Human T cell lymphotropic virus type I Tax protein trans-activates interleukin 15 gene transcription through an NF- κ B site. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 5, p. 2452-2457, March 3, 1998 1998.

AZIMI, N. et al. Immunostimulation by induced expression of NKG2D and its MIC ligands in HTLV-1-associated neurologic disease. **Immunogenetics**, v. 58, n. 4, p. 252-8, May 2006.

AZRAN, I.; SCHAVINSKY-KHRAPUNSKY, Y.; ABOUD, M. Role of Tax protein in human T-cell leukemia virus type-I leukemogenicity. **Retrovirology**, v. 1, p. 20, 2004.

BALAJI, K. N. et al. Surface cathepsin B protects cytotoxic lymphocytes from self-destruction after degranulation. **J Exp Med**, v. 196, n. 4, p. 493-503, 2002.

BALLARD, D. W. et al. HTLV-I tax induces cellular proteins that activate the kappa B element in the IL-2 receptor alpha gene. **Science**, v. 241, n. 4873, p. 1652-5, 1988.

BALTIMORE, D. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. **Nature**, v. 226, n. 5252, p. 1209-11, 1970.

BANERJEE, P.; FEUER, G.; BARKER, E. Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) p12I down-modulates ICAM-1 and -2 and reduces adherence of natural killer cells, thereby protecting HTLV-1-infected primary CD4+ T cells from autologous natural killer cell-mediated cytotoxicity despite the reduction of major histocompatibility complex class I molecules on infected cells. **J Virol**, v. 81, n. 18, p. 9707-17, 2007.

BANGHAM, C. R. HTLV-1 infections. **Journal of Clinical Pathology**, v. 53, n. 8, p. 581-586, 2000.

BANGHAM, C. R. The immune control and cell-to-cell spread of human T-lymphotropic virus type 1. **J Gen Virol**, v. 84, n. Pt 12, p. 3177-89, Dec 2003.

BANGHAM, C. R. CTL quality and the control of human retroviral infections. **Eur J Immunol**, v. 39, n. 7, p. 1700-12, Jul 2009.

BANGHAM, C. R.; OSAME, M. Cellular immune response to HTLV-1. **Oncogene**, v. 24, n. 39, p. 6035-46, Sep 2005.

BARMAK, K.; HARHAJ, E. W.; WIGDAHL, B. Mediators of central nervous system damage during the progression of human T-cell leukemia type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **J Neurovirol**, v. 9, n. 5, p. 522-9, Oct 2003.

BARRY, M.; BLEACKLEY, R. C. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. **Nat Rev Immunol**, v. 2, n. 6, p. 401-9, 2002.

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

BIDDISON, W. E. et al. Human T cell leukemia virus type I (HTLV-I)-specific CD8+ CTL clones from patients with HTLV-I-associated neurologic disease secrete proinflammatory cytokines, chemokines, and matrix metalloproteinase. **J Immunol**, v. 159, n. 4, p. 2018-25, Aug 1997.

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

- BIRD, C. H. et al. Selective regulation of apoptosis: the cytotoxic lymphocyte serpin proteinase inhibitor 9 protects against granzyme B-mediated apoptosis without perturbing the Fas cell death pathway. **Mol Cell Biol**, v. 18, n. 11, p. 6387-98, 1998.
- BISWAS, H. et al. Neurologic abnormalities in HTLV-I–and HTLV-II–infected individuals without overt myelopathy. **Neurology**, v. 73, n. 10, p. 781-789, 2009.
- BITTENCOURT, A. L. et al. Adult T-cell leukemia/lymphoma in Bahia, Brazil: analysis of prognostic factors in a group of 70 patients. **Am J Clin Pathol**, v. 128, n. 5, p. 875-82, 2007.
- BITTENCOURT, A. L. et al. Adult-onset infective dermatitis associated with HTLV-I. Clinical and immunopathological aspects of two cases. **Eur J Dermatol**, v. 16, n. 1, p. 62-6, 2006.
- BOLITHO, P. et al. Apoptosis induced by the lymphocyte effector molecule perforin. **Curr Opin Immunol**, v. 19, n. 3, p. 339-47, 2007.
- BRITO-MELO, G. E. et al. Phenotypic study of peripheral blood leucocytes in HTLV-I-infected individuals from Minas Gerais, Brazil. **Scand J Immunol**, v. 55, n. 6, p. 621-8, 2002.
- BRITO-MELO, G. E. et al. IL-10 produced by CD4+ and CD8+ T cells emerge as a putative immunoregulatory mechanism to counterbalance the monocyte-derived TNF-alpha and guarantee asymptomatic clinical status during chronic HTLV-I infection. **Clin Exp Immunol**, v. 147, n. 1, p. 35-44, 2007.
- BUGGAGE, R. R. Ocular manifestations of human T-cell lymphotropic virus type 1 infection. **Curr Opin Ophthalmol**, v. 14, n. 6, p. 420-5, 2003.
- BURKETT, M. W. et al. A Novel Flow Cytometric Assay for Evaluating Cell-Mediated Cytotoxicity. **Journal of Immunotherapy**, v. 28, n. 4, p. 396-402, 2005.
- CALATTINI, S. et al. New strain of human T lymphotropic virus (HTLV) type 3 in a Pygmy from Cameroon with peculiar HTLV serologic results. **Journal of Infectious Diseases**, v. 199, n. 4, p. 561-564, 2009.
- CALATTINI, S. et al. Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. **Retrovirology**, v. 2, n. 1, p. 30, 2005.
- CARNEIRO-PROIETTI, A. B. F. et al. Infection and disease caused by the human T cell lymphotropic viruses type I and II in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 5, p. 499-508, 2002.

- CARVALHO, E. M. et al. Cytokine profile and immunomodulation in asymptomatic human T-lymphotropic virus type 1-infected blood donors. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 27, n. 1, p. 1-6, 2001.
- CASTRO-LIMA VARGENS, C. et al. Keratoconjunctivitis sicca of human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) infected individuals is associated with high levels of HTLV-1 proviral load. **J Clin Virol**, v. 52, n. 3, p. 177-80, 2011.
- CATALAN-SOARES, B.; CARNEIRO-PROIETTI, A. B.; PROIETTI, F. A. Human T-cell lymphotropic virus in family members of seropositive blood donors: silent dissemination. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 16, n. 6, p. 387-394, 2004.
- CATALAN-SOARES, B.; CARNEIRO-PROIETTI, A. B.; PROIETTI, F. A. Heterogeneous geographic distribution of human T-cell lymphotropic viruses I and II (HTLV-I/II): serological screening prevalence rates in blood donors from large urban areas in Brazil. **Cad Saude Publica**, v. 21, n. 3, p. 926-31, 2005.
- CAVROIS, M. et al. Proliferation of HTLV-1 infected circulating cells in vivo in all asymptomatic carriers and patients with TSP/HAM. **Oncogene**, v. 12, n. 11, p. 2419-23, 1996.
- CHAMPAGNE, P. et al. Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes. **Nature**, v. 410, n. 6824, p. 106-11, 2001.
- CHARMAN, H. et al. Natural and experimentally induced antibodies to defined mammalian type-C virus proteins in primates. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 55, n. 6, p. 1419-1424, 1975.
- CHEEVERS, W. P.; MCGUIRE, T. C. Equine infectious anemia virus: immunopathogenesis and persistence. **Review of Infectious Diseases**, v. 7, n. 1, p. 83-88, 1985.
- CIMARELLI, A. et al. Clonal expansion of human T-cell leukemia virus type II in patients with high proviral load. **Virology**, v. 223, n. 2, p. 362-4, 1996.
- COFFIN, J. **Retroviridae: the viruses and their replication**. BN Fields, Jr, and PM Howley, Jr, and DM Knipe, Jr, eds. **Fundamental Virology 3rd Ed. 763-844**: Raven Press, New York 1996.
- COSKUN, A. K.; SUTTON, R. E. Expression of glucose transporter 1 confers susceptibility to human T-cell leukemia virus envelope-mediated fusion. **J Virol**, v. 79, n. 7, p. 4150-8, 2005.
- CRAWFORD, T. et al. Chronic arthritis in goats caused by a retrovirus. **Science**, v. 207, n. 4434, p. 997-999, 1980.

DAY, C. L. et al. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. **Nature**, v. 443, n. 7109, p. 350-4, 2006.

DE CASTRO-COSTA, C. M. et al. Proposal for diagnostic criteria of tropical spastic paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy (TSP/HAM). **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 22, n. 10, p. 931-5, 2006.

DE ROSA, S. C. et al. Ontogeny of gamma delta T cells in humans. **J Immunol**, v. 172, n. 3, p. 1637-45, 2004.

DE SAINT BASILE, G.; MENASCHE, G.; FISCHER, A. Molecular mechanisms of biogenesis and exocytosis of cytotoxic granules. **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 8, p. 568-79, 2010.

DE THE, G.; BOMFORD, R. An HTLV-I vaccine: why, how, for whom? **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 9, n. 5, p. 381-6, 1993.

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

DOONEIEF, G. et al. Neurologic consequences of HTLV-II infection in injection-drug users. **Neurology**, v. 46, n. 6, p. 1556-1560, 1996.

DOURADO, I. et al. HTLV-I in the general population of Salvador, Brazil: a city with African ethnic and sociodemographic characteristics. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 34, n. 5, p. 527-31, 2003.

ENOSE-AKAHATA, Y. et al. Minocycline modulates antigen-specific CTL activity through inactivation of mononuclear phagocytes in patients with HTLV-I associated neurologic disease. **Retrovirology**, v. 9, p. 16, 2012.

ENOSE-AKAHATA, Y. et al. Retrovirally induced CTL degranulation mediated by IL-15 expression and infection of mononuclear phagocytes in patients with HTLV-I-associated neurologic disease. **Blood**, v. 112, n. 6, p. 2400-10, Sep 2008.

FEHNIGER, T. A.; CALIGIURI, M. A. Interleukin 15: biology and relevance to human disease. **Blood**, v. 97, n. 1, p. 14-32, 2001.

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

FERRER, J. et al. Further studies on the antigenic properties and distribution of the putative bovine leukemia virus. **Bibliotheca haematologica**, n. 40, p. 59, 1975.

- FURUKAWA, Y. et al. Different cytokine production in tax-expressing cells between patients with human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis and asymptomatic HTLV-I carriers. **J Infect Dis**, v. 187, n. 7, p. 1116-25, 2003.
- GALVAO-CASTRO, B. et al. Distribution of human T-lymphotropic virus type I among blood donors: a nationwide Brazilian study. **Transfusion**, v. 2, n. 37, p. 242-3., 1997.
- GARCIA-SANZ, J. A. et al. Cell specificity of granzyme gene expression. **J Immunol**, v. 145, n. 9, p. 3111-8, 1990.
- GINAT, J.; LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F. Proliferation and differentiation potential of human CD8+ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines. **Blood**, v. 101, n. 11, p. 4260-6, 2003.
- GESSAIN, A. Virological aspects of tropical spastic paraparesis/HTLV-I associated myelopathy and HTLV-I infection. **J Neurovirol**, v. 2, n. 5, p. 299-306, Oct 1996.
- GESSAIN, A.; CASSAR, O. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, 2012-November-15 2012.
- GESSAIN, A.; GOUT, O. Chronic myelopathy associated with human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I). **Ann Intern Med**, v. 117, n. 11, p. 933-46, 1992.
- GESSAIN, A.; MAHIEUX, R. Tropical spastic paraparesis and HTLV-1 associated myelopathy: clinical, epidemiological, virological and therapeutic aspects. **Rev Neurol (Paris)**, v. 168, n. 3, p. 257-69, Mar 2012.
- GESSAIN, A. et al. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. **The Lancet**, v. 326, n. 8452, p. 407-410, 1985.
- GOLDEN-MASON, L. et al. Negative immune regulator Tim-3 is overexpressed on T cells in hepatitis C virus infection and its blockade rescues dysfunctional CD4+ and CD8+ T cells. **J Virol**, v. 83, n. 18, p. 9122-30, 2009.
- GOLDSBY, T. P.; KINDT, T.; OSBORN, B. **KUBY IMUNOLOGIA** 4ª edição. Rio de Janeiro: Revinter, 2008. 662
- GONCALVES, D. U. et al. Dermatologic lesions in asymptomatic blood donors seropositive for human T cell lymphotropic virus type-1. **Am J Trop Med Hyg**, v. 68, n. 5, p. 562-5, 2003.
- GONCALVES, D. U. et al. HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) inflammatory network. **Inflamm Allergy Drug Targets**, v. 7, n. 2, p. 98-107, Jun 2008.

GRANT, C. et al. Dysregulation of TGF-beta signaling and regulatory and effector T-cell function in virus-induced neuroinflammatory disease. **Blood**, v. 111, n. 12, p. 5601-9, 2008.

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

GRIFFITHS, G. M.; ISAAZ, S. Granzymes A and B are targeted to the lytic granules of lymphocytes by the mannose-6-phosphate receptor. **J Cell Biol**, v. 120, n. 4, p. 885-96, 1993.

GROSSMAN, W. J. et al. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. **Immunity**, v. 21, n. 4, p. 589-601, 2004.

GUMPERZ, J. E. et al. Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. **J Exp Med**, v. 195, n. 5, p. 625-36, 2002.

HAGN, M. et al. Human B cells secrete granzyme B when recognizing viral antigens in the context of the acute phase cytokine IL-21. **J Immunol**, v. 183, n. 3, p. 1838-45, 2009.

HANON, E. et al. Abundant tax protein expression in CD4+ T cells infected with human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) is prevented by cytotoxic T lymphocytes. **Blood**, v. 95, n. 4, p. 1386-92, Feb 2000a.

HANON, E. et al. Fratricide among CD8+ T Lymphocytes Naturally Infected with Human T Cell Lymphotropic Virus Type I. **Immunity**, v. 13, n. 5, p. 657-664, 2000b.

HENKART, P. A. Mechanism of lymphocyte-mediated cytotoxicity. **Annu Rev Immunol**, v. 3, p. 31-58, 1985.

HEUSEL, J. W. et al. Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. **Cell**, v. 76, n. 6, p. 977-987, 1994.

HIGUCHI, M.; FUJII, M. Distinct functions of HTLV-1 Tax1 from HTLV-2 Tax2 contribute key roles to viral pathogenesis. **Retrovirology**, v. 6, n. 117, p. 1742-4690, 2009.

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

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

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

HOSHINO, H. Cellular Factors Involved in HTLV-1 Entry and Pathogenicity. **Front Microbiol**, v. 3, p. 222, 2012.

IJICHI, S. et al. An autoaggressive process against bystander tissues in HTLV-I-infected individuals: a possible pathomechanism of HAM/TSP. **Med Hypotheses**, v. 41, n. 6, p. 542-7, 1993.

ITOH, N. et al. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. **Cell**, v. 66, n. 2, p. 233-243, 26 July 1991 1991.

IWASAKI, Y. Human T cell leukemia virus type I infection and chronic myelopathy. **Brain Pathol**, v. 3, n. 1, p. 1-10, 1993.

JACOBSON, S. Cellular immune responses to HTLV-I: immunopathogenic role in HTLV-I-associated neurologic disease. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol**, v. 13, n. 1, p. S100-6, 1996.

JACOBSON, S. Immunopathogenesis of human T cell lymphotropic virus type I-associated neurologic disease. **J Infect Dis**, v. 186 Suppl 2, p. S187-92, Dec 2002.

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

JANEWAY, C. A. et al. **Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença**. 6ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2006.

JARRETT, W.; MARTIN, W. A virus-like particle associated with leukemia (lymphosarcoma). **Nature**, v. 202, p. 567-569, 1964.

JIN, H. T. et al. Cooperation of Tim-3 and PD-1 in CD8 T-cell exhaustion during chronic viral infection. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 33, p. 14733-8, 2010.

JIN, Q. et al. Infection of CD4+ T lymphocytes by the human T cell leukemia virus type 1 is mediated by the glucose transporter GLUT-1: evidence using antibodies specific to the receptor's large extracellular domain. **Virology**, v. 349, n. 1, p. 184-96, 2006.

JOHNSON-NAUROTH, J. M. et al. Memory lineage relationships in HTLV-1-specific CD8+ cytotoxic T cells. **J Neuroimmunol**, v. 176, n. 1-2, p. 115-24, Jul 2006.

JONES, R. B. et al. Tim-3 expression defines a novel population of dysfunctional T cells with highly elevated frequencies in progressive HIV-1 infection. **J Exp Med**, v. 205, n. 12, p. 2763-79, 2008.

KAECH, S. M.; WHERRY, E. J. Heterogeneity and cell-fate decisions in effector and memory CD8+ T cell differentiation during viral infection. **Immunity**, v. 27, n. 3, p. 393-405, 2007.

KAGI, D. et al. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. **Science**, v. 265, n. 5171, p. 528-30, 1994.

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

KAPLAN, J. E. et al. Male-to-female transmission of human T-cell lymphotropic virus types I and II: association with viral load. The Retrovirus Epidemiology Donor Study Group. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol**, v. 12, n. 2, p. 193-201, 1996.

KAPLAN, J. E. et al. The risk of development of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis among persons infected with HTLV-I. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 3, n. 11, p. 1096-101, 1990.

KEEFE, D. et al. Perforin triggers a plasma membrane-repair response that facilitates CTL induction of apoptosis. **Immunity**, v. 23, n. 3, p. 249-62, 2005.

KINOSHITA, K. et al. Demonstration of adult T-cell leukemia virus antigen in milk from three seropositive mothers. **Gann**, v. 75, n. 2, p. 103-5, 1984.

KIRA, J. et al. Increased HTLV-I proviral DNA in HTLV-I-associated myelopathy: a quantitative polymerase chain reaction study. **Ann Neurol**, v. 29, n. 2, p. 194-201, 1991.

KITAGAWA, T. et al. **Antibodies to HTLV-I in Japanese immigrants in Brazil**. JAMA. 1986 Nov 7;256(17):2342., 1986. ISBN 0098-7484 (Print)

0098-7484 (Linking).

KNIGHT, S. C. et al. Dendritic cells in HIV-1 and HTLV-1 infection. **Adv Exp Med Biol**, v. 329, p. 545-9, 1993.

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

KOYANAGI, Y. et al. In vivo infection of human T-cell leukemia virus type I in non-T cells. **Virology**, v. 196, n. 1, p. 25-33, 1993.

KRENSKY, A. M. Granulysin: a novel antimicrobial peptide of cytolytic T lymphocytes and natural killer cells. **Biochem Pharmacol**, v. 59, n. 4, p. 317-20, 2000.

KUBOTA, R. et al. Fluctuation of HTLV-I proviral DNA in peripheral blood mononuclear cells of HTLV-I-associated myelopathy. **J Neuroimmunol**, v. 42, n. 2, p. 147-54, 1993.

KUBOTA, R. et al. Demonstration of human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) tax-specific CD8+ lymphocytes directly in peripheral blood of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients by intracellular cytokine detection. **J Immunol**, v. 161, n. 1, p. 482-8, Jul 1998.

LAIRMORE, M. D.; HAINES, R.; ANUPAM, R. Mechanisms of human T-lymphotropic virus type 1 transmission and disease. **Current Opinion in Virology**, v. 2, n. 4, p. 474-481, 2012.

LEHKY, T. J.; JACOBSON, S. Induction of HLA class II in HTLV-I infected neuronal cell lines. **J Neurovirol**, v. 1, n. 2, p. 145-56, 1995.

LEPOUTRE, V. et al. Role of resident CNS cell populations in HTLV-1-associated neuroinflammatory disease. **Front Biosci**, v. 14, p. 1152-68, 2009.

LEVIN, M. C. et al. Neuronal molecular mimicry in immune-mediated neurologic disease. **Ann Neurol**, v. 44, n. 1, p. 87-98, 1998.

LIU, K. et al. IL-15 mimics T cell receptor crosslinking in the induction of cellular proliferation, gene expression, and cytotoxicity in CD8+ memory T cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 9, p. 6192-7, 2002.

LOWIN, B. et al. Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways. **Nature**, v. 370, n. 6491, p. 650-2, 1994.

LU, P. et al. Perforin expression in human peripheral blood mononuclear cells. Definition of an IL-2-independent pathway of perforin induction in CD8+ T cells. **J Immunol**, v. 148, n. 11, p. 3354-60, 1992.

MALTA, T. M. et al. Altered expression of degranulation-related genes in CD8(+) T cells in human T lymphotropic virus type I infection. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 29, n. 5, p. 826-36, May 2013.

MANEL, N. et al. The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV. **Cell**, v. 115, n. 4, p. 449-59, 2003.

MANNING, A. et al. A prospective study of transmission by transfusion of HTLV-I and risk factors associated with seroconversion. **Int J Cancer**, v. 51, n. 6, p. 886-91, 1992.

- MANUEL, S. L. et al. Lack of recall response to Tax in ATL and HAM/TSP patients but not in asymptomatic carriers of human T-cell leukemia virus type 1. **Journal of clinical immunology**, v. 33, n. 7, p. 1223-1239, 2013.
- MATSUOKA, M. Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) infection and the onset of adult T-cell leukemia (ATL). **Retrovirology**, v. 2, p. 27, 2005.
- MATSUOKA, M.; JEANG, K. T. Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. **Nat Rev Cancer**, v. 7, n. 4, p. 270-80, 2007.
- MICHAELSSON, J. et al. The frequency of CD127^{low} expressing CD4⁺CD25^{high} T regulatory cells is inversely correlated with human T lymphotropic virus type-1 (HTLV-1) proviral load in HTLV-1-infection and HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **BMC Immunol**, v. 9, n. 41, p. 1471-2172, 2008.
- MOCHIZUKI, M. et al. HTLV-I uveitis: a distinct clinical entity caused by HTLV-I. **Jpn J Cancer Res**, v. 83, n. 3, p. 236-9, 1992.
- MOTYKA, B. et al. Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis. **Cell**, v. 103, n. 3, p. 491-500, 2000.
- MUELLER, N. et al. Findings from the Miyazaki Cohort Study. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol**, v. 13, n. 1, p. S2-7, 1996.
- MURPHY, E. L. et al. Modelling the risk of adult T-cell leukemia/lymphoma in persons infected with human T-lymphotropic virus type I. **Int J Cancer**, v. 43, n. 2, p. 250-3, 1989.
- MURPHY, E. L. et al. Respiratory and urinary tract infections, arthritis, and asthma associated with HTLV-I and HTLV-II infection. **Emerg Infect Dis**, v. 10, n. 1, p. 109-16, 2004.
- NAGAI, M. et al. Analysis of HTLV-I proviral load in 202 HAM/TSP patients and 243 asymptomatic HTLV-I carriers: high proviral load strongly predisposes to HAM/TSP. **J Neurovirol**, v. 4, n. 6, p. 586-93, 1998.
- NAGATA, S.; GOLSTEIN, P. The Fas death factor. **Science**, v. 267, n. 5203, p. 1449-56, 1995.
- NAKAMURA, H. et al. High prevalence of Sjogren's syndrome in patients with HTLV-I associated myelopathy. **Ann Rheum Dis**, v. 56, n. 3, p. 167-72, 1997.
- NAKANO, S. et al. Search for possible routes of vertical and horizontal transmission of adult T-cell leukemia virus. **Gann**, v. 75, n. 12, p. 1044-5, 1984.

NAKATA, M. et al. Expression of perforin and cytolytic potential of human peripheral blood lymphocyte subpopulations. **Int Immunol**, v. 4, n. 9, p. 1049-54, 1992.

NATH, M. D. et al. Regulation of the cell-surface expression of an HTLV-I binding protein in human T cells during immune activation. **Blood**, v. 101, n. 8, p. 3085-92, 2003.

NDHLOVU, L. C. et al. HTLV-1 tax specific CD8+ T cells express low levels of Tim-3 in HTLV-1 infection: implications for progression to neurological complications. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 4, p. e1030, 2011.

NDHLOVU, L. C. et al. Lower numbers of circulating Natural Killer T (NK T) cells in individuals with human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) associated neurological disease. **Clin Exp Immunol**, v. 158, n. 3, p. 294-9, 2009.

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

NISHIURA, Y. et al. Increased production of inflammatory cytokines in cultured CD4+ cells from patients with HTLV-I-associated myelopathy. **Tohoku J Exp Med**, v. 179, n. 4, p. 227-33, 1996.

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

O'CONNOR, G. M.; HART, O. M.; GARDINER, C. M. Putting the natural killer cell in its place. **Immunology**, v. 117, n. 1, p. 1-10, 2006.

OKAYAMA, A. et al. **Role of HTLV-1 proviral DNA load and clonality in the development of adult T-cell leukemia/lymphoma in asymptomatic carriers.** *Int J Cancer*. 2004 Jul 1;110(4):621-5., ISBN 0020-7136 (Print)

0020-7136 (Linking).

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

OLIVEIRA, A. L. et al. High frequencies of functionally competent circulating Tax-specific CD8+ T cells in human T lymphotropic virus type 2 infection. **J Immunol**, v. 183, n. 5, p. 2957-65, Sep 2009.

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

OSAME, M. Pathological mechanisms of human T-cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy (HAM/TSP). **J Neurovirol**, v. 8, n. 5, p. 359-64, Oct 2002.

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

OSAME, M. et al. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. **The Lancet**, v. 327, n. 8488, p. 1031-1032, 1986.

PAIS-CORREIA, A. M. et al. Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses. **Nat Med**, v. 16, n. 1, p. 83-9, 2010.

PARKER, C. E. et al. Activated, HTLV-1-specific cytotoxic T-lymphocytes are found in healthy seropositives as well as in patients with tropical spastic paraparesis. **Virology**, v. 188, n. 2, p. 628-36, Jun 1992.

PAUL, S. et al. Phenotypic and Functional Plasticity of Gamma-Delta (gammadelta) T Cells in Inflammation and Tolerance. **Int Rev Immunol**, v. 19, p. 19, 2013.

PETERS, A. A. et al. An apparent case of human T-cell lymphotropic virus type II (HTLV-II)-associated neurological disease: a clinical, molecular, and phylogenetic characterisation. **Journal of clinical virology**, v. 14, n. 1, p. 37-50, 1999.

PETERS, P. J. et al. Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. **The Journal of experimental medicine**, v. 173, n. 5, p. 1099-1109, 1991.

PINKOSKI, M. J. et al. Entry and trafficking of granzyme B in target cells during granzyme B-perforin-mediated apoptosis. **Blood**, v. 92, n. 3, p. 1044-54, 1998.

PIPKIN, M. E.; LIEBERMAN, J. Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works. **Current opinion in immunology**, v. 19, n. 3, p. 301-308, 2007.

PODACK, E. R.; KONIGSBERG, P. J. Cytolytic T cell granules. Isolation, structural, biochemical, and functional characterization. **J Exp Med**, v. 160, n. 3, p. 695-710, 1984.

POE, M. et al. Human cytotoxic lymphocyte granzyme B. Its purification from granules and the characterization of substrate and inhibitor specificity. **J Biol Chem**, v. 266, n. 1, p. 98-103, 1991.

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

- PRIMO, J. et al. High HTLV-1 proviral load, a marker for HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis, is also detected in patients with infective dermatitis associated with HTLV-1. **Braz J Med Biol Res**, v. 42, n. 8, p. 761-4, 2009.
- PROIETTI, F. A. et al. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. **Oncogene**, v. 24, n. 39, p. 6058-6068, 2005.
- RICHARDSON, J. H. et al. In vivo cellular tropism of human T-cell leukemia virus type 1. **J Virol**, v. 64, n. 11, p. 5682-7, 1990.
- ROUS, P. A Transmissible Avian Neoplasm. (Sarcoma of the Common Fowl.). **J Exp Med**, v. 12, n. 5, p. 696-705, 1910.
- SABOURI, A. H. et al. Impaired function of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-specific CD8+ T cells in HTLV-1-associated neurologic disease. **Blood**, v. 112, n. 6, p. 2411-20, Sep 2008.
- SAJI, F. et al. Perinatal infection of human T-lymphotropic virus type I, the etiologic virus of adult T-cell leukemia/lymphoma. DNA amplification of specific human T-lymphotropic virus type I sequences. **Cancer**, v. 66, n. 9, p. 1933-7, 1990.
- SALCEDO, T. W. et al. Modulation of perforin and granzyme messenger RNA expression in human natural killer cells. **J Immunol**, v. 151, n. 5, p. 2511-20, 1993.
- SALLUSTO, F.; GEGINAT, J.; LANZAVECCHIA, A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. **Annu Rev Immunol**, v. 22, p. 745 - 763, 2004.
- SALLUSTO, F. et al. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. **Nature**, v. 401, p. 708 - 712, 1999.
- SANTOS, S. B. et al. Exacerbated inflammatory cellular immune response characteristics of HAM/TSP is observed in a large proportion of HTLV-I asymptomatic carriers. **BMC Infect Dis**, v. 4, p. 7, 2004.
- SANTOS, S. B. et al. Modulation of T cell responses in HTLV-1 carriers and in patients with myelopathy associated with HTLV-1. **Neuroimmunomodulation**, v. 13, n. 3, p. 145-51, 2006.
- SAUER, H. et al. Functional size of complement and perforin pores compared by confocal laser scanning microscopy and fluorescence microphotolysis. **Biochim Biophys Acta**, v. 18, n. 1, p. 137-46, 1991.
- SCHREIBER, G. B. et al. The risk of transfusion-transmitted viral infections. The Retrovirus Epidemiology Donor Study. **N Engl J Med**, v. 334, n. 26, p. 1685-90, 1996.

- SCHRODER, K. et al. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. **J Leukoc Biol**, v. 75, n. 2, p. 163-89, 2004.
- SEIKI, M. et al. Nonspecific integration of the HTLV provirus genome into adult T-cell leukaemia cells. **Nature**, v. 309, n. 5969, p. 640-2, 1984.
- SEIKI, M. et al. Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 80, n. 12, p. 3618-22, 1983.
- SHEMBADE, N.; HARHAJ, E. W. Role of post-translational modifications of HTLV-1 Tax in NF-kappaB activation. **World J Biol Chem**, v. 1, n. 1, p. 13-20, 2010.
- SHIMOYAMA, M. Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukaemia-lymphoma. A report from the Lymphoma Study Group (1984-87). **Br J Haematol**, v. 79, n. 3, p. 428-37, 1991.
- SMYTH, M. J.; MCGUIRE, M. J.; THIA, K. Y. Expression of recombinant human granzyme B. A processing and activation role for dipeptidyl peptidase I. **J Immunol**, v. 154, n. 12, p. 6299-305, 1995.
- SODROSKI, J. The human T-cell leukemia virus (HTLV) transactivator (Tax) protein. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1114, n. 1, p. 19-29, 1992.
- SOUZA, L. A. G. **CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E IMUNOLÓGICA DA INFECÇÃO PELO VÍRUS LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T HUMANAS**. 2009. 93 DISSERTAÇÃO (MESTRADO). INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ, BELÉM.
- STARLING, A. L. et al. Proviral load and the balance of serum cytokines in HTLV-1-asymptomatic infection and in HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). **Acta Trop**, v. 125, n. 1, p. 75-81, 2013.
- STRASSER, A.; JOST, P. J.; NAGATA, S. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. **Immunity**, v. 30, n. 2, p. 180-192, 2009.
- STRIK, M. C. et al. Human mast cells produce and release the cytotoxic lymphocyte associated protease granzyme B upon activation. **Mol Immunol**, v. 44, n. 14, p. 3462-72, 2007.
- SUN, J. et al. A cytosolic granzyme B inhibitor related to the viral apoptotic regulator cytokine response modifier A is present in cytotoxic lymphocytes. **J Biol Chem**, v. 271, n. 44, p. 27802-9, 1996.

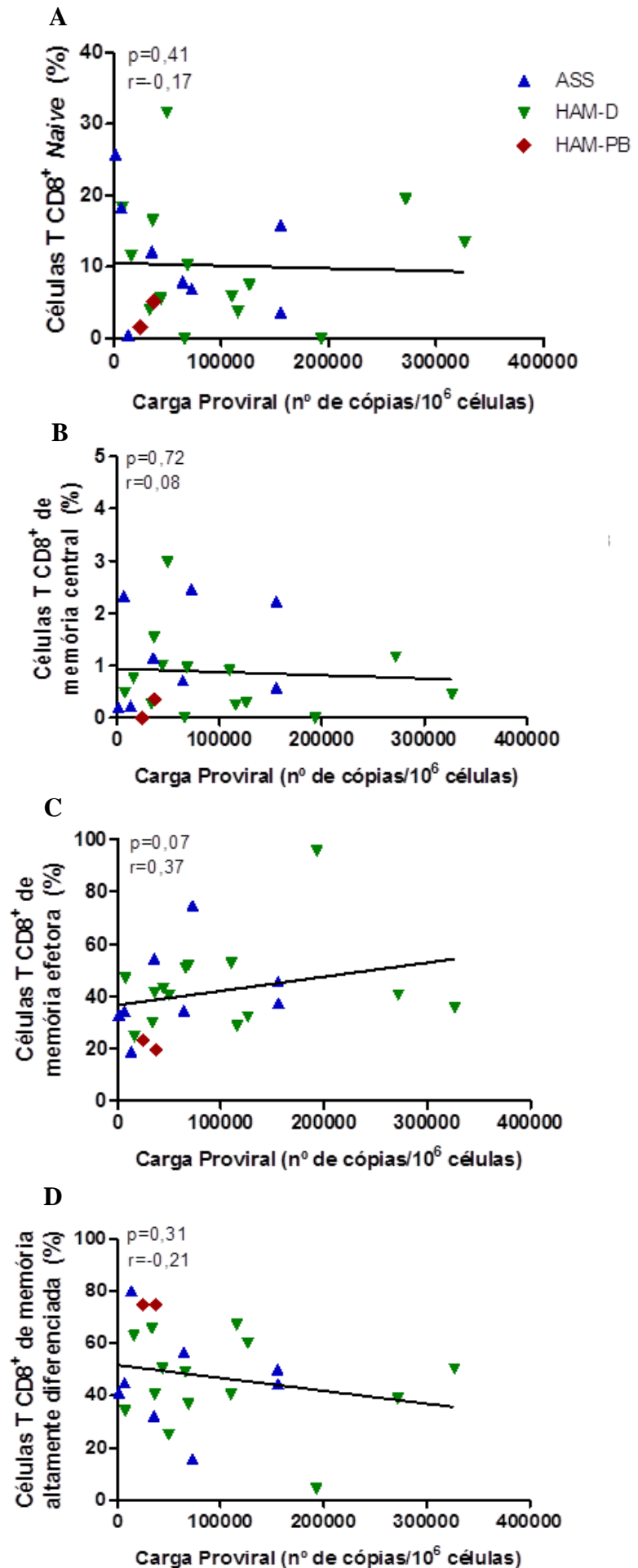
- TAJIMA, K. et al. Epidemiological analysis of the distribution of antibody to adult T-cell leukemia-virus-associated antigen: possible horizontal transmission of adult T-cell leukemia virus. **Gann**, v. 73, n. 6, p. 893-901, 1982.
- TAKATSUKI, K. et al. Clinical diversity in adult T-cell leukemia-lymphoma. **Cancer Res**, v. 45, n. 9 Suppl, p. 4644s-4645s, 1985.
- TEMIN, H. M.; MIZUTANI, S. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. **Nature**, v. 226, n. 5252, p. 1211-3, 1970.
- THIERY, J. et al. Perforin pores in the endosomal membrane trigger the release of endocytosed granzyme B into the cytosol of target cells. **Nat Immunol**, v. 12, n. 8, p. 770-7, Aug 2011.
- TOULZA, F. et al. High frequency of CD4+FoxP3+ cells in HTLV-1 infection: inverse correlation with HTLV-1-specific CTL response. **Blood**, v. 111, n. 10, p. 5047-53, 2008.
- TRAPANI, J. A. Granzymes: a family of lymphocyte granule serine proteases. **Genome Biol**, v. 2, n. 12, p. 23, 2001.
- TSCHOPP, C. M. et al. Granzyme B, a novel mediator of allergic inflammation: its induction and release in blood basophils and human asthma. **Blood**, v. 108, n. 7, p. 2290-9, 2006.
- UCHIYAMA, T. et al. Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. **Blood**, v. 50, n. 3, p. 481-492, 1977.
- VINE, A. M. et al. 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**, v. 173, n. 8, p. 5121-9, Oct 2004.
- VON BOEHMER, H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. **Nat Immunol**, v. 6, n. 4, p. 338-44, 2005.
- WALDMANN, T. A.; DUBOIS, S.; TAGAYA, Y. Contrasting roles of IL-2 and IL-15 in the life and death of lymphocytes: implications for immunotherapy. **Immunity**, v. 14, n. 2, p. 105-10, 2001.
- WATANABE, T.; SEIKI, M.; YOSHIDA, M. HTLV type I (US isolate) and ATL (Japanese isolate) are the same species of human retrovirus. **Virology**, v. 133, n. 1, p. 238-241, 1984.
- WATTEL, E. et al. Clonal expansion of human T-cell leukemia virus type I-infected cells in asymptomatic and symptomatic carriers without malignancy. **J Virol**, v. 69, n. 5, p. 2863-8, 1995.

- WOLFE, N. D. et al. Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 22, p. 7994-7999, 2005.
- YAKOVA, M. et al. Increased proviral load in HTLV-1-infected patients with rheumatoid arthritis or connective tissue disease. **Retrovirology**, v. 2, p. 4, 2005.
- YAMAGUCHI, K. Human T-lymphotropic virus type I in Japan. **Lancet**, v. 343, n. 8891, p. 213-6, 1994.
- YAMAGUCHI, K.; WATANABE, T. Human T lymphotropic virus type-I and adult T-cell leukemia in Japan. **Int J Hematol**, v. 2, p. 240-5, 2002.
- YAMANO, Y. et al. Virus-induced dysfunction of CD4+CD25+ T cells in patients with HTLV-I-associated neuroimmunological disease. **J Clin Invest**, v. 115, n. 5, p. 1361-8, 2005.
- YOSHIDA, M. Multiple viral strategies of HTLV-1 for dysregulation of cell growth control. **Annu Rev Immunol**, v. 19, p. 475-96, 2001.
- YU, F. et al. Natural killer (NK) cells in HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis-decrease in NK cell subset populations and activity in HTLV-I seropositive individuals. **J Neuroimmunol**, v. 33, n. 2, p. 121-8, 1991.
- ZHENG, H. et al. Emergence of a novel and highly divergent HTLV-3 in a primate hunter in Cameroon. **Virology**, v. 401, n. 2, p. 137-145, 2010.

APÊNDICE

APÊNDICE 1 - Correlação entre as subpopulações *naive* e de memória dos CTLs e a carga proviral dos indivíduos infectados pelo HTLV-1.

Não foi constatada correlação entre a carga proviral e as populações de Linfócitos T CD8⁺*naive* (CD45RA⁺CCR7) (A), de memória central (CD45RA⁻CCR7⁺) (B), de memória efetora (CD45RA⁻CCR7) (C) e de memória altamente diferenciada (CD45RA⁺CCR7⁺) (D). Análise estatística realizada através do teste de correlação de Spearman. Diferenças consideradas significantes se $p < 0,05$.



APÊNDICE 2 – Manuscrito em preparação**DECREASE OF CD8+ T CELLS WITH DEGRANULATION ACTIVITY
DISTINGUISHES HTLV-1-INFECTED PATIENTS WITH HAM/TSP FROM
ASYMPTOMATIC CARRIERS**

Marcus Vinícius Alves Lima^{1,2}, Bernardo Galvão-Castro^{1,3}, Maria Fernanda Rios Grassi^{1,3}, Rita Elizabeth Moreira Mascarenhas^{1,3}

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

² Biofunction Department/Health Sciences Institute – Federal University of Bahia, Brazil.

³ Bahiana School of Medicine and Public Health, Salvador, Bahia, Brazil.

Corresponding author:

Dr.^a Rita Elizabeth Moreira Mascarenhas,

LASP/CPqGM/FIOCRUZ

Rua Waldemar Falcão, nº 121, Candeal, Salvador, Bahia, CEP 40296-710, Brazil.

Phone: 55 71 3176 2213

Email: rita@conveniado.bahia.fiocruz.br

Abstract

HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) is a chronic and progressive inflammatory disease of the central nervous system and your immunopathogenic mechanisms are not completely understood. The role of cytotoxic T-lymphocytes (CTLs) in the pathogenesis of this disease is still undefined. In this study we evaluated the phenotype and function of CD8⁺ T-lymphocytes from HTLV-1-infected patients with HAM/TSP. Assays immunophenotyping by flow cytometry were conducted to assess the proportion of cytotoxic T-lymphocytes memory subsets and the cytotoxic potential of such cells. Were analyzed 13 uninfected donors (controls) and 43 HTLV-1-infected patients: 18 without HAM/TSP (asymptomatic carrier for myelopathy - ACM) and 25 with HAM/TSP. Infected patients showed an increased proportion of CD8⁺ T-lymphocytes and their subpopulations of effector memory cells at the expense of naive and central memory cells. The distribution of CTLs memory subsets resembled between HTLV-1-infected patients. The amount of CTLs with recent degranulation activity was significantly lower in HAM/TSP patients when compared to ACM group. The HAM/TSP group also showed IFN- γ production decrease (50%) by CTLs relative to the ACM group. Increased expression of IL-15 on peripheral blood mononuclear cells and CD14⁺ cells was observed in all groups of infected patients when compared to uninfected subjects. These results suggest that HTLV-1-infected individuals with HAM/TSP have cellular immune response impaired, characterized by decreased cytotoxic T-lymphocytes with degranulation activity.

Key-words: CTL, HTLV-1, HAM/TSP.

Introduction

Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) infects 10-to-20 million people worldwide, being endemic in many geographical regions such as southwestern Japan, the Caribbean islands, Africa and South America (1-3). Estimates indicate that approximately 2.5 million people are infected with HTLV-1 in Brazil and Salvador is the city that has the highest prevalence in the general population - 1.76% (4-6). Adult T cell leukemia/lymphoma (ATLL) and HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) are the main clinical manifestations caused by HTLV-1. HAM/TSP is a chronic neuropathy characterized by progressive loss of motor function of lower limbs (7). The immune response, genetic polymorphisms of the infected individual and proviral load are factors that can influence the outcome of infection (8-10).

HTLV-1 has tropism for T cells and preferentially infects CD4⁺ T-lymphocytes (11). However, other cell types such as CTLs, B cells, dendritic cells, macrophages, and glial cells can be targeted pathogen (12-16). The HTLV-1 infection promotes activation and proliferation of target cells (17, 18). Specific cellular immune response to HTLV-1 is one of the determinants of proviral load stability, being important for the infection control. CTLs are chronically activated and play a fundamental role in the recognition and lysis of HTLV-1⁺ cells (19, 20). An effective response of these lymphocytes would reduce the frequency of cells expressing Tax and the proviral load. Thus, the operating efficiency of CTLs can be inversely related to the risk of infection associated inflammatory diseases such as HAM/TSP (7, 8, 21).

Despite CTLs play an important role in viral clearance, an exaggerated immune response could contribute to the tissue damage observed in the central nervous system of patients with HAM/TSP (22). The high frequency of HTLV-1-specific CTL in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with HAM/TSP and a low frequency of Tax-specific CTLs in infected individuals without myelopathy suggests a contribution of these cells in the pathogenesis of HAM/TSP (23, 24). The directly proportional correlation between the frequency of HTLV-1-specific CTLs and pro-inflammatory cytokine production that allegedly contribute to the neuronal demyelination, strengthen this theory (25-27). Furthermore, it was demonstrated an inverse correlation between the frequency of Treg cells with the CTL cytolytic activity (28) and the proviral load (29), suggesting that an impairment of immune tolerance and immunoregulation could contribute to the inflammatory environment observed in HAM/TSP.

Given the absence of a consensus about the functional aspect of the cells directly involved in the immune response to HTLV-1, we investigated the phenotype and function of CD8⁺ T-lymphocytes from HTLV-1-infected individuals with and without myelopathy to contribute to the better understanding of the immune response in the HTLV-1 infection and immunopathogenesis of HAM/TSP.

Materials and Methods

Ethics Statement

The research involving human participants reported in this study was approved by the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ) ethics committee (process 307/2009), Salvador, Brazil. The written informed consents were obtained from all participants or their legal representatives. The clinical investigation related was conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki (<http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/>).

Human Subjects and Cells

Forty-three HTLV-1-infected patients from the HTLV Center of the Bahiana School of Medicine and Public Health (Salvador, Bahia, Brazil) were sequentially included in the study following a clinical and laboratory examination. They were classified in two groups: infected without HAM/TSP (asymptomatic carriers for myelopathy - ACM, n=18) and infected with myelopathy (HAM/TSP, n=25). Blood samples from 14 non-infected volunteers donors from the Gonçalo Moniz Research Center were used as controls. All samples were screened for HTLV -1/2 antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Ab-Capture ELISA test System – Ortho-Clinical Diagnostics, Inc., Raritan, New Jersey) and the positive results were confirmed by Western Blot (HTLV Blot 2.4, Genelabs Technologies, Singapore). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from HTLV-1-infected patients and non-infected donors were isolated from venous blood samples by Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) density gradient. The experiments of this study were performed with whole blood aliquots or freshly isolated PBMCs.

Flow cytometry assessment

Cell surface and intracellular staining

For tagging molecules present on the cell surface, an aliquot of 100 μ L of whole blood was incubated for 15 minutes at room temperature with monoclonal antibodies for human CD3, CD8, CCR7, CD45RA (Pharmingen Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), as well as isotype controls for each fluorochrome used. Stained samples were treated with FACS Lysing Solution (1X) (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) for lysis of erythrocytes according to the manufacturer's instructions and washed twice with PBS/BSA 0.5%. After a last wash, the supernatant was discarded and the cells were fixed with PBS/paraformaldehyde 0.4%. To detect intracellular perforin and granzyme B, the cells were stained for surface markers and then treated with PBS/paraformaldehyde 2% and PBS/BSA/Saponin 0.2% for the fixation and permeabilization before intracellular protein detection. After incubation for 30 minutes with anti-granzyme B and anti-perforin mAbs, the cells were washed and fixed. Analyses were performed using the flow cytometer FACSaria II (BD San Jose CA, USA). At least 50,000 events were analyzed per sample. The events were plotted as a function of FSC x SSC parameters and analyzed by FlowJo software (Tree Star) software.

CD107a mobilization assay and intracellular IFN- γ detection

The cell-mediated cytotoxicity of CD8⁺ T-lymphocytes was evaluated by sensitive detection assay of CD107a molecule exposed on the membrane surface after cellular activation and ensuing secretion of lytic granule contents such as perforin and granzyme B. PBMCs obtained from heparinized blood samples were suspended in RPMI 1640 medium (Sigma), supplemented with 2 mM L-glutamine (SIGMA), 1% nonessential amino acids (GIBCO), 1 mM sodium pyruvate (SIGMA), 100 U/mL penicillin (SIGMA), 100 μ g/mL streptomycin (SIGMA), 100 μ g/mL HEPES (Invitrogen) and 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Hyclone Laboratories, Logan UT). PBMCs (1×10^6) were cultured in the presence of the anti-CD107a mAb and CD28/CD49d (Becton Dickinson Pharmingen, San Jose, CA, EUA) for 6 hours in a 5% CO₂ incubator at 37°C. Monensin and brefeldin A were added into the culture for 5 hours before the time for detection. After incubation, cells were harvested and stained with APC-Cy7-conjugated anti-CD3 and APC-conjugated anti-CD8. For detection of intracellular IFN- γ , the cells were fixed in PBS containing 2% paraformaldehyde, permeabilized with PBS-Saponin 0,2% and subsequently stained with PE-conjugated anti-IFN- γ . Isotypes antibodies were used as control in each experiment.

Quantification of HTLV-1 proviral load

PBMCs were obtained from EDTA blood and cryopreserved until the DNA processing. The DNA extraction system (Qiagen, Hilden, Germany) was used to extract DNA before of the HTLV-1 proviral load quantification by real-time TaqMan polymerase chain reaction (PCR) method, as previously described (30). Briefly, SK110/SK111 primers were used to amplify a 186 bp fragment of the pol gene and dual TaqMan probe (50-FAM/50 VIC and 30-TAMRA) was attached at 4,829–4,858 bp of the HTLV-1 reference sequence (HTLVATK). Albumin DNA was used as an endogenous reference and HTLV-1 proviral load was calculated as the ratio of [(HTLV-1 DNA average copy number)/(albumin DNA average copy number)] x 2 x 10⁶ and expressed as the number of HTLV-1 copies per 10⁶ PBMCs.

Statistical analysis

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

Results

HTLV-1-infected patients showed a higher amount of cytotoxic T-lymphocytes compared to uninfected individuals (about 1.5-fold, P=0.016). No difference was observed in the frequencies of these cytotoxic cells between ACM and HAM/TSP groups (Figure 1).

A reduced frequency of naive CTLs (P=0.003) and central memory, TCM (P<0.0001), as well as increase of effector memory subpopulation CD45RA⁺ (TEMRA) (P=0.03) were observed in HTLV-1-infected individuals compared to uninfected donors (Figure 2). The frequency of effector memory subpopulation (TEM) was similar between the groups. The groups HAM/TSP and ACM showed a reduction in the frequency of central memory CTLs compared to NI group. A reduction in the percentage of naive CD8⁺ T cells was also observed in patients with myelopathy when compared to uninfected control group. The proviral load was

not correlated with the frequency of naive CTLs ($P=-0.41$, $r=-0.17$), TCM ($P=0.72$, $r=0.08$), TEM ($P=0.07$, $r=0.37$) or TEMRA ($P=0.31$, $r=-0.21$). (Data not shown)

The proportion of $CD8^+GrzB^+$ cells was four times higher in HTLV-1-infected patients (33.2%) compared to uninfected volunteers (8.4%, $P=0.0009$). The frequency of cells expressing perforin presented similar between groups ($P=0.19$). However, the percentage of $CD8^+$ cells containing granzyme B and perforin was eight times higher in infected individuals (0.9% - 6.8%, $P=0.006$), suggesting an increased cytotoxic potential (Figure 3).

The ACM and HAM/TSP groups showed similar frequencies of $CD8^+GrzB^+$ and/or $Perf^+$ ($P>0.05$). Compared to uninfected control group, the ACM group had a higher percentage of $CD8^+GrzB^+$ ($P=0.03$) and co-expressing both proteins ($P=0.04$). No significant differences were observed in these cytotoxic mediators expression between the two infected groups studied.

The frequency of CTLs expressing CD107a molecule was 18 times higher in HTLV-1⁺ patients compared to control group ($P<0.0004$ - 39.9% and 2.2%, respectively). Infected individuals also showed a higher percentage of CTLs producing IFN- γ ($P=0.06$) and with polyfunctional profile, $CD107a^+IFN-\gamma^+$ ($P=0.0005$). No statistical differences were observed in the percentage of $CD107a^+$ and/or $IFN-\gamma^+$ CTLs between $PVL<1\%$ and $PVL\geq 1\%$ groups (Figure 4).

The ACM group presented $CD107a^+$ CTLs frequency median approximately 25 times higher than non-infected group ($P<0.0005$). Infected individuals with myelopathy had a frequency of $CD107a^+$ CTLs 3 times lower than infected individuals without myelopathy ($P=0.047$). There was no difference in the expression of CD107a molecule CTLs in the two infected groups. IFN- γ intracellular expression in cytotoxic T-lymphocytes from HAM/TSP patients was 2-fold lower than in CTL from ACM patients ($P>0.05$, 2.6 and 5.2, respectively).

The PBMC proportion expressing IL-15 was three times higher in individuals infected with HTLV-1 (15.2%) compared to uninfected controls (4.1%, $P=0.0001$). The frequency of $CD14^+IL-15^+$ was also higher in patients infected by this virus ($P=0.0005$). The majority (89%) of HTLV-1-infected patients showed more than 90% of $CD14^+$ cells expressing surface IL-15. The evaluation of the infected patients stratified according to proviral load revealed similar results between $PVL<1\%$ and $PVL\geq 1\%$ groups (Figure 5).

Discussion

Cytotoxic T-lymphocytes are immune system cells that play an important role in the response against infections caused by intracellular pathogens. Given the impasse regarding the role of CTLs in the pathogenesis of HAM/TSP, we evaluated in this study the phenotype and function of CD8⁺ T-lymphocytes from HTLV-1-infected patients with and without myelopathy. Our results showed a reduction in the frequency of CTLs with activity degranulation in HAM/TSP group compared to the infected group without neurological involvement.

The analysis of the infected groups showed similar median of the frequency of CTLs, confirming data from another study conducted in same country (31). In contrasting, a study performed by Brito-Melo and cols showed CD8⁺ T lymphocytes proportion increased in patients with HAM/TSP compared to asymptomatic for myelopathy and HTLV-1 seronegative groups (32). The increase of the CTL population in infected patients may reflect a result of continuous stimulation feature of HTLV-1-infection, which triggers activation and expansion of immune system cells (17). However, in our study, this CTLs quantitative change was not associated with the presence of neurological symptoms or proviral load.

As shown in the Figure 2, the HTLV-1 infection promoted expansion of CTLs subpopulations TEMRA and TEM at the expense of naive and TCM subpopulations, similar to phenotypic distribution of memory specific CTLs reported in Cytomegalovirus and HTLV-2 infection (33, 34). A study conducted previously showed increased percentage of CTLs TEM and TEMRA in HTLV-1-infected patients with HAM/TSP compared to uninfected individuals (35). Here, we reaffirm the high frequency of CTLs TEM from HAM/TSP group compared to uninfected group and we propose that the CTLs TEMRA predominance is related to HTLV-1 infection, independent of the neurological damage presence.

Infected individuals with PVL \geq 1% presented a slight reduction in the frequency of CTLs CD107a⁺, as well as expression decreased of this molecule on the membrane surface. This finding is in agreement with the report of under expression of genes encoding cytotoxic mediators in infected individuals with high proviral load (36). The HAM/TSP group showed reduction of the CTLs CD107a⁺ frequency and equivalent expression of this protein compared to ACM group, suggesting the CTLs from this group degranulate more intense. In Japan, a study conducted by Sabouri and collaborators showed reduction of HTLV-1-specific CTL positive for CD107a in patients with HAM/TSP compared to infected individuals without

neurological symptoms (37). These authors also demonstrated that this change in the degranulation was not associated with proviral load, since the result sustained when patients with the paired proviral load was evaluated. In a complementary way, our study demonstrated for the first time there is a reduction of the CD8⁺ T-lymphocytes total population with degranulation activity in HAM/TSP group compared to infected group without myelopathy.

Like the HTLV-1 infection promotes cell activation and thus overproduction of inflammatory cytokines, we performed the IFN- γ intracellular detection in CTLs from HTLV-1-infected patients. Our results suggest that CD8⁺ T cells from patients with HAM/TSP express a lower amount of IFN- γ in relation to ACM group. Comparing this finding, another study conducted in the city of Salvador reported that the inflammatory cytokines production, including IFN- γ , by CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes was higher in HAM/TSP group than ACM group (38). This discrepancy in the results in the same geographic region may have been caused by methodological differences. Reiterating the results of analysis of granzyme B, the group with PVL<1% had fewer CD8⁺ T cells polyfunctional (CD107a⁺ IFN- γ ⁺) and IFN- γ ⁺ than PVL \geq 1%. These data suggest a dysfunction of CTLs in infected patients with high proviral load. In our study also showed that HTLV-1-infected individuals have greater proportion CTLs CD107a⁺ IFN- γ ⁺ than uninfected controls. Furthermore, we showed that the ACM and HAM/TSP groups have similar frequency of polyfunctional CTLs. Corroborating these data, Manuel and cols documented that HAM/TSP did not constitute one modifier factor of the frequency of CTLs CD107a⁺IFN- γ ⁺ (39). On the other hand, has been described in the literature that HTLV-1-infected individuals without myelopathy have CD8⁺ T cells CD107a⁺ IFN- γ ⁺ percentage reduced compared to patients with HAM/TSP (27).

The CTL activation and expansion are positively modulated by interleukin 15 (IL-15) (40, 41). In this study, we evaluated the expression of IL-15 surface isoform on CD14⁺ cells and PBMC. HTLV-1-infected patients presented an increase of PBMC and CD14⁺ cells expressing IL-15, as well as increased expression of this cytokine isoform compared to uninfected controls. The infected patients groups did not differ in the percentage of cells expressing IL-15. Thus, our data suggest that the increase in the frequency of cells positive for IL-15 is a consequence of HTLV-1 infection and is not associated with the HAM/TSP development.

Persistent antigenic stimulation can induce CTL exhaustion in HTLV-1 infection, as demonstrated in other chronic infections (42, 43). The exhaustion state can be characterized

by functional impairment and increase of co-inhibitory molecules negatively modulating the response to infection (44). In patients with HAM/TSP has been reported that Tax-specific CTL express reduced levels of TIM-3, an exhaustion marker, compared to infected individuals without myelopathy (45). Increased expression of TIM-3 in CTLs has been described in chronic viral infections such as HIV and associated with reduced proliferative capacity and cytokine production, features state of exhaustion (46). The reduced expression of TIM-3 in patients with HAM/TSP could be associated with an increased activation state of HTLV-1-specific CTL, supporting the contribution of these cells in the development of pathologies associated with infection by this retrovirus. On the other hand, it was showed that PD-1 expression in CTLs, another exhaustion marker, is correlated directly with the proviral load in HTLV-1-infected individuals (39). These authors showed increased expression of this molecule in CD8⁺ T-lymphocytes from HAM/TSP group compared to ACM. Thus, CTLs from HAM/TSP group would be in a state of exhaustion, a condition that would corroborate the reduction of the amount of CTLs with degranulation activity observed in our work.

In this study, all experiments were performed with fresh blood samples, differing from many works of the area. This is an important point of our work, because the cryopreservation process of the cells can modify the cellular phenotype and metabolism. In summary, our results showed that HTLV-1 infection induces CD8⁺ T-lymphocytes activation and suggest that HTLV-1-infected patients with HAM/TSP exhibit impairment cellular immune response to infection due to reduced cytotoxic potential, reflected by decreasing the amount of CD8⁺ T-lymphocytes with degranulation activity compared to infected patients without myelopathy. Further studies will be conducted to evaluate the efficiency of degranulation activity in HTLV-1-specific CTLs and to investigate the expression of exhaustion markers, as well as cytokine receptors and surface molecules of activation and inhibition present in CTLs.

References

1. Mueller N, Okayama A, Stuver S, Tachibana N. Findings from the Miyazaki Cohort Study. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1996;13(1):S2-7.
2. Gessain A, Mahieux R. Tropical spastic paraparesis and HTLV-1 associated myelopathy: clinical, epidemiological, virological and therapeutic aspects. *Rev Neurol (Paris).* 2012 Mar;168(3):257-69.
3. de The G, Bomford R. An HTLV-I vaccine: why, how, for whom? *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1993;9(5):381-6.
4. Catalan-Soares B, Carneiro-Proietti AB, Proietti FA. Human T-cell lymphotropic virus in family members of seropositive blood donors: silent dissemination. *Revista Panamericana de Salud Pública.* 2004;16(6):387-94.
5. Carneiro-Proietti ABF, Ribas JGR, Catalan-Soares BC, Martins ML, Brito-Melo GE, Martins-Filho OA, et al. Infection and disease caused by the human T cell lymphotropic viruses type I and II in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 2002;35(5):499-508.
6. Dourado I, Alcantara LC, Barreto ML, da Gloria Teixeira M, Galvao-Castro B. HTLV-I in the general population of Salvador, Brazil: a city with African ethnic and sociodemographic characteristics. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2003;34(5):527-31.
7. Bangham CR. HTLV-1 infections. *Journal of Clinical Pathology.* 2000;53(8):581-6.
8. Bangham CR, Osame M. Cellular immune response to HTLV-1. *Oncogene.* 2005 Sep;24(39):6035-46.
9. Lepoutre V, Jain P, Quann K, Wigdahl B, Khan ZK. Role of resident CNS cell populations in HTLV-1-associated neuroinflammatory disease. *Front Biosci.* 2009;14:1152-68.
10. Nagai M, Usuku K, Matsumoto W, Kodama D, Takenouchi N, Moritoyo T, et al. Analysis of HTLV-I proviral load in 202 HAM/TSP patients and 243 asymptomatic HTLV-I carriers: high proviral load strongly predisposes to HAM/TSP. *J Neurovirol.* 1998;4(6):586-93.
11. Richardson JH, Edwards AJ, Cruickshank JK, Rudge P, Dalgleish AG. In vivo cellular tropism of human T-cell leukemia virus type 1. *J Virol.* 1990;64(11):5682-7.
12. Hanon E, Stinchcombe JC, Saito M, Asquith BE, Taylor GP, Tanaka Y, et al. Fratricide among CD8+ T Lymphocytes Naturally Infected with Human T Cell Lymphotropic Virus Type I. *Immunity.* 2000;13(5):657-64.
13. Koyanagi Y, Itoyama Y, Nakamura N, Takamatsu K, Kira J, Iwamasa T, et al. In vivo infection of human T-cell leukemia virus type I in non-T cells. *Virology.* 1993;196(1):25-33.
14. Knight SC, Macatonia SE, Cruickshank K, Rudge P, Patterson S. Dendritic cells in HIV-1 and HTLV-1 infection. *Adv Exp Med Biol.* 1993;329:545-9.
15. Nath MD, Ruscetti FW, Petrow-Sadowski C, Jones KS. Regulation of the cell-surface expression of an HTLV-I binding protein in human T cells during immune activation. *Blood.* 2003;101(8):3085-92.
16. Lehky TJ, Jacobson S. Induction of HLA class II in HTLV-I infected neuronal cell lines. *J Neurovirol.* 1995;1(2):145-56.
17. Azran I, Schavinsky-Khrapunsky Y, Aboud M. Role of Tax protein in human T-cell leukemia virus type-I leukemogenicity. *Retrovirology.* 2004;1:20.
18. Ballard DW, Bohnlein E, Lowenthal JW, Wano Y, Franza BR, Greene WC. HTLV-I tax induces cellular proteins that activate the kappa B element in the IL-2 receptor alpha gene. *Science.* 1988;241(4873):1652-5.
19. Asquith B, Mosley AJ, Barfield A, Marshall SE, Heaps A, Goon P, et al. A functional CD8+ cell assay reveals individual variation in CD8+ cell antiviral efficacy and explains differences in human T-lymphotropic virus type 1 proviral load. *J Gen Virol.* 2005 May;86(Pt 5):1515-23.
20. Hanon E, Hall S, Taylor GP, Saito M, Davis R, Tanaka Y, et al. Abundant tax protein expression in CD4+ T cells infected with human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) is prevented by cytotoxic T lymphocytes. *Blood.* 2000 Feb;95(4):1386-92.

21. Bangham CR. The immune control and cell-to-cell spread of human T-lymphotropic virus type 1. *J Gen Virol.* 2003 Dec;84(Pt 12):3177-89.
22. Jacobson S. Immunopathogenesis of human T cell lymphotropic virus type I-associated neurologic disease. *J Infect Dis.* 2002 Dec;186 Suppl 2:S187-92.
23. Biddison WE, Kubota R, Kawanishi T, Taub DD, Cruikshank WW, Center DM, et al. Human T cell leukemia virus type I (HTLV-I)-specific CD8+ CTL clones from patients with HTLV-I-associated neurologic disease secrete proinflammatory cytokines, chemokines, and matrix metalloproteinase. *J Immunol.* 1997 Aug;159(4):2018-25.
24. Barmak K, Harhaj EW, Wigdahl B. Mediators of central nervous system damage during the progression of human T-cell leukemia type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Neurovirol.* 2003 Oct;9(5):522-9.
25. Kubota R, Kawanishi T, Matsubara H, Manns A, Jacobson S. Demonstration of human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) tax-specific CD8+ lymphocytes directly in peripheral blood of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients by intracellular cytokine detection. *J Immunol.* 1998 Jul;161(1):482-8.
26. Azimi N, Brown K, Bamford RN, Tagaya Y, Siebenlist U, Waldmann TA. Human T cell lymphotropic virus type I Tax protein trans-activates interleukin 15 gene transcription through an NF- κ B site. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1998 March 3, 1998;95(5):2452-7.
27. Enose-Akahata Y, Oh U, Grant C, Jacobson S. Retrovirally induced CTL degranulation mediated by IL-15 expression and infection of mononuclear phagocytes in patients with HTLV-I-associated neurologic disease. *Blood.* 2008 Sep;112(6):2400-10.
28. Toulza F, Heaps A, Tanaka Y, Taylor GP, Bangham CR. High frequency of CD4+FoxP3+ cells in HTLV-1 infection: inverse correlation with HTLV-1-specific CTL response. *Blood.* 2008;111(10):5047-53.
29. Michaelsson J, Barbosa HM, Jordan KA, Chapman JM, Brunialti MK, Neto WK, et al. The frequency of CD127low expressing CD4+CD25high T regulatory cells is inversely correlated with human T lymphotropic virus type-1 (HTLV-1) proviral load in HTLV-1-infection and HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *BMC Immunol.* 2008;9(41):1471-2172.
30. Dehee A, Cesaire R, Desire N, Lezin A, Bourdonne O, Bera O, et al. Quantitation of HTLV-I proviral load by a TaqMan real-time PCR assay. *J Virol Methods.* 2002;102(1-2):37-51.
31. SOUZA LAG. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E IMUNOLÓGICA DA INFECÇÃO PELO VÍRUS LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T HUMANAS [DISSERTAÇÃO]. BELÉM: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ; 2009.
32. Brito-Melo GE, Martins-Filho OA, Carneiro-Proietti AB, Catalan-Soares B, Ribas JG, Thorum GW, et al. Phenotypic study of peripheral blood leucocytes in HTLV-I-infected individuals from Minas Gerais, Brazil. *Scand J Immunol.* 2002;55(6):621-8.
33. Champagne P, Ogg GS, King AS, Knabenhans C, Ellefsen K, Nobile M, et al. Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes. *Nature.* 2001;410(6824):106-11.
34. Oliveira AL, Hayakawa H, Schor D, Leite AC, Espíndola OM, Waters A, et al. High frequencies of functionally competent circulating Tax-specific CD8+ T cells in human T lymphotropic virus type 2 infection. *J Immunol.* 2009 Sep;183(5):2957-65.
35. Johnson-Nauroth JM, Graber J, Yao K, Jacobson S, Calabresi PA. Memory lineage relationships in HTLV-1-specific CD8+ cytotoxic T cells. *J Neuroimmunol.* 2006 Jul;176(1-2):115-24.
36. Vine AM, Heaps AG, Kaftantzi L, Mosley A, Asquith B, Witkover A, et al. 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.* 2004 Oct;173(8):5121-9.
37. Sabouri AH, Usuku K, Hayashi D, Izumo S, Ohara Y, Osame M, et al. Impaired function of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-specific CD8+ T cells in HTLV-1-associated neurologic disease. *Blood.* 2008 Sep;112(6):2411-20.

38. Santos SB, Porto AF, Muniz AL, de Jesus AR, Magalhaes E, Melo A, et al. Exacerbated inflammatory cellular immune response characteristics of HAM/TSP is observed in a large proportion of HTLV-I asymptomatic carriers. *BMC Infect Dis.* 2004;4:7.
39. Manuel SL, Sehgal M, Connolly J, Makedonas G, Khan ZK, Gardner J, et al. Lack of recall response to Tax in ATL and HAM/TSP patients but not in asymptomatic carriers of human T-cell leukemia virus type 1. *Journal of clinical immunology.* 2013;33(7):1223-39.
40. Waldmann TA, Dubois S, Tagaya Y. Contrasting roles of IL-2 and IL-15 in the life and death of lymphocytes: implications for immunotherapy. *Immunity.* 2001;14(2):105-10.
41. Fehniger TA, Caligiuri MA. Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood.* 2001;97(1):14-32.
42. Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, Brown JA, Moodley ES, Reddy S, et al. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature.* 2006;443(7109):350-4.
43. Golden-Mason L, Palmer BE, Kassam N, Townshend-Bulson L, Livingston S, McMahon BJ, et al. Negative immune regulator Tim-3 is overexpressed on T cells in hepatitis C virus infection and its blockade rescues dysfunctional CD4+ and CD8+ T cells. *J Virol.* 2009;83(18):9122-30.
44. Jin HT, Anderson AC, Tan WG, West EE, Ha SJ, Araki K, et al. Cooperation of Tim-3 and PD-1 in CD8 T-cell exhaustion during chronic viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(33):14733-8.
45. Ndhlovu LC, Leal FE, Hasenkrug AM, Jha AR, Carvalho KI, Eccles-James IG, et al. HTLV-1 tax specific CD8+ T cells express low levels of Tim-3 in HTLV-1 infection: implications for progression to neurological complications. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(4):e1030.
46. Jones RB, Ndhlovu LC, Barbour JD, Sheth PM, Jha AR, Long BR, et al. Tim-3 expression defines a novel population of dysfunctional T cells with highly elevated frequencies in progressive HIV-1 infection. *J Exp Med.* 2008;205(12):2763-79.

FIGURA 1

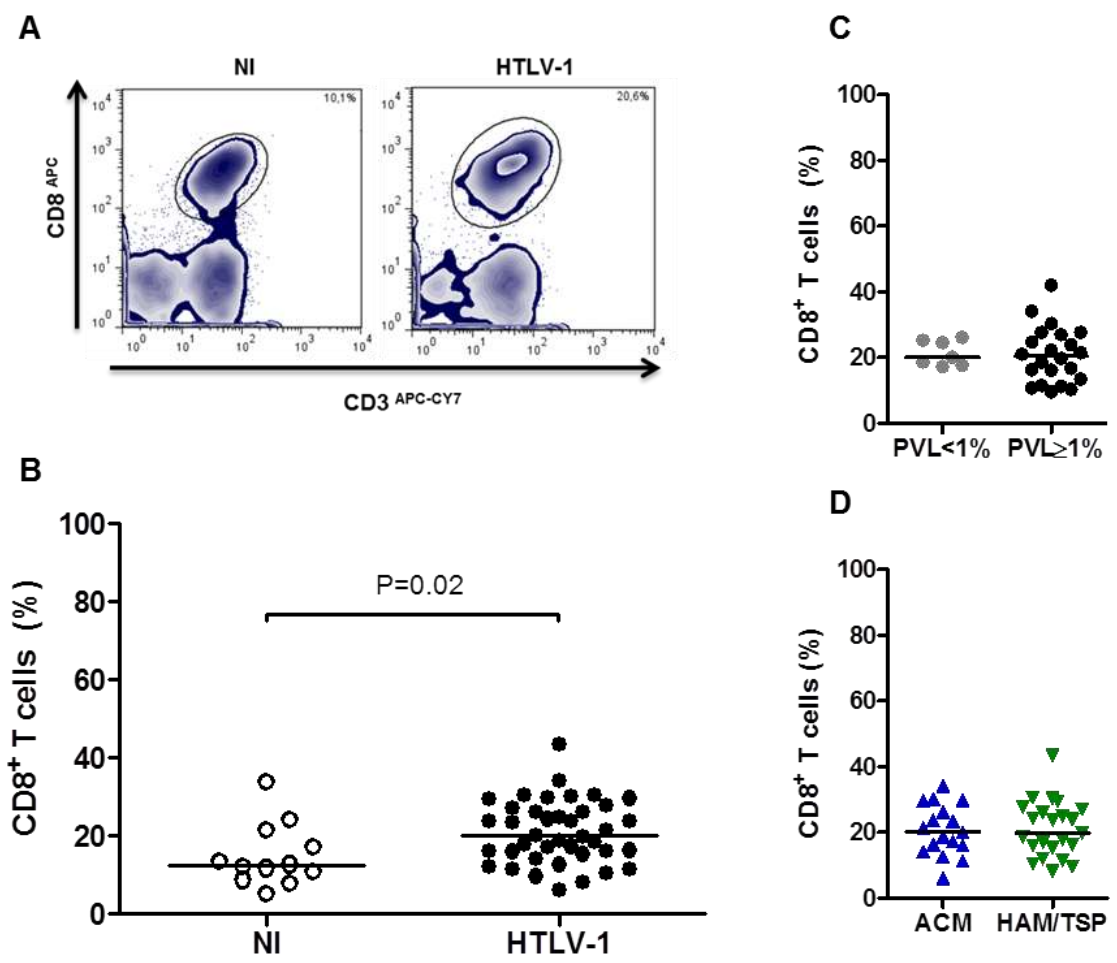


FIGURA 2

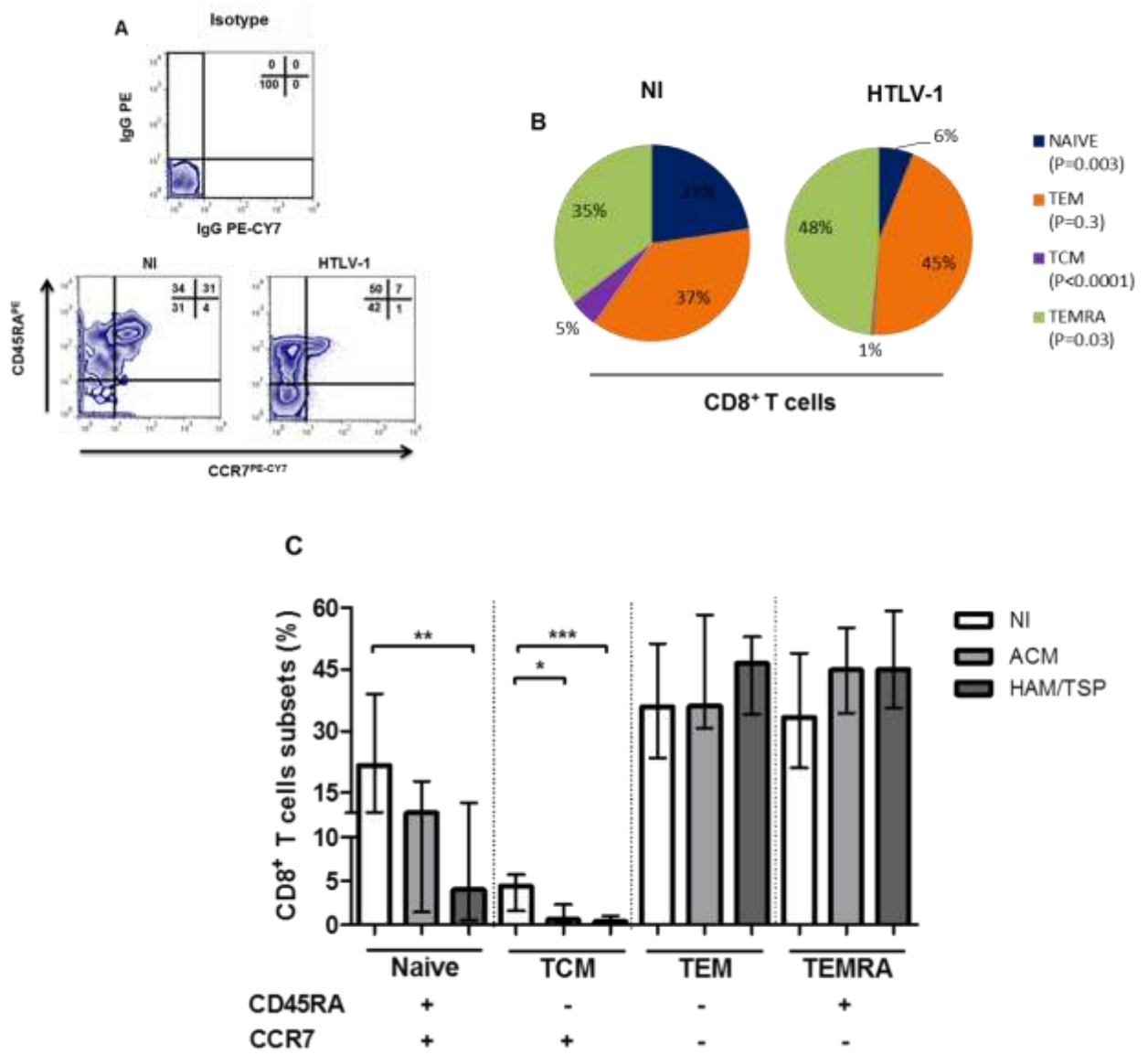


FIGURA 3

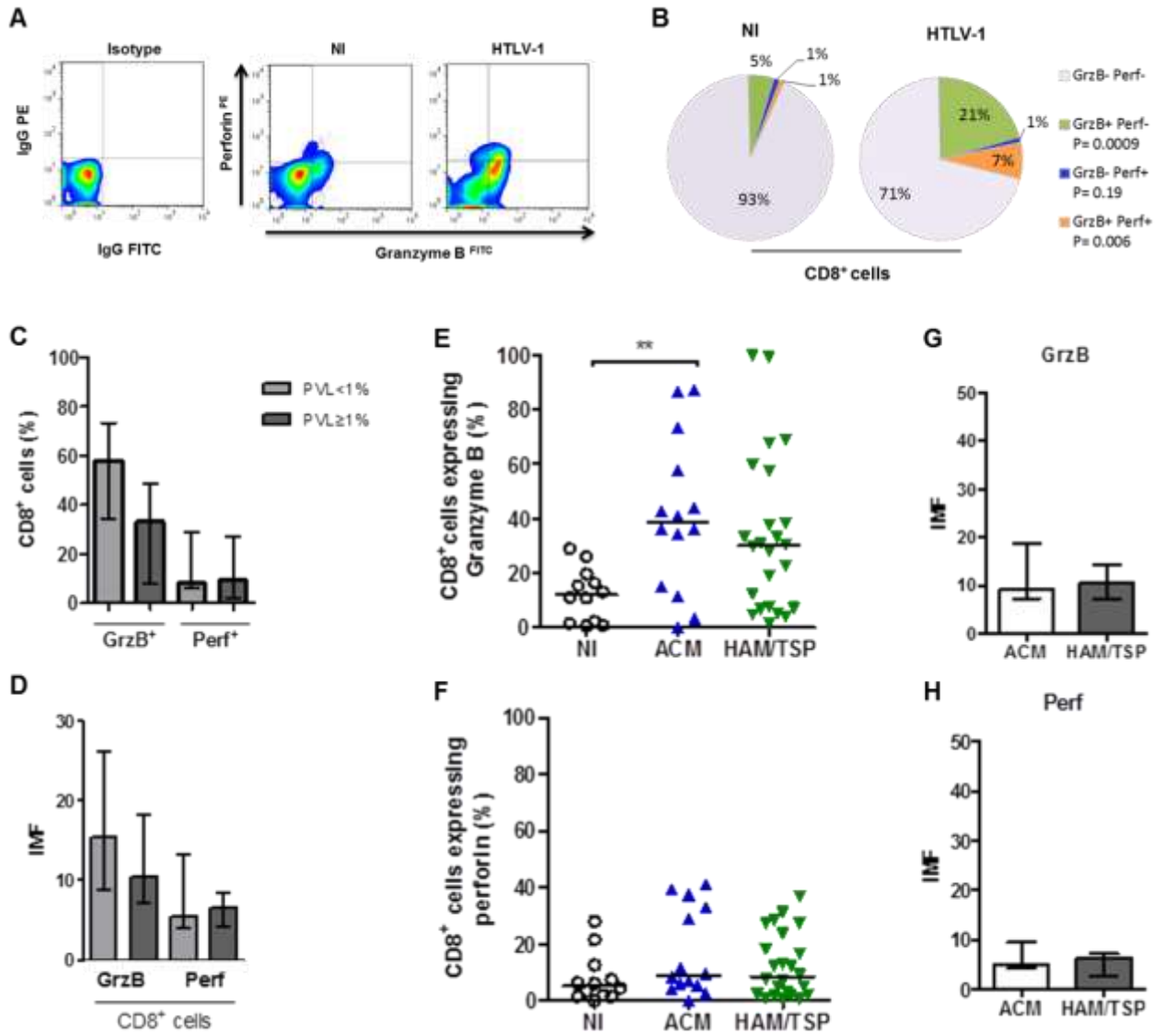


FIGURA 4

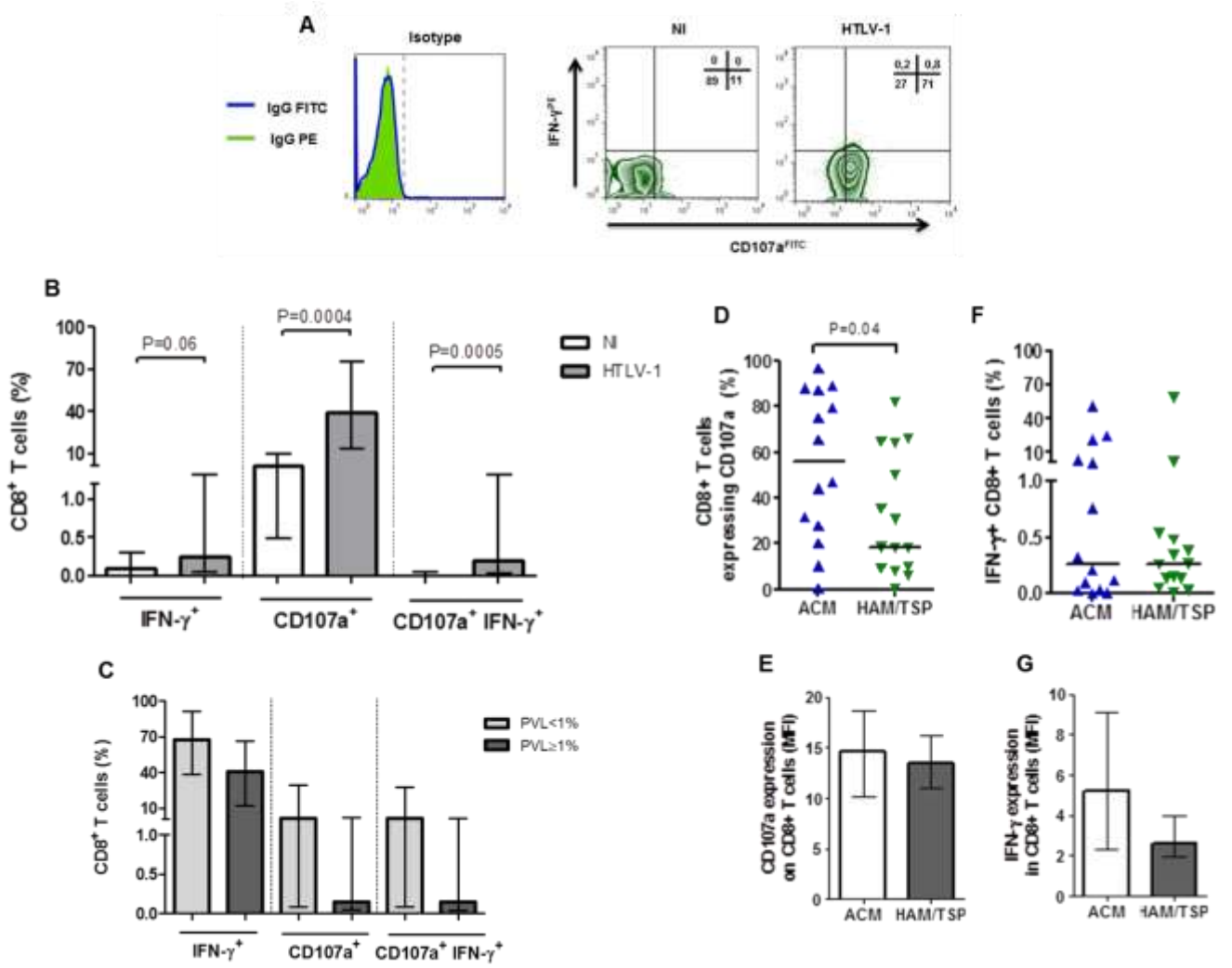
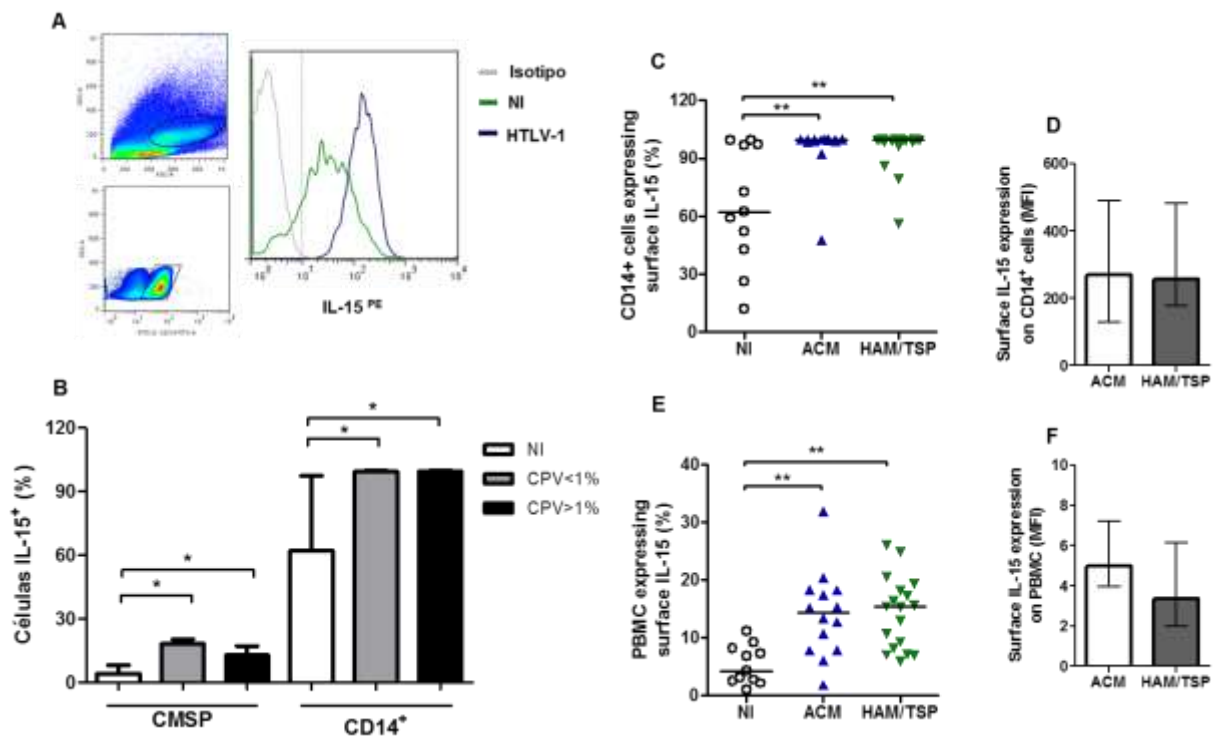


FIGURA 5



Legends

Figure 1. Frequency of cytotoxic T-lymphocytes. Flow cytometry assays were performed with fresh whole blood samples. **A/B)** Plots representatives and graphics of the CTLs frequency from non-infected (NI = 12) and infected (HTLV-1 = 43) groups. **C)** Frequency of CTLs of the infected patients groups with PVL <1% (n = 7) and PVL ≥ 1% (n = 22). **D)** Comparison of the CTLs frequency between the ACM (n=17) and HAM/TSP (n = 23) groups. The horizontal lines correspond to the median frequency. Statistical analyses were performed by the Mann-Whitney test. Differences were considered significant if P<0.05. NI: uninfected control. HTLV-1: infected with HTLV-1. ACM: asymptomatic carrier for myelopathy. HAM/TSP: HTLV-1-associated myelopathy/spastic tropical paraparesis.

Figure 2. Distribution of CTLs subsets: naive and memory. **(A)** Representatives analysis of the isotype controls and NI and HTLV-1 groups. **(B)** Distribution of populations of CD8⁺ naive, TCM (central memory), TEM (effector memory) and TEMRA (highly differentiated effector memory) from the NI and HTLV-1 groups. **(C)** Comparison of the frequencies CTL subpopulations - naive and memory - among NI, ACM and HAM/TSP groups. The bars represent the median with interquartile range. Statistical analyses were performed by the Mann-Whitney and Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-tests. Differences were considered significant if P ≤ 0.05. *P<0.05. **P<0.005. ***P <0.0005.

Figure 3. Granzyme B (GrzB) and Perforin (Perf) expression in CD8⁺ cells. Representation of the analysis **(A)** and distribution **(B)** of CD8⁺ cells positive for GrzB and/or Perf from NI (n=12) and HTLV-1 (n=43) groups. **(C)** Frequency of CD8⁺ cells expressing GrzB or Perf. **(D)** Expression (fluorescence intensity - MFI) of GrzB and Perf in CD8⁺ cells from infected individuals with PVL <1% (n = 7) and PVL ≥ 1% (n=21) (10,000 copies/10⁶ blood mononuclear cells peripheral). Frequency of CD8⁺ cells expressing GrzB **(E)** Perf **(F)**. Fluorescence intensity of GrzB **(G)** and Perf **(H)** in CD8⁺ cells from infected individuals without myelopathy (ACM = 14) and with the myelopathy (HAM /TSP = 24). The horizontal lines and the bars indicate the median and interquartile range for each group. Statistical analyses were performed by the Mann-Whitney and Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-test. Differences were considered significant if P ≤ 0.05. ** P<0.005

Figure 4. Spontaneous degranulation and IFN-γ intracellular detection in CD8⁺ T-lymphocytes. The peripheral blood mononuclear cells were obtained by Ficoll gradient and cultured in the absence of extrinsic stimulus for 6 hours. The frequency of CTLs IFN-γ producers and/or expressing CD107a was determined by flow cytometry. **(A)** Plots representatives of the analysis of isotype controls and NI (n = 10) and HTLV-1 (n = 34) groups. **(B, D, F)** Frequency of CD8⁺ T cells expressing CD107a and/or IFN-γ. **(C)** Percentage of CTLs CD107a⁺ and/or IFN-γ⁺ from infected individuals with PVL <1% (n=6) and PVL ≥ 1% (n=16) (10,000 copies/10⁶ peripheral blood mononuclear cells). **(E, G)** Fluorescence intensity (MFI) of IFN-γ and CD107a. The horizontal lines and the bars indicate the median and interquartile range for each group. Statistical analyses were performed by the Mann-Whitney and Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-test. Differences were considered significant if P≤ 0.05.

Figure 5. Expression of surface IL-15 on PBMC and CD14⁺ cells. The peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained by Ficoll gradient and cultured without further stimulation for 5 hours. Subsequently, the cells were stained with antibodies and analyzed by flow cytometry. 11 uninfected individuals (NI) and 32 patients infected with HTLV-1 (ACM, n = 14; HAM / TSP, n = 18) were evaluated. **(A)** Representation of the analysis of isotype controls and CD14⁺ IL-15⁺ cells from HTLV-1 and NI groups. **(B)** Comparison of the percentage of IL-15⁺ cells from infected individuals with PVL <1% (n=7) and PVL ≥ 1% (n=21) (10,000 copies/10⁶ PBMC). Percentage of CD14⁺ cells **(C)** and PBMC **(E)** expressing surface IL-15. Fluorescence intensity (MFI) of the surface IL-15 on CD14⁺ **(D)** cells and PBMC **(F)**. The horizontal lines and the bars indicate the median and interquartile range for each group. Statistical analyses were performed by the Mann-Whitney and Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-test. Differences were considered significant if P≤ 0.05. *P<0.05. **P <0.005.

ANEXOS

ANEXO 1 - Critérios clínicos e laboratoriais da OMS para a definição HAM/TSP.

I. Critérios clínicos
O quadro clínico florido de paraparesia espástica crônica não é sempre visto quando o paciente apresenta: um sintoma ou sinal clínico único pode ser a única evidência de HAM/TSP incipiente.
A. Idade e sexo: maioria dos casos esporádicos é em adultos, mas às vezes familiares; ocasionalmente em crianças; predomínio de mulheres.
B. Início: geralmente insidioso, mas pode ser agudo.
C. Principais manifestações neurológicas: <ol style="list-style-type: none"> 1. Paraparesia espástica crônica, de progressão lenta, que permanece estática após um progresso inicial. 2. Fraqueza dos membros inferiores, de predomínio proximal. 3. Os distúrbios vesicais são uma característica inicial; constipação geralmente ocorre mais tarde; impotência e libido diminuída são comuns. 4. Sintomas sensitivos, tais como formigamento, queimação etc., são mais proeminentes que os sinais físicos objetivos. 5. Dor lombar baixa com irradiação para as pernas é comum. 6. A sensibilidade vibratória está frequentemente alterada; a propriocepção é menos frequentemente afetada. 7. Hiper-reflexia dos membros inferiores, frequentemente com clônus e sinal de Babinski. 8. Hiper-reflexia dos membros superiores; sinais de Hoffmann e Trömner positivos são frequentes; fraqueza pode estar ausente. 9. Reflexo mandibular exagerado em alguns pacientes.
D. Achados neurológicos menos frequentes: Sinais cerebelares, atrofia óptica, surdez, nistagmo, deficiências em outros nervos cranianos, tremor dos dedos e mãos, hipo- ou arreflexia aquiliana. Convulsões, distúrbio cognitivo, demência ou distúrbio da consciência são raros.
E. Outras manifestações neurológicas que podem estar associadas à PET/MAH: Atrofia muscular, fasciculações (raras), polimiosite, neuropatia periférica, polirradiculopatia, neuropatia de nervos cranianos, meningite, encefalopatia.
F. Manifestações sistêmicas associadas à PET/MAH: Alveolite linfocitária pulmonar, uveíte, síndrome de Sjögren, artropatia, vasculite, ictiose, crioglobulinemia, gamopatia monoclonal, leucemia/linfoma de célula T do adulto.
II. Diagnóstico laboratorial
A. Presença de anticorpos HTLV-I no sangue e no líquido cefalorraquidiano.
B. O LCR pode mostrar discreta pleocitoselinfocítica.
C. Linfócitos lobulados podem estar presentes no sangue e/ou LCR.
D. Pode haver discreta a moderada hiperproteinorraquia.
E. Quando possível isolamento viral no sangue e/ou LCR.

ANEXO 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa: “Avaliação dos linfócitos T citotóxicos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 em diferentes estágios da HAM/TSP”,

Instituição: Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz./Fiocruz/Bahia
Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, Salvador-BA / CEP: 40296-710

Prezado paciente:

O Sr(a) está sendo convidado para participar desta pesquisa que pretende verificar se os pacientes infectados pelo HTLV tem alguma diferença na atividade das células do sangue. Mais especificamente, procuraremos obter informações sobre os linfócitos das pessoas que tem doença neurológica causada pelo HTLV-1. A infecção pelo HTLV-1 pode causar dois tipo de doença: uma leucemia (câncer de glóbulos brancos do sangue) ou uma doença do sistema nervoso, que causa paralisia. A cura para essas doenças ainda não foi encontrada e ainda não sabemos por que algumas pessoas adoecem enquanto outras não. Para que seja possível realizar esta pesquisa pedimos a doação de uma amostra de sangue que permitirá estudar suas células sanguíneas. Essas amostras serão obtidas no momento em que exames de sangue forem necessários para o seu próprio acompanhamento clínico. Aproveitaremos o pedido de coleta de sangue para o exame de rotina, e solicitaremos ao laboratório que retire um pouco a mais (cerca de 5 colheres de sopa) para esta pesquisa. Assim sendo, o número de vezes que o sangue será retirado não será maior do que o realmente necessário para o acompanhamento de rotina e não será necessário vir ao Centro médico apenas com o objetivo de participar da pesquisa. A coleta de sangue será realizada por um profissional treinado, entretanto pode ocorrer uma dor ligeira e um pequeno sangramento no local da picada, ficando o braço roxo. Esta mancha desaparece dentro de 1 a 2 dias. A sua participação neste estudo é voluntária e espontânea. A sua assistência médica não será modificada em função da sua aceitação ou não em participar deste estudo. Também não envolverá nenhum custo adicional. Caso necessite regressar ao hospital por razões ligadas ao estudo, suas despesas com transporte e alimentação serão pagas pelos responsáveis pela pesquisa. Além disso, você poderá desistir de participar a qualquer momento sem que isto interfira no tratamento futuro neste hospital. O material obtido de sua amostra de sangue (plasma e células) será utilizado neste estudo e armazenado em repositório, sendo utilizado posteriormente apenas sob aprovação deste comitê de ética. Toda a informação obtida ou disponibilizada neste estudo será considerada como sigilosa de modo a garantir confidencialidade e não será divulgada sem a sua permissão. Para que outros médicos possam no futuro ampliar seus conhecimentos sobre esta doença, gostaríamos de mostrar os resultados obtidos neste projeto em congressos (pôster ou apresentação oral) e em publicações em revistas científicas. Por outro lado, nos comprometemos a não dizer seu nome e a utilizar os resultados obtidos apenas com finalidade científica.

Pesquisador responsável: Dra. Rita Elizabeth Moreira Mascarenhas

Contato. Os pesquisadores poderão responder a todas as suas dúvidas antes e durante o curso da pesquisa, através do telefone 71 3176-2213. Caso queira, o Sr (a) poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisas da Fiocruz pelo telefone 3176-2285

Declaração do paciente

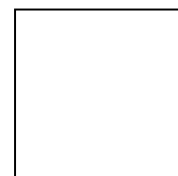
Eu, _____, voluntariamente concordo em participar do estudo “Avaliação dos linfócitos T citotóxicos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 em diferentes estágios da HAM/TSP”. Declaro ter lido e compreendido esta declaração, na qual fui informado (a) de todos os dados importantes sobre a conduta deste estudo, bem como de ter recebido uma cópia deste consentimento livre e esclarecido.

Assinatura do participante _____

Data: ____/____/____

Comitê de Ética em Pesquisa – Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz

Rua Waldemar Falcão, 121, Candeal, Salvador-BA / CEP: 40296-710



Impressão Dactiloscópica