



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS DA SAÚDE**



**DIMINUIÇÃO DA RESPOSTA IMUNE AO
TOXOIDE TETÂNICO EM INDIVÍDUOS
INFECTADOS PELO HTLV-1**

Anselmo de Santana Souza

Tese de Doutorado

Salvador (Bahia), 2012

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de
Saúde, SIBI - UFBA.

S729 Souza, Anselmo de Santana
Diminuição da resposta imune ao toxoide tetânico em
indivíduos infectados pelo HTLV-1 / Anselmo de Santana
Souza. – Salvador, 2012.
64 f. il.

Orientador: Prof. Dr. Edgar Marcelino de Carvalho Filho

Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia.
Faculdade de Medicina da Bahia, 2012.

1. HTLV-1. 2. Linfócitos. 3. Monócitos. 4. Imunologia. I.
Carvalho Filho, Edgar Marcelino de. II. Universidade Federal
da Bahia. III. Título.

CDU 616.83



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS DA SAÚDE



DIMINUIÇÃO DA RESPOSTA IMUNE AO TOXOIDE TETÂNICO EM INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HTLV-1

Anselmo de Santana Souza

Professor-orientador: Edgar Marcelino de Carvalho

Tese apresentada ao Colegiado do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia, como pré-requisito obrigatório para a obtenção do grau de **Doutor** em Ciências da Saúde, da área de concentração em Imunologia.

Salvador (Bahia), 2012

COMISSÃO EXAMINADORA

Membros Titulares:

- Dra. Maria Fernanda Rios Grassi, Pesquisadora Titular da Fundação Oswaldo Cruz e Professora Adjunta da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública.
- Dra. Luciana Santos Cardoso, Professora auxiliar da Universidade Estadual da Bahia.
- Dra. Silvane Maria Braga Santos, Professora Adjunta da Universidade Estadual de Feira de Santana.
- Dr. Roque Pacheco de Almeida, Professor Adjunto da Universidade Federal de Sergipe.
- Dr. Sérgio Marcos Arruda, professor adjunto da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública.

Membro Suplente:

- Dr. Edgar Marcelino de Carvalho Filho, Professor Titular da Universidade Federal da Bahia.

*“Aprender é a única coisa de que a mente
nunca se cansa, nunca tem medo e nunca
se arrepende.”*

Leonardo da Vinci

À minha família, pelo apoio e
companheirismo durante esta longa
jornada.

EQUIPE

- Silvane Maria Braga Santos, doutora em Imunologia.
- Maria de la Glória Orge, psicóloga do Ambulatório Multidisciplinar de HTLV-1.
- Thaís Delavechia, psicóloga do Ambulatório Multidisciplinar de HTLV-1.
- Camila Amorim, mestranda do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde.
- Natália Carvalho, doutora em Imunologia pela Universidade Federal de Minas Gerais.
- Lúcia Passos, enfermeira do Ambulatório Multidisciplinar de HTLV-1.
- Davi Tanajura, neurologista e doutorando do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde.
- Tânia Luna, doutora em Imunologia.

INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

- Complexo do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (COM-HUPES).
 - Serviço de Imunologia.
 - Ambulatório Magalhães Neto

FONTES DE FINANCIAMENTO

1. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).
2. National Institute of Health (NIH).

AGRADECIMENTOS

Aos colaboradores do Ambulatório Multidisciplinar de HTLV-1, por prestarem um excelente atendimento aos pacientes e estarem sempre à disposição para esclarecimentos diversos: Dra. Valéria Bittencourt, Dr. Davi Tanajura, Dr. André Muniz, Dra. Maria de Lourdes, Dr. Matheus Tannus, Dra. Rosana Andrade, Dislene Santos, Lúcia Passos, Glória Orge e Thaís Delavechia.

Aos amigos da secretaria do Serviço de Imunologia (SIM), Orlando, Elbe, Lúcia Reis, Érica Castilho, Cristiano e Dílson, pelo ótimo trabalho que executam e pela amizade construída.

À Dilma Simplício e Dorival Silva, pela constante ajuda na coleta de sangue dos pacientes e controles sadios.

Aos amigos pós-graduandos e pós-graduados do SIM, Pedro Paulo, Ludmila Polari, Andréa Magalhães, Luís Henrique, Adriano Queirós, Luciane Lima, Aline Báfica, pela convivência harmoniosa e pelos momentos de concentração e distração.

Aos grandes amigos, Thaís Delavechia, Angela Giudice, Rosana Sousa, Márcia Nascimento, Joyce Moura, Juliana Almeida, Lílian Medina, Viviane Magalhães, Silvana Santos, Kátia Salgado, Thiago Marconi, Aline Muniz e Lucas Fedrigo. Amizades verdadeiras e pessoas maravilhosas para os estudos, *happy hours* e o que ocorrer.

Ao gerente de projetos Paulo Lessa, sem ele os trabalhos no SIM ficariam difíceis de serem executados.

Aos chefes dos laboratórios do SIM, Dra. Olívia Bacellar, Dra. Maria Ilma Araújo, Dr. Paulo Machado, Dr. Albert Schriefer, Dra. Lea Castellucci, Dra. Sara Passos e Dr. Lucas Carvalho. Obrigado pela atenção, disponibilidade de ajudar nos trabalhos, suas coerentes e sábias sugestões para a pesquisa e, obviamente, amizade e cordialidade.

Aos membros do Laboratório de HTLV-1 do SIM, Camila Amorim, Dra. Natália Carvalho, Glória Orge, Thaís Delavechia, Dra. Tânia Luna, Adriana Dourado e Dra. Silvane Santos. Obrigado pela ótima convivência, harmonia, amizade e, sobretudo, paixão pela pesquisa.

À Dra. Jaci Andrade do Centro de Referência para Imunobiológicos Especiais (CRIE), HUPES, UFBA, pelo apoio na elaboração do protocolo de imunização para tétano e no manejo dos pacientes.

À minha *teacher* Silvane Santos, exemplo de mulher, mãe e pesquisadora. Obrigado por ter me recebido de braços abertos no Laboratório de HTLV-1; pelos ensinamentos, conselhos e opiniões que, com certeza, ficarão para meu futuro profissional.

Agradecimento especial para meu professor-orientador Dr. Edgar Carvalho. Exemplo de médico-professor-pesquisador. Sua inteligência e perspicácia são empolgantes e influenciam seus próximos. Obrigado por ter me aceitado para trabalhar no Laboratório de HTLV-1 e no SIM.

ÍNDICE

Índice de tabelas	13
Índice de figuras	14
Lista de Abreviaturas	15
RESUMO	17
INTRODUÇÃO	18
1) Epidemiologia da infecção pelo HTLV-1	18
2) Estrutura do HTLV-1	19
3) Manifestações clínicas associadas ao HTLV-1	20
4) Resposta imune na infecção pelo HTLV-1	21
5) Resposta imune a antígenos virais e não virais na infecção pelo HTLV-1	24
HIPÓTESES	26
OBJETIVOS	27
MATERIAIS E MÉTODOS	28
1) População de estudo	28
2) Protocolo de imunização e sorologia para toxoide tetânico (TT)	29
3) Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (CMSP)	30
4) Determinação da produção de citocinas	30
5) Avaliação da expressão de citocinas em linfócitos	30
6) Avaliação da expressão de moléculas coestimulatórias e citocinas em monócitos	31
7) Análise estatística	32
8) Desenho experimental	33
Resultados Gerais	34
1) Características da população de estudo	34
2) Resposta imune humoral para TT	34
3) Determinação da produção de citocinas	35
4) Expressão de citocinas em linfócitos	37
5) Expressão de HLA-DR, CD80, CD86 e citocinas em monócitos	40
Discussão	45
Propostas de Estudo	51
Resumo dos resultados	52
Conclusão	53
Summary	54
Referências Bibliográficas	55
Anexos	64
Anexo 1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	
Anexo 2. Ofício do Comitê de Ética em Pesquisa da MCO - UFBA	
Anexo 3. Artigo 1 – Decrease of the immune response against tetanus toxoid in HTLV-1 infected subjects.	
Anexo 4. Normas de publicação da revista Retrovirology.	
Anexo 5. Publicação científica no período de 2009-2012.	

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1. Idade e gênero dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 e controles sadios.	34
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Protocolo de imunização com toxoide tetânico e avaliação imunológica nos dias 0, 30 e 60. 29
- FIGURA 2.** Títulos de anticorpos IgG anti-TT de indivíduos infectados pelo HTLV-1 (n = 14) e controles saudios (n = 12) pré e pós-imunização para tétano. Linha representa mediana. * p = 0,001 (teste de Wilcoxon); ** p = 0,007 (teste de Mann-Whitney) D.O. = densidade óptica. 35
- FIGURA 3.** Produção de IFN- γ (A), TNF (B) e IL-10 (C) por CMSPs de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e controles saudios sem estímulo e estimuladas com TT (0,5 Lf/mL), pré e pós-imunização. Análise estatística realizada pelo teste de Wilcoxon para avaliar a produção de citocinas por células estimuladas com TT pré e pós-imunização. 36
- FIGURA 4.** Plots representativos ilustrando as estratégias utilizadas para analisar os dados da expressão de citocinas (IFN- γ , TNF e IL-10) em linfócitos (células CD4⁺ e CD8⁺) de controles saudios e indivíduos infectados pelo HTLV-1. 37
- FIGURA 5.** Expressão de IFN- γ em linfócitos T CD4⁺ (A) e T CD8⁺ (B), estimulados com TT, de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e controles saudios pré e pós-imunização. Valor de p calculado pelo teste de Mann-Whitney. 38
- FIGURA 6.** Expressão de TNF em linfócitos T CD4⁺ (A) e T CD8⁺ (B), estimulados com TT, de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e controles saudios pré e pós-imunização. Valores de p calculados pelos testes de Mann-Whitney e Wilcoxon. 39
- FIGURA 7.** Expressão de IL-10 em linfócitos T CD4⁺ (A) e T CD8⁺ (B), estimulados com TT, de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e controles saudios pré e pós-imunização. Valor de p calculado com teste de Mann-Whitney. 40
- FIGURA 8.** Plots representativos ilustrando as estratégias utilizadas para analisar os dados da expressão de moléculas de superfície (HLA-DR, CD80 e CD86) e citocinas (IFN- γ , TNF e IL-12) em monócitos (células CD14⁺) de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e controles saudios. 41
- FIGURA 9.** Expressão de HLA-DR (A), CD80 (B) e CD86 (C) em monócitos CD14⁺ de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e de controles saudios não estimulados ou estimulados com TT (0,5 Lf/mL). Análise estatística realizada pelo teste de Wilcoxon. MIF = média de intensidade de fluorescência. 42
- FIGURA 10.** Expressão de TNF (A), IL-12 (B) e IL-10 (C) em monócitos CD14⁺ de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e de controles saudios não estimulados ou estimulados com TT (0,5 Lf/mL). Análises estatísticas realizadas pelo teste de Wilcoxon e Mann-Whitney. 44

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	Células apresentadoras de antígeno (<i>Antigen-Presenting Cells</i>).
ATLL	Leucemia/linfoma de células T do adulto (<i>Adult T-cell leucemia/lymphoma</i>).
CD4	Grupo de diferenciação-4 (Cluster differentiation-4).
CMSP	Célula mononuclear do sangue periférico.
D.O.	Densidade Óptica.
ELISA	Ensaio imunoenzimático (<i>Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay</i>).
Foxp3	Marcador intracelular para linfócitos T regulatórios (<i>Forkhead box P3</i>).
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de monócitos e granulócitos.
HAM/TSP	Mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (<i>HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis</i>).
HBZ	Fator baseado em leucina do HTLV-1 (<i>HTLV-1 basic leucine zipper factor</i>).
HLA-DR	Antígeno leucocitário humano-DR (<i>Human leukocyte antigen-DR</i>).
HTLV-1	Vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 1 (<i>Human T-cell lymphotropic virus type-1</i>).
IFN- γ	Interferon-gama.
IgE	Imunoglobulina E.
IgG	Imunoglobulina G.
IL	Interleucina.
IL-2R	Receptor de interleucina-2.
LPS	Lipopolissacarídeo.
LTC	Linfócitos T CD8 ⁺ citotóxico.
LTR	Longa sequência de repetições (<i>Long terminal repeats</i>).

NFκB	Fator de transcrição nuclear kappa-beta.
pNPP	para-nitrofenil fosfato.
PPD	Derivado proteico purificado de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .
T _H 1	Linfócitos T CD4 ⁺ auxiliar-1
TNF	Fator de necrose tumoral (<i>Tumor Necrosis Factor</i>).
TT	Toxoide tetânico.

RESUMO

DIMINUIÇÃO DA RESPOSTA IMUNE AO TOXOIDE TETÂNICO EM INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HTLV-1. O HTLV-1 é o agente etiológico da leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL) e da mielopatia associada ao HTLV-1 (HAM/TSP). Tem-se documentado que células mononucleares de indivíduos infectados não proliferam quando estimuladas com antígenos não relacionados ao vírus como, por exemplo, derivado proteico purificado de *Mycobacterium tuberculosis* (PPD) e toxoide tetânico (TT). Alguns fatores que podem estar relacionados a essa falta de resposta são as funções de células T regulatórias e disfunção de células apresentadoras de antígeno. **Objetivo:** Avaliar a resposta imune de indivíduos infectados pelo HTLV-1 ao toxoide tetânico. **Materiais e Métodos:** Foram selecionados portadores assintomáticos do HTLV-1 baixo produtor de IFN- γ e controles sadios. Realizou-se sorologia para TT. Os indivíduos soronegativos para TT foram imunizados. Antes e após imunização, fez-se a sorologia para TT e avaliação da expressão de citocinas (IFN- γ , TNF e IL-10) por linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ estimulados com TT. Os monócitos dos pacientes e controles, estimulados com TT, foram avaliados para a expressão de HLA-DR, CD80, CD86, TNF, IL-12 e IL-10 antes da imunização. **Resultados:** Após imunização, os pacientes apresentaram menores títulos de IgG anti-TT quando comparados com os controles ($p = 0,007$). As células mononucleares dos pacientes, estimuladas com TT, não aumentaram a produção de IFN- γ , TNF e IL-10 após imunização. A frequência de linfócitos T CD4⁺ expressando IFN- γ , TNF e IL-10, após estímulo, foi menor nos pacientes do que nos controles pós-imunização ($p = 0,01$, $p = 0,04$ e $p = 0,01$, respectivamente). Os monócitos dos pacientes não aumentaram a expressão de HLA-DR após estímulo com TT. A expressão de TNF e IL-12 por monócitos de pacientes elevaram-se após estímulo com TT ($p = 0,009$ e $p = 0,006$, respectivamente). **Conclusões:** Os indivíduos infectados pelo HTLV-1, após esquema de vacinação, apresentaram diminuição da resposta imune humoral e celular contra TT. Os monócitos destes pacientes exibiram uma disfunção na apresentação antigênica através do mecanismo de expressão de HLA-DR, porém, o segundo sinal (expressão de CD80 e CD86) e expressão de citocinas não apresentaram anormalidades. Tais resultados sugerem que estes mecanismos imunológicos podem participar no aumento da susceptibilidade dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 a adquirir outras doenças infecciosas.

Palavras-chave: 1. HTLV-1; 2. Linfócitos; 3. Monócitos; 4. Imunologia.

INTRODUÇÃO

1) EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO PELO HTLV-1

O vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1) foi o primeiro retrovírus identificado (Poiesz, Ruscetti *et al.*, 1980).

Mundialmente aproximadamente 10 a 20 milhões de pessoas podem estar infectadas pelo HTLV-1 (Edlich, Hill *et al.*, 2003). As regiões com maiores prevalências da infecção são o Japão, Caribe, África subsaariana e a América do Sul (Maloney, Murphy *et al.*, 1991; Gessain e De The, 1996; Mueller, Okayama *et al.*, 1996; Catalan-Soares, Carneiro-Proietti *et al.*, 2005).

No Brasil, a prevalência da infecção pelo HTLV-1 é variada nas diversas regiões do país (Catalan-Soares, Carneiro-Proietti *et al.*, 2005). Em estudo de base populacional, foi registrado que a cidade de Salvador, no estado da Bahia, possui a maior prevalência da infecção pelo HTLV-1: 1,8% da população geral (Dourado, Alcantara *et al.*, 2003). É necessário que sejam realizados estudos epidemiológicos para a atualização deste dado.

As informações sobre a infecção pelo HTLV-1 são obtidas, principalmente, a partir do rastreamento da presença de anticorpos específicos para o vírus em doadores de sangue. Galvão-Castro e cols. (1997) demonstraram que 1,38% dos doadores de sangue da cidade de Salvador, Bahia, estavam infectados pelo HTLV-1, sendo, portanto, a maior prevalência do país (Galvão-Castro, Loures *et al.*, 1997). Dentre as Unidades da Federação, a Bahia, juntamente com Pará e Maranhão, possui uma das maiores prevalências de doadores de sangue infectados pelo HTLV-1, acima de 9/1000 indivíduos (Catalan-Soares, Carneiro-Proietti *et al.*, 2005). É importante salientar que, neste mesmo estudo, foi possível identificar a diminuição de doadores de sangue infectados pelo HTLV-1, o que pode ser explicado pela obrigatoriedade dos bancos de sangue em detectar a presença de anticorpos para HTLV-1/2 em doadores.

O HTLV-1 é transmitido pelas vias sexual, vertical e pelo compartilhamento de seringas e agulhas contaminadas entre usuários de drogas (Manns, Wilks *et al.*, 1992). Uma das principais vias de transmissão é a vertical, da mãe para o filho, através do aleitamento materno (Kinoshita, Hino *et al.*, 1984; Ureta-Vidal, Angelin-Duclos *et al.*, 1999).

2) ESTRUTURA DO HTLV-1

O HTLV-1 pertence à família Retroviridae, subfamília Orthoretrovirinae, gênero *Deltaretrovirus*. O envelope viral é composto por proteínas de superfície e transmembrana, codificadas pelo gene *env*. O capsídeo é composto por proteínas que são codificadas pelo gene *gag*, possui uma forma icosaédrica e abriga o pequeno genoma viral. No interior do capsídeo está presente o genoma e as enzimas transcriptase reversa e integrase (Yoshida, 2001).

O genoma do HTLV-1 consiste de um RNA de fita simples. As duas extremidades do RNA possuem sequências repetidas de nucleotídeos chamadas de LTR (*long terminal repeats*), que auxiliam na integração do genoma viral ao genoma humano. Os genes responsáveis pela regulação transcricional do HTLV-1 estão presentes na LTR (Yoshida, 2001). O DNA proviral é composto por 9 mil pares de bases (Seiki, Hattori *et al.*, 1983).

A extremidade 3' do RNA viral é a região pX, em que é encontrada o gene *tax*, que codifica a proteína Tax, importante para a manutenção do vírus (Kiyokawa, Seiki *et al.*, 1984; Lee, Coligan *et al.*, 1984; Yoshida, 2001). Tax induz ativação da transcrição do provírus e o estado de imortalidade da célula hospedeira (Younis e Green, 2005)

Recentemente, um novo gene tem sido alvo de estudo: o fator de zíper de leucina básico do HTLV-1 (*hbz*, *HTLV-1 basic leucine zipper factor*). O *hbz* é encontrado na extremidade 3' da LTR e codificado pela cadeia complementar do genoma viral (Gaudray, Gachon *et al.*, 2002). A proteína HBZ suprime os efeitos da ativação mediada por Tax (Basbous, Arpin *et al.*, 2003). O mRNA de HBZ é intensamente expresso em células de pacientes com leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL), induzindo o aumento da proliferação de células T (Mesnard, Barbeau *et al.*, 2006). Além disso, HBZ parece participar da patogênese da mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP, *HTLV-1 associated mielopathy/tropical spastic paraparesis*), visto que foi correlacionado com a severidade da doença, carga proviral e níveis elevados de neopterin (Saito, Matsuzaki *et al.*, 2009).

3) MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS ASSOCIADAS AO HTLV-1

Na década de 80, o HTLV-1 foi identificado nos Estados Unidos a partir de linhagens de células T de paciente com linfoma cutâneo de células T (Poiesz, Ruscetti *et al.*, 1980). Anteriormente, pesquisadores japoneses descreveram uma doença que atingia células T denominada leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL) que, mais tarde, foi associada à infecção pelo HTLV-1 (Uchiyama, Yodoi *et al.*, 1977; Takatsuki, 2005).

A ATLL é uma forma agressiva de leucemia/linfoma, consistindo de uma expansão oligoclonal ou monoclonal de células T CD4⁺ e células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (Higuchi e Fujii, 2009; Shembade e Harhaj, 2010). Caracteriza-se pela presença de infiltrados celulares na pele, fígado, trato gastrointestinal e pulmões, hipercalcemia e presença de linfócitos atípicos em formato de flor (*flower cells*) no sangue periférico (Matsuoka, 2005).

Na década de 60, descreveu-se a paraparesia espástica tropical (*tropical spastic paraparesis* - TSP) em indivíduos da Índia e Jamaica. Após a descoberta do HTLV-1, observou-se que mais de 50% dos indivíduos com TSP possuíam anticorpos anti-HTLV-1/2 (Mani, Mani *et al.*, 1969; Gessain, Barin *et al.*, 1985). Em 1986, pesquisadores japoneses associaram a infecção pelo HTLV-1 a uma mielopatia crônica, que passou a ser denominada mielopatia associada ao HTLV-1 (*HTLV-1 associated myelopathy* - HAM) (Osame, Usuku *et al.*, 1986). Devido à presença de anticorpos anti-HTLV-1 tanto na TSP quanto em HAM, adotou-se o termo HAM/TSP.

A HAM/TSP é uma síndrome de desmielinização de início insidioso caracterizada por um dano no sistema nervoso central (SNC), especialmente na porção mais baixa do cordão espinhal (Bangham, 2000; Ribas e Melo, 2002). Paraparesia, sinais piramidais e sintomas urinários são observados em quase 100% dos indivíduos com HAM/TSP. Além destes sintomas, constipação intestinal, diminuição da libido, impotência sexual, dor lombar e atrofia muscular são relatados nestes pacientes (Caskey, Morgan *et al.*, 2007; Carod-Artal, Mesquita *et al.*, 2008).

Apesar de essas duas doenças serem intensamente associadas à infecção pelo HTLV-1, somente 5 a 10% dos portadores desenvolvem ATLL ou HAM/TSP (Maloney, Cleghorn *et al.*, 1998), enquanto a maioria dos indivíduos infectados permanece como portadores assintomáticos. Outras doenças têm sido associadas à infecção pelo HTLV-1: síndrome de Sjögren (Nakamura, Ikebe-Hiroki *et al.*, 1997; Giozza, Santos *et al.*, 2008); artropatias (Nishioka, Maruyama *et al.*, 1989); uveíte (Mochizuki, Watanabe *et al.*, 1992) e dermatite

infecçiosa (Lagrenade, Hanchard *et al.*, 1990). Além destas alterações, osteoporose (Schachter, Cartier *et al.*, 2003) e periodontite (Garlet, Giozza *et al.*, 2010) também têm sido relacionadas à infecção pelo HTLV-1.

Tem sido demonstrada uma maior frequência de sintomas neurológicos, disfunção erétil e distúrbios urinários nos portadores do HTLV-1, quando comparados com indivíduos controles, sugerindo que o espectro de doenças associadas ao vírus é maior do que o descrito na literatura (Caskey, Morgan *et al.*, 2007; Oliveira, Castro *et al.*, 2010). Um dos principais sintomas neurológicos presentes na infecção pelo HTLV-1, na ausência de HAM/TSP, é a bexiga hiperativa (Castro, Rodrigues *et al.*, 2007; Silva, Coutinho *et al.*, 2009). Noctúria, urgência e incontinência são os principais sintomas urinários da bexiga hiperativa. Comparados com indivíduos soronegativos, portadores do HTLV-1 tem uma maior frequência destes sintomas (Caskey, Morgan *et al.*, 2007; Poetker, Porto *et al.*, 2011). Em relação aos fatores urodinâmicos, hiperreflexia do detrusor foi encontrado na maioria dos portadores do HTLV-1 sem HAM/TSP. Portadores do HTLV-1 com bexiga hiperativa são considerados como oligossintomáticos, sendo a bexiga hiperativa apontada como uma manifestação inicial da HAM/TSP (Castro, Freitas *et al.*, 2007).

Uma das evidências de que a bexiga hiperativa é uma manifestação inicial da mielopatia é o aumento da carga proviral. É conhecido que pacientes com HAM/TSP apresentam uma elevada carga proviral quando comparados com portadores assintomáticos (Nagai, Usuku *et al.*, 1998; Matsuzaki, Nakagawa *et al.*, 2001; Olindo, Lezin *et al.*, 2005) e os portadores de bexiga hiperativa encontram-se como um grupo intermediário (Costa, Santos *et al.*, 2012; Santos, Oliveira *et al.*, 2012).

4) RESPOSTA IMUNE NA INFECÇÃO PELO HTLV-1

O HTLV-1 possui um tropismo preferencial para os linfócitos T CD4⁺ (Chen, Quan *et al.*, 1983; Richardson, Edwards *et al.*, 1990; Yamano, Cohen *et al.*, 2004). Porém, outros tipos celulares também podem ser alvos do vírus: linfócitos T CD8⁺, células dendríticas, macrófagos e linfócitos B (De Revel, Mabondzo *et al.*, 1993; Knight, Macatonia *et al.*, 1993; Yamano, Cohen *et al.*, 2004).

A proteína Tax é responsável pela ativação espontânea das células infectadas pelo vírus. Consequentemente, há indução da produção de interleucina(IL)-2 e seu receptor, IL-2R

(Ballard, Bohnlein *et al.*, 1988), gerando proliferação celular e produção espontânea de citocinas (Jacobson, Zaninovic *et al.*, 1988).

A produção espontânea de citocinas pelos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ pode ser observada tanto em portadores assintomáticos quanto em pacientes com HAM/TSP. Quando comparadas com portadores assintomáticos, células mononucleares de indivíduos com HAM/TSP produzem níveis elevados de TNF e IFN- γ sem a necessidade de estímulo com mitógeno (Santos, Porto *et al.*, 2004). Esta observação demonstra um perfil de resposta imune do tipo T_H1 na infecção pelo HTLV-1, mas citocinas do perfil T_H2, como IL-10 e IL-5, também são detectadas em culturas de células mononucleares de indivíduos portadores assintomáticos do vírus, o que não é observado em cultura de células de indivíduos saudáveis (Carvalho, Bacellar *et al.*, 2001).

Células mononucleares de portadores assintomáticos do HTLV-1 produzem níveis elevados de IL-10 quando comparadas com células de indivíduos saudáveis. A produção desta citocina pode estar relacionada à manutenção do status clínico destes indivíduos, impedindo a produção exacerbada de citocinas inflamatórias (Brito-Melo, Peruhype-Magalhaes *et al.*, 2007). Em estudo *in vitro*, a adição exógena de IL-10 em cultura de células mononucleares provenientes de portadores assintomáticos é capaz de modular a produção de IFN- γ , ao contrário do que é observado em células de pacientes com HAM/TSP (Santos, Porto *et al.*, 2006).

Além das citocinas inflamatórias, as quimiocinas do perfil T_H1, CXCL9 e CXCL10, também são espontaneamente produzidas em portadores do HTLV-1. Níveis elevados destas quimiocinas são detectados em pacientes com HAM/TSP quando comparados com portadores assintomáticos (Narikawa, Fujihara *et al.*, 2005; Guerreiro, Santos *et al.*, 2006; Santos, Oliveira *et al.*, 2012).

Devido à intensa resposta T_H1, os indivíduos infectados pelo HTLV-1 podem apresentar modulação da resposta T_H2, o que pode influenciar na defesa contra outros agentes infecciosos como *Strongyloides stercoralis* (Gotuzzo, Terashima *et al.*, 1999). Neste caso, os indivíduos coinfectados pelo HTLV-1/*S. stercoralis* apresentam uma diminuição da produção de citocinas do tipo T_H2 (IL-4, IL-5 e IL-13) e do anticorpo IgE, os quais são essenciais para a eliminação do helminto (David, Vadas *et al.*, 1980; Carvalho e Da Fonseca Porto, 2004). Consequentemente, a frequência das formas grave e disseminada da estrogiloidíase é maior entre os indivíduos coinfectados (Porto, Alcantara *et al.*, 2005).

Por outro lado, o perfil de resposta imune do tipo T_H1 influencia negativamente no controle de agentes infecciosos como, por exemplo, *Mycobacterium tuberculosis*. Estudo realizado em Salvador, Bahia, a ocorrência de óbitos foi maior entre os indivíduos coinfectados quando comparados com indivíduos somente infectados pela bactéria (Pedral-Sampaio, Martins Netto *et al.*, 1997). Recentemente foi demonstrado que indivíduos coinfectados apresentaram níveis de produção espontânea de IFN- γ e TNF maiores do que nos indivíduos somente infectados pela tuberculose. Quando as células mononucleares foram estimuladas com derivado proteico purificado (PPD) de *M. tuberculosis*, os níveis de TNF foram menores nos casos (HTLV-1 e tuberculose) do que nos controles (somente tuberculose), o que sugere que há uma anormalidade na resposta imune inicial contra o *M. tuberculosis* nos indivíduos coinfectados (Bastos, Santos *et al.*, 2012)

Além dos linfócitos T CD4⁺, os linfócitos T CD8⁺ citotóxicos (LTCs) também são importantes na resposta imune contra o vírus. Por serem capazes de reconhecer a proteína Tax, tornam-se o principal mecanismo de defesa na infecção pelo HTLV-1 (Nishiura, Nakamura *et al.*, 1996; Hanon, Hall *et al.*, 2000). Assim como as células T CD4⁺, os LTCs contribuem para a produção espontânea de IL-2, IFN- γ e TNF em portadores assintomáticos e são as principais fontes de citocinas pró-inflamatórias em indivíduos com HAM/TSP (Goon, Igakura *et al.*, 2003; Santos, Porto *et al.*, 2004). A progressão da infecção viral está associada com expressão elevada da proteína HBZ. Pela sua capacidade de suprimir a ação de Tax e sua apresentação aos LTCs, HBZ diminui a capacidade destas células em eliminar o vírus (Macnamara, Rowan *et al.*, 2010). Mesmo com a baixa expressão de Tax, os LTCs permanecem ativados e produzem citocinas pró-inflamatórias, as quais podem estar associadas ao desenvolvimento da HAM/TSP (Biddison, Kubota *et al.*, 1997; Kubota, Kawanishi *et al.*, 1998). Adicionalmente, a diminuição da expressão de moléculas coestimulatórias (CD28, CD80, CD86 e CD152) é mais frequente em pacientes com HAM/TSP do que em portadores assintomáticos (Sabouri, Usuku *et al.*, 2008).

As células dendríticas também são infectadas pelo vírus, principalmente em indivíduos com HAM/TSP (Macatonia, Cruickshank *et al.*, 1992). Recentemente foi demonstrado que células dendríticas das linhagens plasmocitoide, linfoide ou derivadas de monócitos, também são infectadas pelo HTLV-1 e são capazes de transmitir o vírus para as células T *in vitro* (Jones, Petrow-Sadowski *et al.*, 2008). As células dendríticas são essenciais para a apresentação da proteína Tax para os linfócitos T, o que induz a ativação, a proliferação e a produção de citocinas por estas células (Jain, Ahuja *et al.*, 2007). Monócitos de indivíduos

sadios são capazes de amadurecer para células dendríticas, aumentando a expressão de moléculas de superfície celular como CD1a e HLA-DR. No entanto, monócitos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 são incapazes de diferenciarem para células dendríticas, tanto na morfologia quanto na expressão destas moléculas de superfície (Nascimento, Lima *et al.*, 2011). Adicionalmente, há diminuição da expressão de HLA-DR em células dendríticas de pacientes com ATLL (Makino, Wakamatsu *et al.*, 2000).

Apesar da intensa informação sobre os linfócitos T, pouco se sabe do papel das células apresentadoras de antígeno (APC), principalmente os monócitos/macrófagos, no mecanismo imunológico associado à infecção pelo HTLV-1.

5) RESPOSTA IMUNE A ANTÍGENOS VIRAIS E NÃO VIRAIS NA INFECÇÃO PELO HTLV-1

A proteína viral Tax é importante para a manutenção da carga viral e o principal alvo da resposta imune na infecção pelo HTLV-1. Os LTCs são essenciais para a eliminação de células infectadas pelo vírus, desde que haja apresentação antigênica. As células T CD4⁺ são capazes de apresentar o antígeno Tax para os LTCs, que destrói a célula infectada por mecanismo de apoptose (Hanon, Hall *et al.*, 2000). No entanto, estudo recente demonstrou que os linfócitos T CD8⁺ específicos para Tax são raros e não totalmente funcionais tanto em portadores assintomáticos quanto em indivíduos com ATLL (Takamori, Hasegawa *et al.*, 2011), evidenciando um mecanismo de persistência da infecção viral.

Além de Tax, o HTLV-1 expressa p30, uma proteína regulatória. O aumento de p30 inibe a expressão do receptor tipo-Toll-4 (*Toll-like receptor-4*, TLR4) em macrófagos de pacientes com ATLL. Esta alteração dificulta o início da resposta imune contra bactérias Gram-negativas e diminui a produção de citocinas e quimiocinas inflamatórias como, por exemplo, TNF, IL-8 e CCL2, porém, aumenta a produção de IL-10 (Datta, Sinha-Datta *et al.*, 2006). Estas mudanças na resposta imune inata podem influenciar na ocorrência de infecções oportunistas em indivíduos portadores do HTLV-1 (White, Zaknoen *et al.*, 1995).

É conhecido que, *in vitro*, as células mononucleares de indivíduos infectados pelo HTLV-1 proliferam na ausência de mitógenos (Popovic, Flomenberg *et al.*, 1984; Kramer, Jacobson *et al.*, 1989; Jacobson, Gupta *et al.*, 1990). Tal proliferação poderia auxiliar na eliminação de microrganismos causadores de doenças infecciosas. No entanto, tal fator de

proteção parece não ocorrer e as doenças infectocontagiosas são mais frequentes entre os indivíduos infectados pelo HTLV-1 do que nos indivíduos soronegativos para o vírus. Essa constatação serviu de base para estudos que tinham como objetivo avaliar a resposta imune contra antígenos não relacionados ao vírus.

No Japão, onde os indivíduos infectados pelo HTLV-1 possuíam uma resposta intradérmica ao PPD menor do que os soronegativos (Tachibana, Okayama *et al.*, 1988), observou-se que o nível de proliferação celular e produção de IFN- γ , após estímulo com PPD, era menor entre os indivíduos infectados pelo HTLV-1 não respondedores ao teste intradérmico (Suzuki, Dezzutti *et al.*, 1999).

Em estudo realizado no Brasil, após identificar indivíduos infectados pelo HTLV-1 que não apresentavam proliferação celular espontânea, observou-se que as células destes pacientes não proliferaram após estímulo com PPD, toxoide tetânico e antígeno de *Candida albicans* (Mascarenhas, Brodskyn *et al.*, 2006).

Alguns fatores imunológicos podem estar relacionados à anergia contra este antígenos. Visto que a adição exógena de IL-12 restaurou a produção de IFN- γ específico para PPD (Suzuki, Dezzutti *et al.*, 1999), foi sugerido que as células apresentadoras de antígeno (APC) poderiam estar envolvidas nesta anormalidade.

Além de produzirem citocinas pró-inflamatórias, os indivíduos portadores do HTLV-1 também produzem IL-10 espontaneamente (Carvalho, Bacellar *et al.*, 2001). A produção de IL-10 em portadores assintomáticos parece estar envolvida no controle do desenvolvimento de manifestações neurológicas, o que pode ser observado *in vitro*, onde a adição exógena desta citocina é capaz de modular a produção de IFN- γ e TNF, o que não ocorre nos pacientes com HAM/TSP (Santos, Porto *et al.*, 2006).

Uma vez que indivíduos infectados pelo HTLV-1 não apresentam uma resposta imune adequada contra antígenos não relacionados ao vírus, faz-se necessária a investigação de quais mecanismos imunológicos podem estar envolvidos nesta anormalidade. O presente estudo aborda aspectos da imunidade humoral e celular na resposta ao toxoide tetânico, assim como a atividade de monócitos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 quando estimulados com este antígeno.

HIPÓTESES

Hipótese 1 – Os indivíduos infectados pelo HTLV-1 não aumentam a produção de anticorpos anti-toxoide tetânico após imunização e há anergia da resposta imune celular contra este antígeno.

Hipótese 2 – Monócitos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 possuem uma incapacidade de aumentar a expressão de moléculas coestimulatórias e citocinas após estímulo com toxoide tetânico.

OBJETIVOS

1) OBJETIVO GERAL

Avaliar a resposta imune de indivíduos infectados pelo HTLV-1 ao toxoide tetânico.

2) OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar a resposta imune humoral ao toxoide tetânico em indivíduos infectados pelo HTLV-1 antes e após imunização para tétano.
- 2) Avaliar a expressão de citocinas (IFN- γ , TNF e IL-10) em linfócitos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 antes e após imunização para tétano.
- 3) Avaliar o estado de ativação e expressão de citocinas em monócitos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 após estímulo com toxoide tetânico.

MATERIAIS E MÉTODOS

1) POPULAÇÃO DE ESTUDO

Participaram deste estudo indivíduos infectados pelo HTLV-1 que são acompanhados no Ambulatório Multidisciplinar de HTLV-1 (AMH), localizado no Ambulatório Magalhães Neto do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia.

O diagnóstico de HTLV-1 foi realizado através de teste imunoenzimático (ELISA) (Murex HTLV-1+2, Abbot, Dartford, UK) e confirmado por Western Blot (Genelabs HTLV 2.3-2.4, Singapore).

No AMH, desde 2004, vem sendo executado um estudo de coorte, cujo objetivo geral é acompanhar os indivíduos infectados pelo HTLV-1, buscando identificar a mudança de status clínico dos pacientes. O acompanhamento consiste na avaliação imunológica e determinação da carga proviral a cada dois anos e/ou quando ocorre mudança do status clínico. A produção espontânea de IFN- γ , TNF, IL-10 e IL-5 é um dos parâmetros observados na avaliação imunológica. Adicionalmente, os soros são obtidos e armazenados a -20 °C.

O desenho deste estudo é um corte transversal seguido de intervenção. A amostra foi de conveniência e os pacientes foram selecionados a partir de informações do banco de dados da coorte.

Os critérios de inclusão foram indivíduos de ambos os gêneros, de 18 a 65 anos de idade, com ausência de manifestações neurológicas associadas com a infecção pelo HTLV-1 e que concordaram em participar do estudo após assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Os critérios de exclusão foram: indivíduos que apresentavam coinfeções como o HIV, vírus das hepatites B e C, tuberculose e helmintíases; portadores de doenças crônicas e autoimunes; grávidas; em tratamento com corticoides; e que não assinaram o TCLE.

Como grupo de comparação, os controles sadios foram constituídos de indivíduos (estudantes e funcionários) do Serviço de Imunologia do COM-HUPES, negativos para HTLV-1 e que assinaram o TCLE.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Maternidade Climério de Oliveira, UFBA (Parecer/Resolução 154/2009).

2) PROTOCOLO DE IMUNIZAÇÃO E SOROLOGIA PARA TOXOIDE TETÂNICO

Os pacientes selecionados para participarem do estudo, a partir de informações do banco de dados da coorte, foram questionados sobre situação vacinal para tétano. Os indivíduos que referiram imunização prévia há mais de 10 anos e/ou comprovaram através de cartão de vacinação foram incluídos no desenho do estudo, após assinatura do TCLE. Em seguida, obteve-se amostra de sangue destes indivíduos para realização de sorologia para toxoide tetânico (TT) e avaliação da resposta imune celular. Adicionalmente, os indivíduos foram encaminhados para imunização com TT. Após o esquema de imunização, que consistiu de 60 dias, os pacientes retornaram para segunda avaliação imunológica (Figura 1).

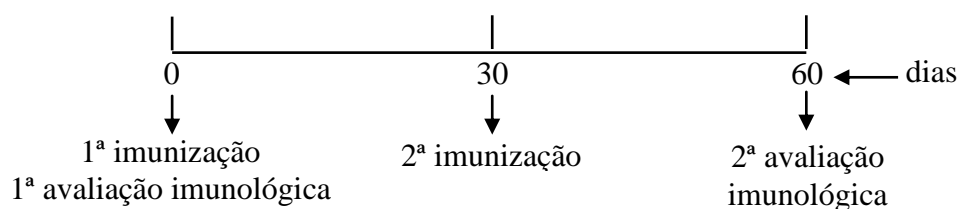


Figura 1. Protocolo de imunização com toxoide tetânico e avaliação imunológica nos dias 0, 30 e 60.

A sorologia para TT foi padronizada no laboratório. A técnica consistiu de um ELISA, em que uma placa de 96 poços foi sensibilizada com TT a 0,1 Lf/mL em tampão carbonato-bicarbonato (TCB), pH 9,6, overnight a 4 °C. Os soros dos pacientes e controles sadios foram diluídos 1:100 em PBS pH 7,2 + Tween 20 0,05% (PBS-T) e incubados por 1 hora a 37 °C. Após lavagem, anticorpo anti-IgG conjugado à fosfatase alcalina (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA), diluído 1:1.000 em PBS-T, foi adicionado. Após incubação de 1 hora a 37 °C com o conjugado, 1 mg/mL de pNPP (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA), dissolvido em TCB + MgCl₂, foi adicionado para revelação. A reação foi finalizada com NaOH 3N após 20 minutos da adição de pNPP. A leitura da placa foi feita num espectrofotômetro a 405 nm.

3) OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (CMSP)

Os pacientes e controles sadios selecionados para o estudo tiveram seu sangue coletado em tubos contendo heparina. As células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram isoladas por gradiente de densidade Ficoll-Hypaque (LSM, Organon Teknika Corporation, Durham, NS, USA). AS células foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Life Technologies GibcoBRL, Grand Island, NY, USA) contendo 10% de soro fetal bovino (Gibco, Grand Island, NY, USA) e antibióticos.

4) DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS

Antes e após imunização com TT, 3×10^6 células/mL de pacientes e controles sadios foram distribuídas em placas de 24 poços. As CMSPs foram incubadas por 72 horas, a 37 °C com 5% de CO₂. Neste tempo, as células foram estimuladas com fitohemaglutinina (PHA) e toxoide tetânico (TT) a 0,5 Lf/mL. Adicionaram-se poços contendo células não estimuladas. Os sobrenadantes das culturas foram coletados e armazenados a -20 °C.

Utilizou-se a técnica de ELISA sanduíche para dosagem das citocinas IFN- γ , TNF e IL-10 nos sobrenadantes, de acordo com as instruções do fabricante (BD Bioscience Pharmingen, San Jose, CA, USA). Os resultados foram expressos em pg/mL, a partir de uma curva-padrão gerada por citocinas recombinantes.

As concentrações das citocinas, produzidas por CMSP estimuladas com TT, foram comparadas antes e depois da imunização em ambos os grupos de estudo.

5) AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CITOCINAS EM LINFÓCITOS

Avaliou-se a expressão de citocinas em linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ de pacientes e controles sadios antes e após imunização para TT.

Parte das CMSPs obtidas na coleta de sangue dos pacientes e controles foram cultivadas por 20 horas a 37 °C, 5% de CO₂ na ausência ou presença de TT (0,5 Lf/mL). Nas últimas 4 horas de incubação, adicionou-se Brefeldin A (1 μ g/mL). Lavaram-se as células

com PBS com posterior marcação para moléculas de superfície, em que os anticorpos monoclonais anti-CD4-FITC e anti-CD8-PE-Cy5 (Pharmingen, San Diego, CA, USA) permaneceram por 20 minutos a 4 °C. Após lavagem e centrifugação com PBS, fixou-se as células com paraformaldeído a 2%. Para marcação intracitoplasmática, as células foram permeabilizadas com saponina, lavadas e centrifugadas com PBS e, em seguida, marcadas com os anticorpos anti-IFN- γ -PE, anti-IL-10-PE e anti-TNF-PE (Pharmingen, San Diego, CA, USA) por 30 minutos à temperatura ambiente. Repetiu-se o processo de lavagem e centrifugação para, posteriormente, aquisição das células no citômetro FACScanto II. Realizou-se a análise no software FlowJo, versão 7.6.1.

6) AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS COESTIMULATÓRIAS E CITOCINAS EM MONÓCITOS

Visando avaliar a função de células apresentadoras de antígeno em indivíduos infectados pelo HTLV-1 e em controles saudáveis, realizou-se a avaliação da expressão das moléculas coestimulatórias (CD80 e CD86), HLA-DR e citocinas (TNF, IL-12 e IL-10) por monócitos através da técnica de citometria de fluxo (FACS).

Após a coleta de sangue para avaliação da produção de citocinas por CMSPs, parte das células mononucleares obtidas foram adicionadas em placas de 96 poços, com fundo em “U”, numa concentração de 4×10^5 células/poço. As CMSPs foram cultivadas por 6 horas, a 37 °C em 5% de CO₂, na ausência ou presença de LPS (100 ng/mL) ou TT (0,5 Lf/mL). Para a expressão de citocinas, adicionou-se Brefeldin A (1 μ g/mL) na cultura. Ao final da cultura, as células foram lavadas com PBS e, em seguida, os anticorpos monoclonais para moléculas de superfície anti-CD14-FITC, anti-CD80-PE, anti-CD86-PE e anti-HLA-DR-PE-Cy5 (Pharmingen, San Diego, CA, USA) permaneceram 20 minutos, a 4 °C. Logo após, as células foram lavadas e centrifugadas na presença de PBS e, então, fixadas com paraformaldeído a 2%. As células fixadas, que não receberam os anticorpos monoclonais para moléculas de superfície, foram permeabilizadas com saponina e coradas com anti-IFN- γ -PE, anti-IL-10-PE e anti-TNF-PE (Pharmingen, San Diego, CA, USA). A escolha do tempo de cultura de 6 horas é devido à padronização desta técnica no laboratório.

Realizou-se a aquisição pelo citômetro FACScanto II (BD, San Jose, CA, USA). No total, 100.000 células foram obtidas. Ao final do processo, seguiu-se a análise dos dados no software FlowJo, versão 7.6.1. (Tree Star, Ashland, OR, USA).

7) ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os títulos de anticorpos IgG anti-TT e concentração de citocinas foram expressos como mediana e intervalo interquartil (IQ). Os dados de citometria de fluxo foram representados com média e desvio-padrão.

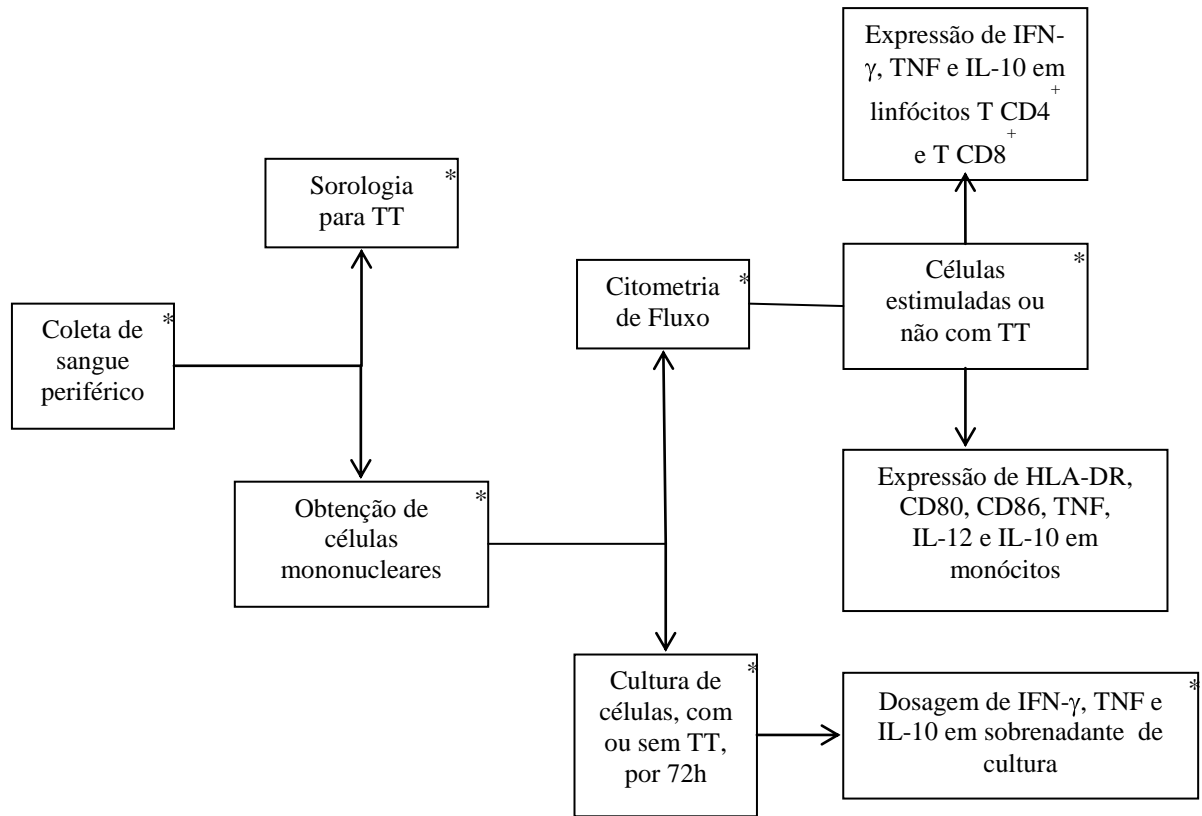
Para comparação de frequências, o teste exato de Fisher foi utilizado.

O teste de Wilcoxon foi utilizado para comparação dos dados antes e após imunização e frequência de células após estímulo com TT.

O teste não-paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para comparar os resultados entre os dois grupos.

O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Os dados foram analisados no software GraphPad Prism 5 (San Diego, CA, USA).

8) DESENHO EXPERIMENTAL

* Antes e após imunização

RESULTADOS GERAIS

1) CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO DE ESTUDO

Para este estudo, foram selecionados 14 indivíduos infectados pelo HTLV-1 e 12 indivíduos controles sadios.

A Tabela 1 mostra os dados de idade e gênero dos dois grupos de indivíduos. Os portadores assintomáticos do HTLV-1 apresentaram idade mais elevada do que os controles sadios ($47 \pm 10,3$ e $31 \pm 8,6$ anos, respectivamente, $p = 0,002$).

Quanto ao gênero, não houve diferença na proporção de homens e mulheres nos dois grupos de estudo ($p = 1,0$) (Tabela 1).

Tabela 1. Idade e gênero dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 e controles sadios.

	Portadores assintomáticos do HTLV-1 (n = 14)	Controles Sadios (n = 12)	Valor de p
Idade (média ± D.P.)	47 ± 10,3	31 ± 8,6	0,002*
Gênero (M/F)	6/8	6/6	1**

D.P. = desvio-padrão; * = teste não paramétrico de Mann-Whitney; ** = teste exato de Fisher

2) RESPOSTA IMUNE HUMORAL PARA TT

Antes da imunização os títulos de IgG anti-TT, expressos em densidade óptica (D.O.), entre indivíduos infectados pelo HTLV-1 (0,091, IQ 0,033-0,195) e controles sadios (0,182, IQ 0,026-0,388) não se mostraram estatisticamente diferente ($p = 0,3$). Após imunização, houve aumento da produção de IgG anti-TT tanto nos pacientes (0,091 vs 0,485, $p = 0,001$) quanto nos controles (0,182 vs 0,804, $p = 0,001$). Os títulos de anticorpos dos indivíduos infectados pelo HTLV-1, após imunização, foram menores quando comparados com os títulos dos controles sadios ($p = 0,007$) (Figura 2).

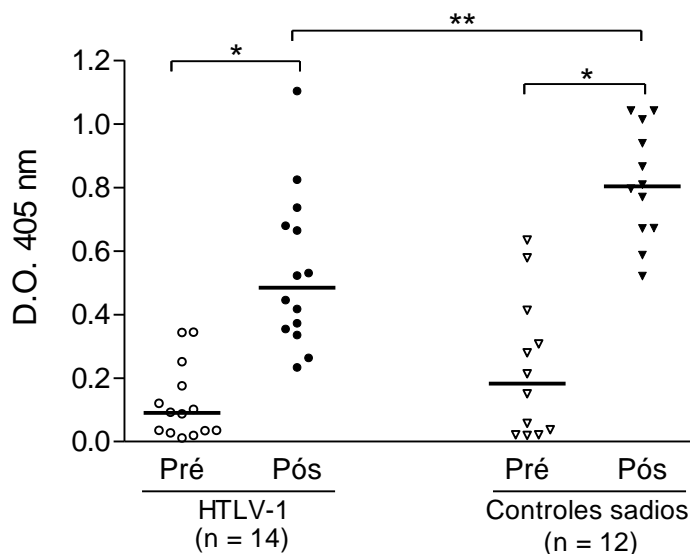


Figura 2. Títulos de anticorpos IgG anti-TT de indivíduos infectados pelo HTLV-1 (n = 14) e controles sadios (n = 12) pré e pós-imunização para tétano. Linha representa mediana. * p = 0,001 (teste de Wilcoxon); ** p = 0,007 (teste de Mann-Whitney) D.O. = densidade óptica.

3) DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS

As CMSPs dos indivíduos infectados pelo HTLV-1, após estímulo com TT, produziram níveis menores de IFN- γ após imunização com TT (2002 pg/mL, IQ 440-2647 pg/mL vs 748 pg/mL; IQ 17,5-2408 pg/mL, p = 0,2). As células mononucleares dos controles sadios aumentaram a produção de IFN- γ após imunização com TT (5 pg/mL, IQ 0-158 pg/mL vs 151 pg/mL, IQ 0-682 pg/mL, p = 0,08) (Figura 3A).

Quanto à produção de TNF por células dos pacientes estimuladas com TT, a concentração desta citocina antes da imunização obteve mediana de 1240 pg/mL (IQ 438-1742) e, após imunização, 434 pg/mL (IQ 28-2758) (p = 0,9). As CMSPs dos controles sadios, após estímulo com TT, secretaram, antes da imunização, 0 pg/mL (IQ 0-27) de TNF e, após imunização, 45 pg/mL (IQ 0-905) (p = 1,0) (Figura 3B).

Os níveis de IL-10 produzidos por CMSPs dos pacientes estimuladas com TT foram: 0 pg/mL (IQ 0-70) antes da imunização; e 0 pg/mL (IQ 0-20) após imunização (p = 0,6). Dentre os controles sadios, as concentrações desta citocina por células mononucleadas estimuladas com TT, antes e após imunização, foram de 0 pg/mL (IQ 0-139) e 61 pg/mL (IQ 3,5-276), respectivamente (p = 0,8) (Figura 3C).

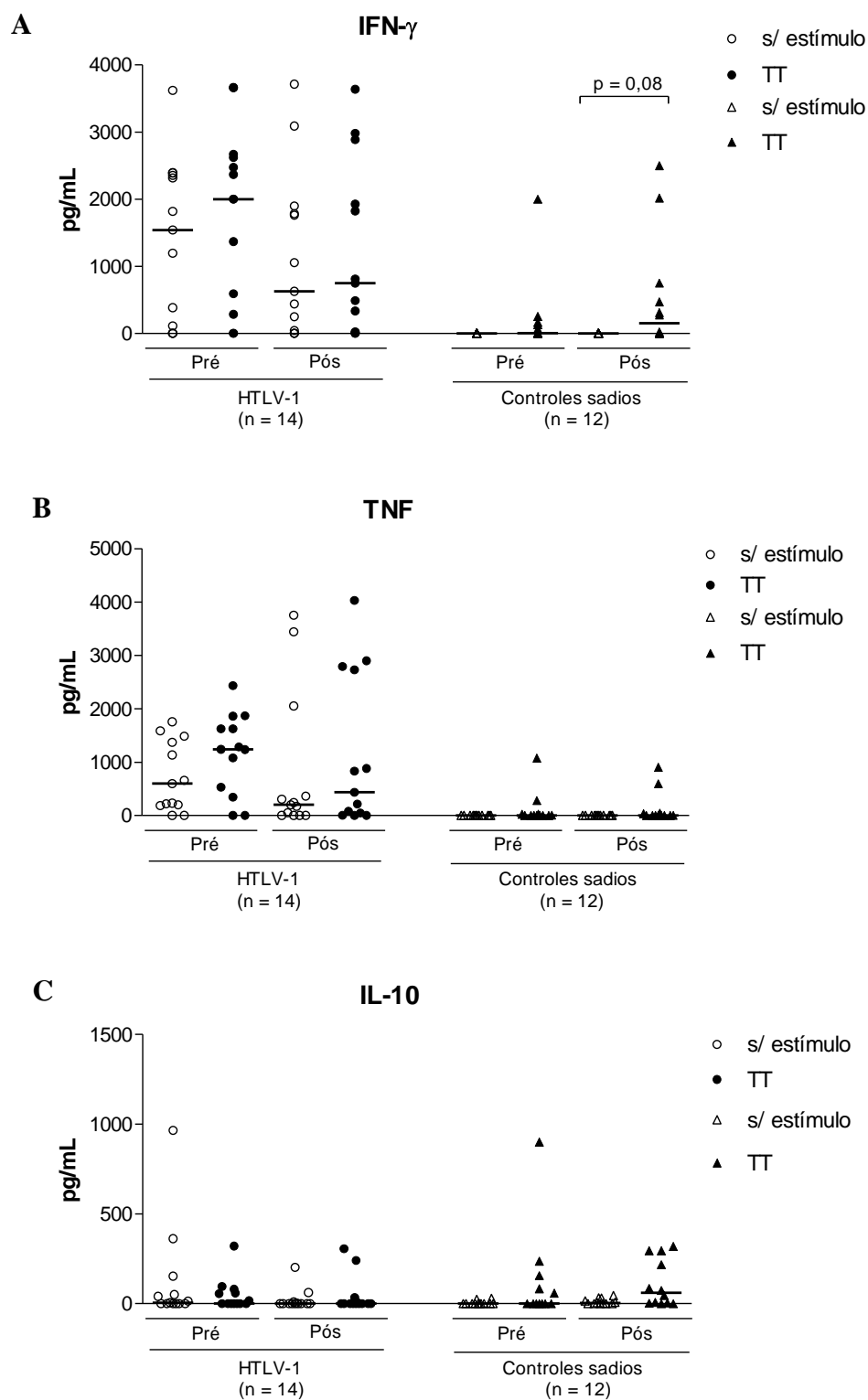


Figura 3. Produção de IFN- γ (A), TNF (B) e IL-10 (C) por CMSPs de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e controles saudios sem estímulo e estimuladas com TT (0,5 Lf/mL), pré e pós-imunização. Análise estatística realizada pelo teste de Wilcoxon para avaliar a produção de citocinas por células estimuladas com TT pré e pós-imunização.

4) EXPRESSÃO DE CITOCINAS EM LINFÓCITOS

A figura 4 ilustra as estratégias utilizadas para analisar os dados da expressão de citocinas em linfócitos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e controles sadios.

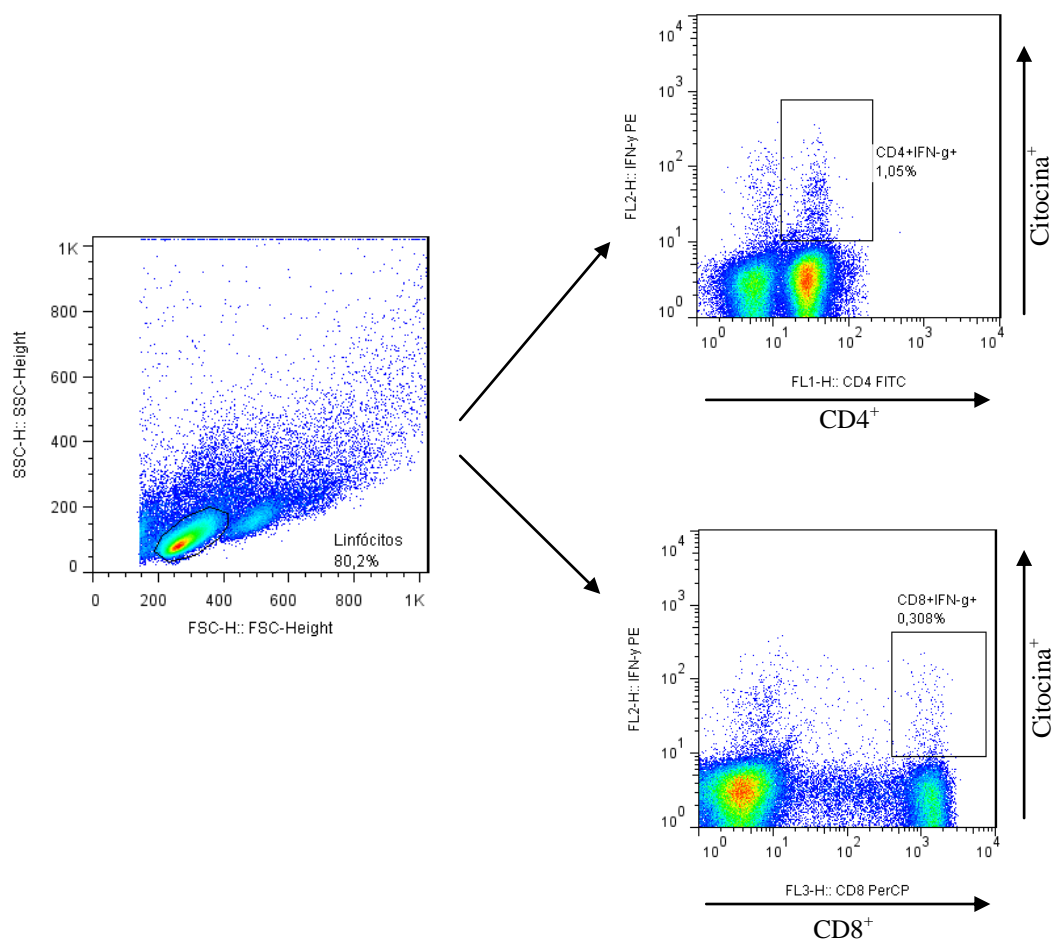


Figura 4. Plots representativos ilustrando as estratégias utilizadas para analisar os dados da expressão de citocinas (IFN- γ , TNF e IL-10) em linfócitos (células CD4⁺ e CD8⁺) de controles sadios e indivíduos infectados pelo HTLV-1.

Os linfócitos T CD4⁺ dos indivíduos infectados pelo HTLV-1, após estímulo com TT, apresentaram a mesma expressão de IFN- γ antes ($0,2 \pm 0,1\%$) e depois ($0,2 \pm 0,1\%$) da imunização ($p = 0,8$). Quanto aos controles sadios, houve um aumento na expressão desta citocinas após imunização ($0,4 \pm 0,3\%$ vs $2,8 \pm 5,3\%$), porém, sem diferença estatística ($p = 0,4$). Após imunização, a frequência de células expressando esta citocina foi menor entre os pacientes quando comparados com os controles sadios ($p = 0,01$) (Figura 5A).

A frequência de linfócitos T CD8⁺IFN- γ ⁺ estimulados dos pacientes aumentou após imunização ($0,6 \pm 0,4\%$ vs $0,9 \pm 0,6\%$), porém, sem significância estatística ($p = 0,4$). Resultado semelhante foi encontrado nas células de controles sadios ($0,4 \pm 0,3\%$ vs $2,6 \pm 4,8\%$, $p = 0,2$) (Figura 5B).

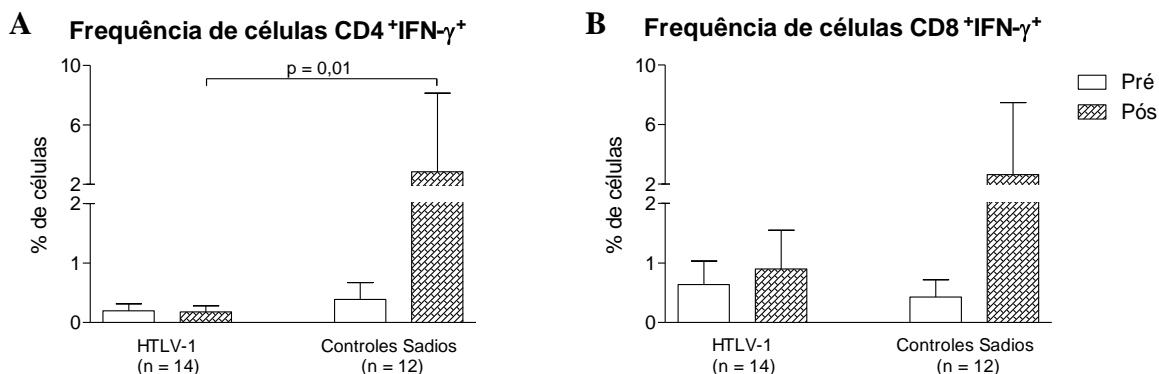


Figura 5. Expressão de IFN- γ em linfócitos T CD4⁺ (A) e T CD8⁺ (B), estimulados com TT, de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e controles sadios pré e pós-imunização. Valor de p calculado pelo teste de Mann-Whitney.

Antes da imunização, a frequência de linfócitos T CD4⁺TNF⁺ dos pacientes, após estimulados, não aumentou após imunização com TT ($0,3 \pm 0,2\%$ vs $0,3 \pm 0,1\%$, $p = 0,7$). Houve elevação da frequência destas células nos controles sadios pós-imunização com TT ($0,3 \pm 0,1\%$ vs $0,6 \pm 0,5\%$, $p = 0,04$). Quando comparadas as frequências de células T CD4⁺TNF⁺ de pacientes e controles sadios, após imunização, as células dos indivíduos infectados expressaram menos TNF do que as células dos controles ($p = 0,04$) (Figura 6A).

A frequência de linfócitos T CD8⁺TNF⁺ após estímulo com TT, nos indivíduos infectados pelo HTLV-1, não aumentou significativamente após imunização ($0,5 \pm 0,3\%$ vs $0,6 \pm 0,5\%$, $p = 0,7$). A não elevação da frequência destas células também foi observada nos controles sadios ($0,3 \pm 0,2\%$ vs $0,5 \pm 0,7\%$, $p = 0,8$) (Figura 6B).

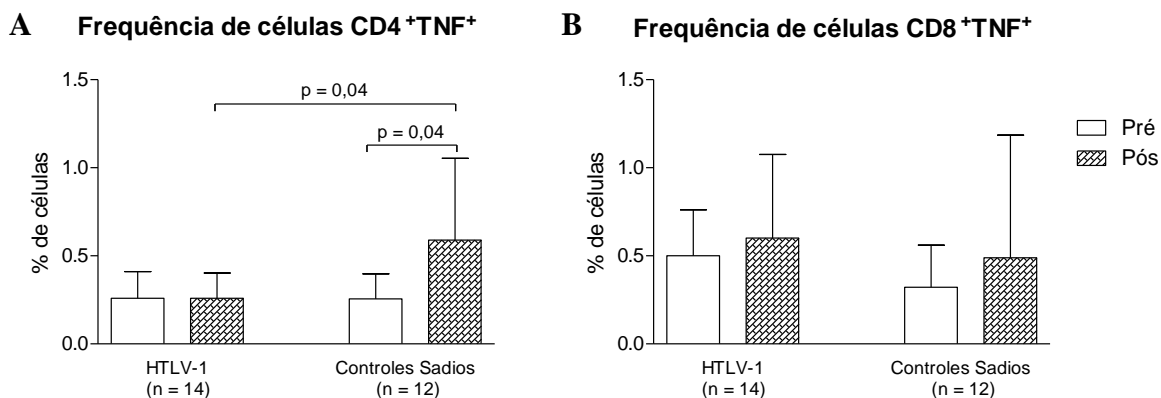


Figura 6. Expressão de TNF em linfócitos T CD4⁺ (A) e T CD8⁺ (B), estimulados com TT, de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e controles sadios pré e pós-imunização. Valores de p calculados pelos testes de Mann-Whitney e Wilcoxon.

Em relação à frequência de linfócitos T CD4⁺IL-10⁺ estimulados com TT, houve uma diminuição nos indivíduos infectados pelo HTLV-1 após imunização ($0,3 \pm 0,3\%$ vs $0,2 \pm 0,1\%$, $p = 1$). Quanto aos controles sadios, ocorreu o aumento da frequência destas células pós-imunização ($0,4 \pm 0,3\%$ vs $1,7 \pm 3,9\%$, $p = 0,1$), porém, sem significância estatística. Ao comparar a frequência dos linfócitos T CD4⁺ expressando IL-10 de ambos os grupos, observou-se uma diferença estatisticamente significativa entre pacientes e controles sadios imunizados com TT ($p = 0,01$) (Figura 7A).

Não houve elevação da expressão de IL-10 em linfócitos T CD8⁺ estimulados de pacientes pós-imunização com TT ($0,6 \pm 0,5\%$ vs $0,5 \pm 0,4\%$, $p = 0,5$). Observou-se o mesmo resultado nos controles sadios após serem imunizados com TT ($0,4 \pm 0,2\%$ vs $1,5 \pm 3,7\%$, $p = 0,9$). Não houve diferença estatística quando se considerou a frequência de células T CD8⁺IL-10⁺ dos pacientes e controles após imunização com TT ($p = 0,9$) (Figura 7B).

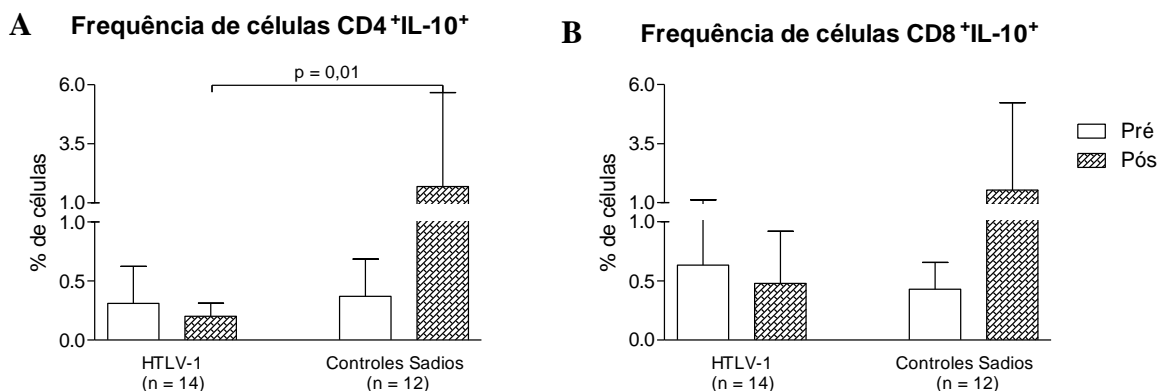


Figura 7. Expressão de IL-10 em linfócitos T CD4⁺ (A) e T CD8⁺ (B), estimulados com TT, de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e controles sadios pré e pós-imunização. Valor de p calculado com teste de Mann-Whitney.

5) EXPRESSÃO DE HLA-DR, CD80, CD86 E CITOCINAS EM MONÓCITOS

A figura 8 ilustra as estratégias utilizadas para analisar a expressão de moléculas de superfície e de citocinas em monócitos CD14⁺ em indivíduos infectados pelo HTLV-1 e controles sadios.

Os resultados para as moléculas de superfície (HLA-DR, CD80 e CD86) são representados pela média \pm desvio-padrão da média de intensidade de fluorescência (MIF). Para as citocinas, os valores representam a média \pm desvio-padrão da porcentagem de monócitos expressando citocinas.

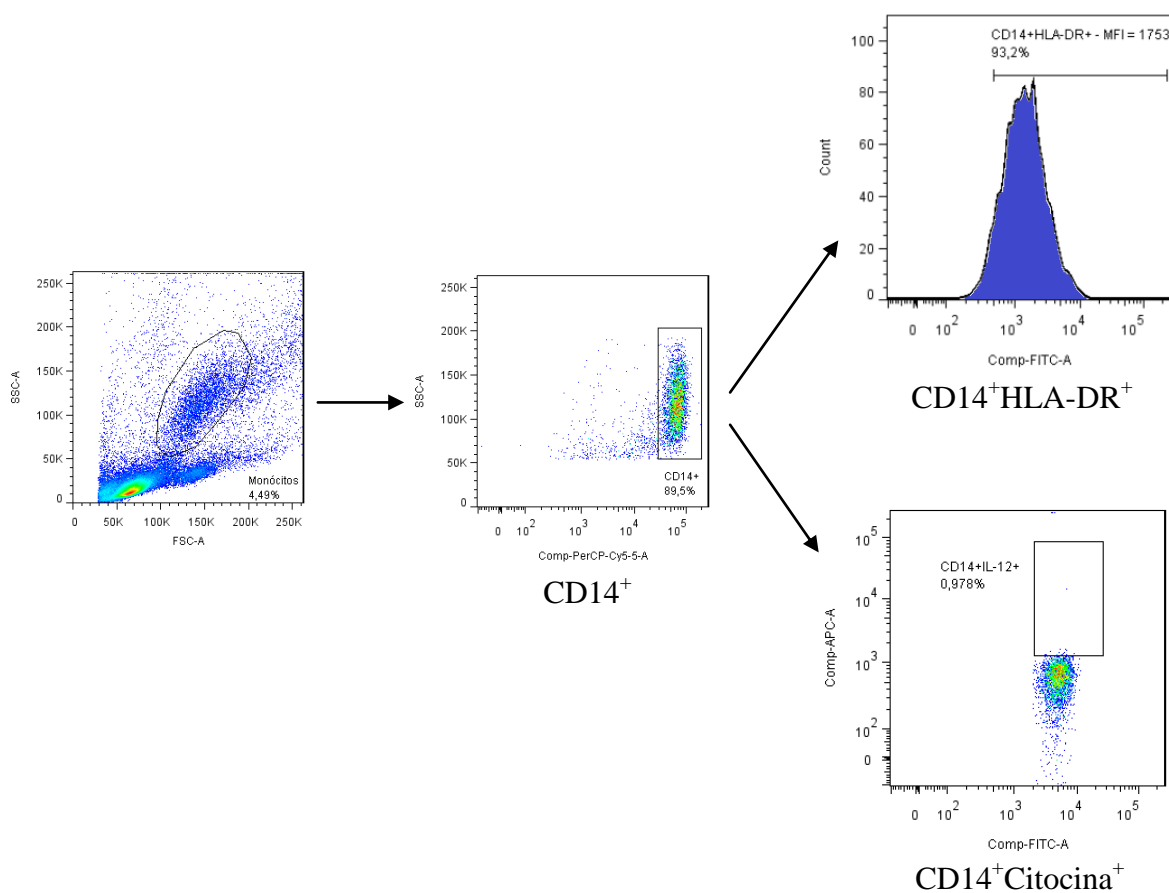


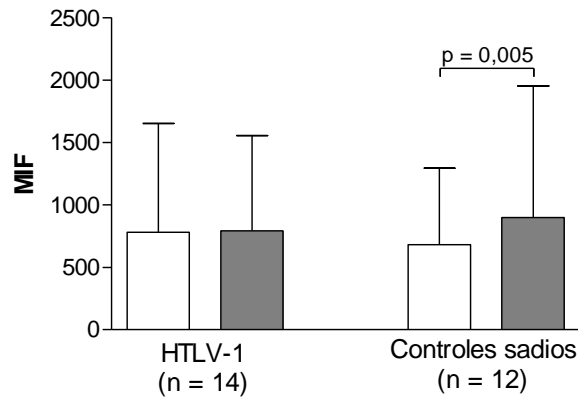
Figura 8. Plots representativos ilustrando as estratégias utilizadas para analisar os dados da expressão de moléculas de superfície (HLA-DR, CD80 e CD86) e citocinas (IFN- γ , TNF e IL-12) em monócitos (células CD14⁺) de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e controles sadios.

A expressão de HLA-DR em monócitos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 não aumentou após estímulo com TT (781 ± 873 vs 793 ± 761 , $p = 0,3$). Os monócitos de controles sadios aumentaram a expressão desta molécula após estímulo (681 ± 615 vs 898 ± 1055 , $p = 0,005$) (Figura 9A).

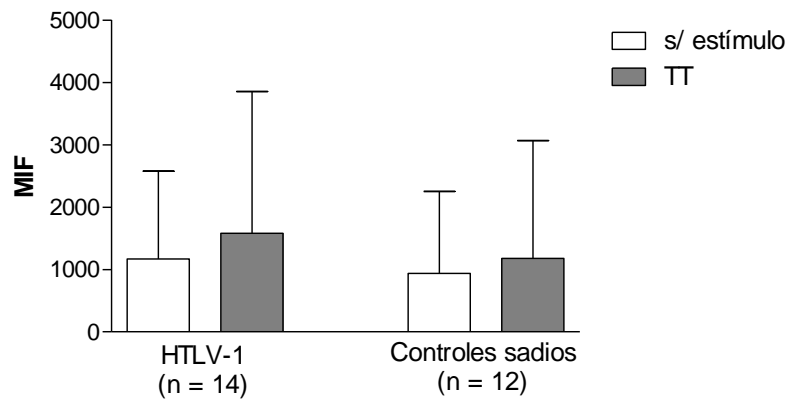
Os monócitos dos pacientes aumentaram a expressão de CD80 quando estimulados com TT (1167 ± 1410 vs 1579 ± 2272), porém, sem diferença estatisticamente significativa ($p = 0,07$). Resultado semelhante foi encontrado em células dos controles (936 ± 1318 vs 1176 ± 1890 , $p = 0,2$) (Figura 9B).

Referente à expressão de CD86, houve uma diminuição da expressão nos monócitos dos pacientes após estimulação com TT (3628 ± 4447 vs 3394 ± 4529 , $p = 0,07$). Quanto aos monócitos dos controles, a expressão desta molécula não foi alterada (2686 ± 3240 vs 2647 ± 3169 , $p = 0,5$) (Figura 9C).

A Expressão de HLA-DR em monócitos



B Expressão de CD80 em monócitos



C Expressão de CD86 em monócitos

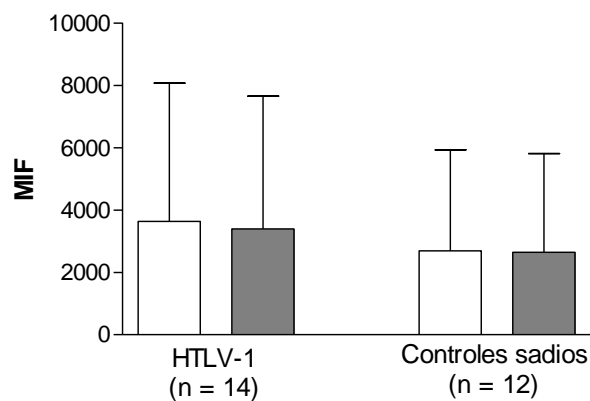


Figura 9. Expressão de HLA-DR (A), CD80 (B) e CD86 (C) em monócitos CD14⁺ de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e de controles sadios não estimulados ou estimulados com TT (0,5 Lf/mL). Análise estatística realizada pelo teste de Wilcoxon. MIF = média de intensidade de fluorescência.

A frequência de monócitos CD14⁺ expressando TNF, nos indivíduos infectados pelo HTLV-1, aumentou após estímulo com TT ($9,5 \pm 12,9\%$ vs $17,6 \pm 19,8\%$, $p = 0,009$). Os monócitos dos controles aumentaram a expressão desta citocinas após estímulo, no entanto, a diferença não foi estatisticamente significante ($1,5 \pm 0,9\%$ vs $11,6 \pm 23\%$, $p = 0,1$) (Figura 10A).

Referente à IL-12, houve elevação na frequência de células dos pacientes após estímulo ($1,3 \pm 0,8\%$ vs $2,4 \pm 1,5\%$, $p = 0,006$). Este resultado não se repetiu nos monócitos dos controles sadios ($1,2 \pm 0,7\%$ vs $1,3 \pm 0,9\%$, $p = 0,5$). A frequência de monócitos expressando IL-12, após estímulo com TT, foi maior entre os pacientes do que nos controles sadios ($p = 0,03$) (Figura 10B).

Quanto à frequência de células CD14⁺IL-10⁺, antes e depois do estímulo com TT, houve aumento tanto nos pacientes ($1 \pm 0,7\%$ vs $1,3 \pm 0,7\%$) quanto nos controles sadios ($1,1 \pm 0,8\%$ vs $1,5 \pm 0,9\%$), mas sem diferenças estatísticas ($p = 0,2$ e $p = 0,07$, respectivamente) (Figura 10C).

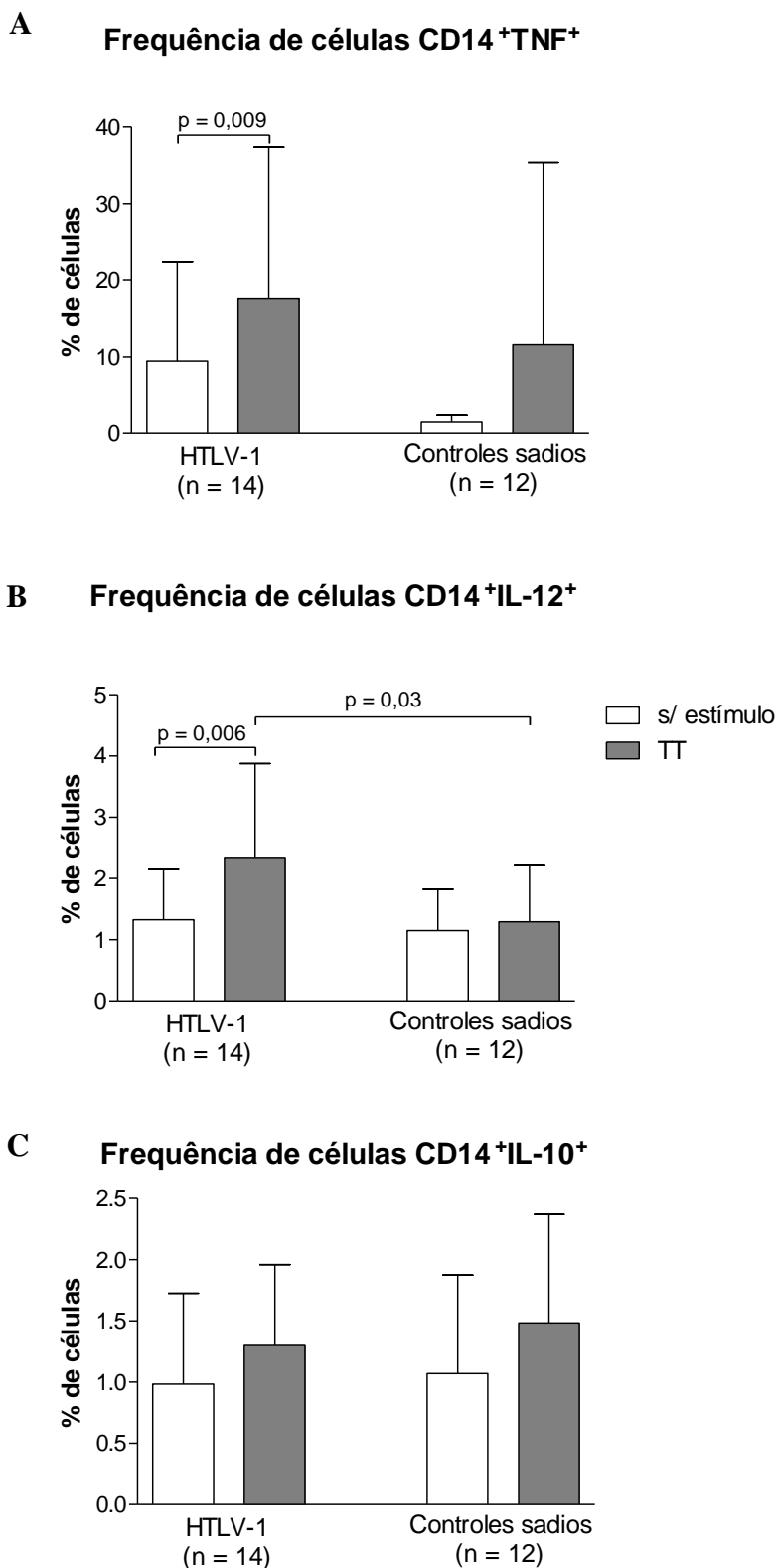


Figura 10. Expressão de TNF (A), IL-12 (B) e IL-10 (C) em monócitos CD14⁺ de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e de controles sadios não estimulados ou estimulados com TT (0,5 Lf/mL). Análises estatísticas realizadas pelo teste de Wilcoxon e Mann-Whitney.

DISCUSSÃO

Há poucos relatos na literatura sobre a resposta imune humoral de indivíduos infectados pelo HTLV-1 durante rotina de imunização. No presente estudo foi demonstrado que os portadores assintomáticos do HTLV-1 são capazes de aumentar a produção de anticorpo anti-TT após vacinação, no entanto, os títulos de IgG foram significativamente menores quando comparados com os dos controles sadios. A sorologia positiva após imunização com TT já foi observada em estudos anteriores (Jarvis, Janoff *et al.*, 2005; Biasutti, Moraes-Pinto *et al.*, 2008). No que se refere aos menores títulos de anticorpos encontrados nos pacientes, tem-se documentado que, em indivíduos infectados pelo HTLV-2, os níveis de anticorpos anti-TT são menores do que os de controles sadios não infectados pelo vírus após imunização, porém, neste trabalho não foi encontrada diferença estatística (Jarvis, Janoff *et al.*, 2005). A anormalidade na produção de IgG após vacinação de reforço também já foi identificado em indivíduos infectados pelo HIV, em que a concentração de IgG total anti-TT foi maior em controles sadios do que nos indivíduos infectados pelo vírus após vacinação (Kroon, Van Tol *et al.*, 1999). A disfunção na produção de anticorpo contra antígeno de memória poderia estar relacionada à carga proviral, visto que indivíduos infectados pelo HIV-1 apresentaram um aumento da carga viral após imunização com vírus influenza (O'Brien, Grovit-Ferbas *et al.*, 1995; Rosok, Voltersvik *et al.*, 1996). No entanto, no presente estudo foi possível observar que não houve variação da carga proviral nos indivíduos infectados pelo HTLV-1 antes e após imunização (dado não mostrado).

Paralelamente à produção de anticorpos anti-TT após imunização, observou-se a produção de citocinas por CMSPs estimuladas com TT. As células mononucleares dos pacientes diminuíram a produção de IFN- γ após imunização, porém, sem significância estatística. Aumento da produção desta citocina pode ser observado nas CMSPs dos controles, no entanto, sem diferença estatisticamente significativa. Quanto à produção de TNF e IL-10, não houve alteração da produção em ambos os grupos de indivíduos. Apesar destes resultados, observou-se que não ocorreu aumento da produção de IFN- γ , após estímulo com TT, por células dos pacientes pós-imunização. Tal aumento foi observado em controles sadios, porém, sem diferença estatisticamente significativa. Este resultado sugere que há uma anormalidade na produção desta citocina em indivíduos infectados pelo HTLV-1, visto que a resposta imune contra TT, além da produção de anticorpo, está relacionada com reação de hipersensibilidade tardia, com produção de IFN- γ e IL-2 (Parronchi, Macchia *et al.*, 1991;

Fernandez, Andersson *et al.*, 1994). Referente à produção de TNF pelos pacientes, os resultados estavam de acordo com o encontrado em controles sadios, nos quais ocorreu aumento da produção destas moléculas quando as células foram estimuladas com TT, corroborando com dados anteriores em que o aumento da produção de TNF por células mononucleares de controles sadios também é observado após estimulação com TT (Nielsen, Galdiers *et al.*, 2009). Quanto à citocina IL-10, o presente estudo observou o aumento da expressão após estímulo com TT, contrariando o que já foi reportado (Nielsen, Galdiers *et al.*, 2009).

Adicionalmente, realizou-se a caracterização da resposta imune celular quanto à ação dos linfócitos T dos pacientes e dos controles sadios após estímulo com TT, antes e após imunização. A frequência de linfócitos T CD4⁺ expressando IFN- γ , TNF e IL-10 não aumentou após estímulo com TT e pós-imunização, o que foi observado nas células dos controles sadios. Nos resultados pós-imunização, a frequência dos linfócitos T CD4⁺ dos controles sadios expressando estas citocinas era maior quando comparados com os pacientes, evidenciando que há uma falha na resposta imune celular dos pacientes contra TT. A detecção de IFN- γ por citometria de fluxo tem se mostrado uma técnica sensível para avaliar a produção desta citocina em indivíduos que foram imunizados com toxoide tetânico (Tassinon, Burny *et al.*, 2005). No entanto, foi demonstrado aqui que os linfócitos T dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 não apresentaram a resposta imune do tipo IV quando estimulados com TT. Uma das causas para a ausência dessa reação seria a produção da citocina regulatória IL-10 (Sabin, Araujo *et al.*, 1996; Mascarenhas, Brodskyn *et al.*, 2006). Porém, a expressão desta citocina não aumentou, após estímulo com TT, tanto em linfócitos T CD4⁺ quanto em linfócitos T CD8⁺ dos pacientes depois da imunização. Os linfócitos dos controles sadios expressaram níveis maiores de IL-10 após estímulo com TT antes e após imunização. Isso pode ser explicado devido à regulação normal da resposta imune induzida por esta citocina (Yssel, De Waal Malefyt *et al.*, 1992). Uma alta expressão de IL-10 era esperada neste estudo, visto que portadores assintomáticos produzem, espontaneamente, níveis significativos de IL-10 (Carvalho, Bacellar *et al.*, 2001).

Após imunização, os linfócitos T CD8⁺ dos pacientes e controles aumentaram a expressão de TNF na presença de TT. Tal resultado não pode ser observado em linfócitos T CD4⁺ de ambos os grupos de indivíduos. Visto que TNF também é produzido por células TH1 (Parronchi, Macchia *et al.*, 1991), este achado sugere que esta citocina é normalmente produzida após estímulo com TT em indivíduos infectados pelo HTLV-1.

Devido à resposta imune humoral e celular estar diminuída nos indivíduos infectados pelo HTLV-1 e estes não responderem adequadamente ao TT após imunização, procurou-se observar se estas anormalidades poderiam estar relacionadas às células apresentadoras de antígeno. Portanto, executou-se a avaliação dos monócitos dos pacientes estimulados ou não com TT. Visto que, teoricamente, os monócitos não são considerados uma população celular que se diferenciam para células de memórias, avaliou-se as expressões de moléculas coestimulatórias e citocinas apenas antes da imunização com TT.

Uma das hipóteses para a não resposta a antígenos de memória em indivíduos infectados pelo HTLV-1 seria uma disfunção nas células apresentadoras de antígeno (Suzuki, Dezzutti *et al.*, 1999). Os monócitos dos pacientes não aumentaram a expressão de HLA-DR após estímulo com TT, ao contrário do que foi observado nos controles sadios. Este resultado se repetiu quando os monócitos foram estimulados com LPS (dados não mostrados). Os monócitos são células capazes de apresentar antígenos virais, pois também podem ser infectados pelo HTLV-1 (De Revel, Mabondzo *et al.*, 1993). No que se refere às células apresentadoras de antígeno (APC) e sua função, poucos estudos têm focalizado na atuação dessas células na infecção pelo HTLV-1. Sabe-se que, além de infectar, preferencialmente, os linfócitos T CD4⁺, o HTLV-1 também infecta monócitos e células dendríticas (Macatonia, Cruickshank *et al.*, 1992; De Revel, Mabondzo *et al.*, 1993). A infecção viral pode influenciar na função dessas células e, como apresentado neste estudo, o não aumento da expressão de HLA-DR em monócitos, após estímulo com TT, corrobora com achados semelhantes da literatura. Monócitos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 com ATLL não amadurecem completamente, *in vitro*, para células dendríticas e apresentam uma baixa expressão de CD14 e HLA-DR (Makino, Wakamatsu *et al.*, 2000). Adicionalmente, monócitos de pacientes com HAM/TSP são incapazes de se diferenciarem em células dendríticas devido à baixa expressão de CD1a e HLA-DR, mesmo quando estimulados com TNF (Nascimento, Lima *et al.*, 2011). Mais recentemente, um grupo de pesquisa do Japão demonstrou que macrófagos do leite materno infectados com HTLV-1, quando cocultivados com monócitos não infectados, impedem estas células de se diferenciarem em células dendríticas, principalmente devido ao bloqueio da expressão de CD1a e HLA-DR (Inagaki, Takahashi *et al.*, 2012). Em contrapartida, a proteína Tax mostrou ser eficaz na diferenciação e ativação de células dendríticas derivadas de monócitos de pacientes com ATLL, induzindo o aumento da apresentação antigênica (expressão elevada de HLA-DR) e coestimulação de linfócitos T (Jain, Ahuja *et al.*, 2007; Manuel, Schell *et al.*, 2009). No entanto, tais estudos

foram voltados para as células dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 com sintomas neurológicos e com ATLL, o que diferencia do apresentado aqui, em que se utilizou células de portadores assintomáticos do vírus.

A expressão de CD80 e CD86 em monócitos estimulados ou não com TT foi similar entre os pacientes e os controles sadios. O discreto aumento da expressão de CD80 após estímulo com TT não alcançou significância estatística. A expressão de CD86 não foi alterada após estímulo em ambos os grupos de indivíduos. Interessantemente, a expressão de CD86 diminuiu após estímulo com LPS em ambos os grupos (dados não mostrados). Tal resultado pode ser explicado de acordo com estudo anterior afirmando que, em células tolerantes à endotoxina, a expressão de CD86 diminui com diferentes tempos de exposição ao LPS e com concentrações variadas desta molécula (Wolk, Docke *et al.*, 2000). Os dados da literatura acerca das moléculas CD80 e CD86 em monócitos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 são escassos. Estas moléculas são bem documentadas em linfócitos T CD4⁺, em que já foi observado que há expressão normal em indivíduos infectados pelo HTLV-1 com ATLL (Takamoto, Makino *et al.*, 1997).

Referente à expressão das citocinas em monócitos dos dois grupos de estudo, houve o aumento significativo da porcentagem de células expressando TNF após estímulo com TT nos pacientes, o que não ocorreu nos monócitos dos controles sadios apesar da evidente elevação da expressão desta citocina. A porcentagem de monócitos expressando IL-12 aumentou após os dois tipos de estímulo apenas no grupo dos pacientes. Quanto à expressão de IL-10, houve aumento nos dois grupos de indivíduos quando os monócitos foram estimulados com TT, porém, não houve diferença estatisticamente significativa. Poucos estudos são encontrados acerca da expressão de citocinas em monócitos de indivíduos infectados pelo HTLV-1. Porém, sabe-se que monócitos de indivíduos sadios são capazes de produzir IL-10 e TNF após estímulo com TT (Fernandez, Andersson *et al.*, 1994; Nielsen, Galdiers *et al.*, 2009). Adicionalmente, estudos focados em células dendríticas derivadas de monócitos demonstraram que a proteína Tax é capaz de induzir a secreção de IL-12, TNF e quimiocinas da resposta T_H1 por estas células (Ahuja, Kampani *et al.*, 2006; Ahuja, Lepoutre *et al.*, 2007).

Os dados do aumento da frequência de monócitos expressando TNF e IL-12, após estímulo com TT, em indivíduos infectados pelo HTLV-1 e não nos controles podem estar relacionados com a constante ativação das células dos pacientes. Faz-se necessário investigação aprofundada deste mecanismo imunológico.

Quanto aos monócitos dos pacientes estudados aqui, pode-se observar que há uma disfunção na expressão de HLA-DR após estímulo com TT, o que pode prejudicar na apresentação de antígenos virais ou outros antígenos não relacionados ao vírus. Tal situação pode permitir a predisposição dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 a contraírem doenças infecciosas como tuberculose (Verdonck, Gonzalez *et al.*, 2008; De Lourdes Bastos, Osterbauer *et al.*, 2009; Bastos, Santos *et al.*, 2012), sarna norueguesa (Brites, Weyll *et al.*, 2002) e estrogiloidíase (Porto, Alcantara *et al.*, 2005). Contudo, a expressão de moléculas coestimulatórias (CD80 e CD86) e citocinas (TNF, IL-10 e IL-12) não é prejudicada após estímulo antigênico, sugerindo que não há disfunção dos monócitos quanto a essas vias de apresentação antigênica e ativação celular.

Alguns aspectos da resposta imune não foram abordados neste trabalho. Acerca da resposta imune humoral, faz-se necessária a dosagem de subclasses de anticorpos IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) e IgE antes e após imunização com toxoide tetânico. Tais detecções poderiam explicar se a resposta imune contra TT está direcionada para via T_H1 ou T_H2.

Atualmente, são reconhecidas mais de uma classe de monócitos, de acordo com a expressão dos marcadores de superfície, sendo eles: monócitos clássicos (CD14⁺CD16⁻), inflamatórios (CD14⁺CD16⁺) e não clássicos (CD14^{low}CD16⁺⁺) (Tacke e Randolph, 2006; Ingersoll, Spanbroek *et al.*, 2010). Como este estudo iniciou-se antes destes conhecimentos estarem bem estabelecidos, torna-se como perspectiva deste trabalho a realização da caracterização destas subpopulações de monócitos em indivíduos infectados pelo HTLV-1, principalmente no que se refere à resposta a antígenos de memória.

Outro aspecto na apresentação antigênica em indivíduos infectados pelo HTLV-1, que não foi explorado no presente estudo, é a função de células dendríticas na ativação dos linfócitos T após apresentação de antígeno de memória.

Visto que a resposta imune de linfócitos contra TT estava diminuída nos pacientes, faz-se necessária a avaliação de células T de memória nestes indivíduos. Além disso, é importante, também, avaliar o estudo funcional das células T regulatórias CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} frente a antígenos de memórias (Iwashiro, Messer *et al.*, 2001; Michaelsson, Barbosa *et al.*, 2008).

Foi possível mostrar, no presente estudo, que a resposta imune humoral e celular contra TT está diminuída em indivíduos infectados pelo HTLV-1, mesmo quando estes pacientes são imunizados com esta proteína. Uma das causas da diminuição destas respostas poderia ser a função dos monócitos, porém, estes apenas mostraram-se anormais na apresentação

antigênica via HLA-DR. Estudos futuros devem ser conduzidos com o objetivo de esclarecer o papel de monócitos e de suas subpopulações em indivíduos infectados pelo HTLV-1 e após desafio com antígenos de memória.

PROPOSTAS DE ESTUDO

Com objetivo de enriquecer os resultados encontrados neste estudo, a proposta será de avaliar o perfil de monócitos, das células T e da resposta imune humoral contra antígenos de memória em indivíduos infectados pelo HTLV-1.

O primeiro objetivo específico é avaliar a frequência de subpopulações de monócitos em indivíduos infectados pelo HTLV-1. Como mencionado anteriormente, sabe-se que há três subclasses de monócitos: clássicos, inflamatórios e não clássicos (Tacke e Randolph, 2006; Ingersoll, Spanbroek *et al.*, 2010). A hipótese para este objetivo é de que os indivíduos infectados pelo HTLV-1 com HAM/TSP tem uma maior frequência de monócitos inflamatórios, com elevada expressão de TNF, quando comparados com indivíduos com bexiga hiperativa e portadores assintomáticos do vírus.

O segundo objetivo é avaliar, funcionalmente, os linfócitos T de indivíduos infectados pelo HTLV-1 quando estimulados com antígeno de memória. A hipótese é que as células T regulatórias, efetoras e de memória dos pacientes influenciam na anormalidade da resposta imune celular contra antígeno de memória. A população de estudo será a mesma do objetivo anterior, além dos controles sadios. Serão avaliadas a frequência de células T regulatórias, de memória e naïve, tanto *ex-vivo* quanto em cultura após estímulo com TT e PPD, neste caso para expressão de IFN- γ antes e depois do estímulo.

O terceiro e último objetivo é caracterizar a resposta imune humoral de indivíduos infectados pelo HTLV-1 contra toxoide tetânico. A diminuição da resposta imune humoral contra TT, após imunização, pode estar relacionada com produção de títulos elevados de anticorpos anti-TT relacionados à resposta do tipo T_H1 (IgG2 e IgG3). Serão avaliados os mesmos indivíduos do presente estudo (portadores assintomáticos e controles sadios), antes e após imunização. Através do ELISA, as subclasses de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) poderão ser detectadas nos soros dos indivíduos de ambos os grupos. Adicionalmente, espera-se aumentar o número amostral, caso sejam identificados mais indivíduos com sorologia negativa para TT.

RESUMO DOS RESULTADOS

1. Apesar de apresentarem sorologia positiva para TT após imunização, os indivíduos infectados pelo HTLV-1 apresentaram menores títulos de IgG anti-TT quando comparados com controles sadios, sugerindo que há uma anormalidade na resposta imune humoral dos pacientes contra este antígeno de memória.
2. Os linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 não aumentaram a expressão de citocinas quando estimulados com TT, sugerindo que há uma diminuição e, até mesmo, anergia da resposta imune celular contra este antígeno mesmo após imunização dos pacientes.
3. Os monócitos dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 apresentaram uma disfunção na apresentação antigênica, devido ao não aumento da expressão de HLA-DR após estímulo com TT. No entanto, o segundo sinal de apresentação antigênica e expressão de citocinas não se mostraram alterados.

CONCLUSÃO

As falhas nos mecanismos da resposta imune, evidenciadas pela diminuição da resposta imune humoral, anergia dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ e o não aumento da expressão de HLA-DR por monócitos após estímulo com antígeno de memória podem levar ao aumento da susceptibilidade a doenças infecciosas nos indivíduos infectados pelo HTLV-1.

SUMMARY

DECREASE OF THE IMMUNE RESPONSE AGAINST TETANUS TOXOID IN HTLV-1 INFECTED INDIVIDUALS. HTLV-1 is an etiologic agent of Adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL) and HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). It was shown that peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from HTLV-1 infected subjects do not proliferate after stimulation with recall antigens such as purified protein derivate (PPD) from *Mycobacterium tuberculosis* and tetanus toxoid (TT). Some factors may be involved in this abnormality: regulatory T cell function and dysfunctional antigen-presenting cells (APC). Objective: To evaluate the immune response against TT in HTLV-1 infected subjects. Materials and Methods: It was selected HTLV-1 carriers with low IFN- γ production and healthy controls. It was performed serology for TT. The seronegative individuals were immunized with TT. Before and after immunization, it was made serology for TT and evaluation of the cytokine (IFN- γ , TNF and IL-10) expression by CD4⁺ and CD8⁺ T cells stimulated with TT. The monocytes, stimulated with TT, from patients and healthy controls were evaluated to HLA-DR, CD80, CD86, TNF, IL-12 and IL-10 before the immunization. Results: After immunization, patients had low IgG anti-TT production when compared with healthy controls ($p = 0.007$). Mononuclear cells from the patients, stimulated with TT, did not increase the IFN- γ , TNF and IL-10 production after immunization. Frequency of CD4⁺ T cells expressing IFN- γ , TNF and IL-10, after stimulus, were lower in patients than the controls after immunization ($p = 0.01$, $p = 0.04$ and $p = 0.01$, respectively). Monocytes from patients did not increase the HLA-DR expression after stimulation with TT. TNF and IL-12 expression by monocytes from patients increased after stimulation ($p = 0.009$ and $p = 0.006$, respectively). Conclusions: HTLV-1 infected subjects, after vaccination, presented a decreasing of the humoral and cellular immune response against TT. Monocytes from the patients showed an impairment of antigen presentation through the HLA-DR expression mechanisms. However, the second signal (CD80 and CD86 expression) and cytokine expression did not show abnormalities. These results suggest that these immunological mechanisms may participate of the increasing susceptibility of HTLV-1 infected subjects to acquire others infectious diseases.

Key words: 1. HTLV-1; 2. Lymphocytes; 3. Monocytes; 4. Immunology.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahuja, J., K. Kampani, *et al.* Use of human antigen presenting cell gene array profiling to examine the effect of human T-cell leukemia virus type 1 Tax on primary human dendritic cells. J Neurovirol, v.12, n.1, Feb, p.47-59. 2006.

Ahuja, J., V. Lepoutre, *et al.* Induction of pro-inflammatory cytokines by human T-cell leukemia virus type-1 Tax protein as determined by multiplexed cytokine protein array analyses of human dendritic cells. Biomed Pharmacother, v.61, n.4, May, p.201-8. 2007.

Ballard, D. W., E. Bohnlein, *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, Sep 23, p.1652-5. 1988.

Bangham, C. R. HTLV-1 infections. J Clin Pathol, v.53, n.8, Aug, p.581-6. 2000.

Basbous, J., C. Arpin, *et al.* The HBZ factor of human T-cell leukemia virus type I dimerizes with transcription factors JunB and c-Jun and modulates their transcriptional activity. J Biol Chem, v.278, n.44, Oct 31, p.43620-7. 2003.

Bastos, M. D., S. Santos, *et al.* Influence of HTLV-1 on the clinical, microbiologic and immunologic presentation of tuberculosis. BMC Infect Dis, v.12, n.1, Aug 28, p.199. 2012.

Biasutti, C., M. I. Moraes-Pinto, *et al.* Antibody response after vaccination with tetanus and diphtheria toxoids in human T-cell lymphotropic virus type 1 asymptomatic carriers. Vaccine, v.26, n.23, Jun 2, p.2808-10. 2008.

Biddison, W. E., R. Kubota, *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, Aug 15, p.2018-25. 1997.

Brites, C., M. Weyll, *et al.* Severe and Norwegian scabies are strongly associated with retroviral (HIV-1/HTLV-1) infection in Bahia, Brazil. Aids, v.16, n.9, Jun 14, p.1292-3. 2002.

Brito-Melo, G. E., V. Peruhype-Magalhaes, *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, Jan, p.35-44. 2007.

Carod-Artal, F. J., H. M. Mesquita, *et al.* [Neurological symptoms and disability in HTLV-1 associated myelopathy]. Neurologia, v.23, n.2, Mar, p.78-84. 2008.

Carvalho, E. M., O. Bacellar, *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, May 1, p.1-6. 2001.

Carvalho, E. M. e A. Da Fonseca Porto. Epidemiological and clinical interaction between HTLV-1 and *Strongyloides stercoralis*. Parasite Immunol, v.26, n.11-12, Nov-Dec, p.487-97. 2004.

Caskey, M. F., D. J. Morgan, *et al.* Clinical manifestations associated with HTLV type I infection: a cross-sectional study. AIDS Res Hum Retroviruses, v.23, n.3, Mar, p.365-71. 2007.

Castro, N. M., D. M. Freitas, *et al.* Urodynamic features of the voiding dysfunction in HTLV-1 infected individuals. Int Braz J Urol, v.33, n.2, Mar-Apr, p.238-44; discussion 244-5. 2007.

Castro, N. M., W. Rodrigues, Jr., *et al.* Urinary symptoms associated with human T-cell lymphotropic virus type I infection: evidence of urinary manifestations in large group of HTLV-I carriers. Urology, v.69, n.5, May, p.813-8. 2007.

Catalan-Soares, B., A. B. Carneiro-Proietti, *et al.* 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, May-Jun, p.926-31. 2005.

Chen, I. S., S. G. Quan, *et al.* Human T-cell leukemia virus type II transforms normal human lymphocytes. Proc Natl Acad Sci U S A, v.80, n.22, Nov, p.7006-9. 1983.

Costa, D. T., A. L. Santos, *et al.* Neurological symptoms and signs in HTLV-1 patients with overactive bladder syndrome. Arq Neuropsiquiatr, v.70, n.4, Apr, p.252-6. 2012.

Datta, A., U. Sinha-Datta, *et al.* The HTLV-I p30 interferes with TLR4 signaling and modulates the release of pro- and anti-inflammatory cytokines from human macrophages. J Biol Chem, v.281, n.33, Aug 18, p.23414-24. 2006.

David, J. R., M. A. Vadas, *et al.* Enhanced helminthotoxic capacity of eosinophils from patients with eosinophilia. N Engl J Med, v.303, n.20, Nov 13, p.1147-52. 1980.

De Lourdes Bastos, M., B. Osterbauer, *et al.* Prevalence of human T-cell lymphotropic virus type 1 infection in hospitalized patients with tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis, v.13, n.12, Dec, p.1519-23. 2009.

De Revel, T., A. Mabondzo, *et al.* In vitro infection of human macrophages with human T-cell leukemia virus type 1. Blood, v.81, n.6, Mar 15, p.1598-606. 1993.

Dourado, I., L. C. Alcantara, *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, Dec 15, p.527-31. 2003.

Edlich, R. F., L. G. Hill, *et al.* Global epidemic of human T-cell lymphotropic virus type-I (HTLV-I): an update. J Long Term Eff Med Implants, v.13, n.2, p.127-40. 2003.

Fernandez, V., J. Andersson, *et al.* Cytokine synthesis analyzed at the single-cell level before and after revaccination with tetanus toxoid. Eur J Immunol, v.24, n.8, Aug, p.1808-15. 1994.

Galvao-Castro, B., L. Loures, *et al.* Distribution of human T-lymphotropic virus type I among blood donors: a nationwide Brazilian study. Transfusion, v.37, n.2, Feb, p.242-3. 1997.

Garlet, G. P., S. P. Giozza, *et al.* Association of human T lymphotropic virus 1 amplification of periodontitis severity with altered cytokine expression in response to a standard periodontopathogen infection. Clin Infect Dis, v.50, n.3, Feb 1, p.e11-8. 2010.

Gaudray, G., F. Gachon, *et al.* The complementary strand of the human T-cell leukemia virus type 1 RNA genome encodes a bZIP transcription factor that down-regulates viral transcription. J Virol, v.76, n.24, Dec, p.12813-22. 2002.

Gessain, A., F. Barin, *et al.* Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. Lancet, v.2, n.8452, Aug 24, p.407-10. 1985.

Gessain, A. e G. De The. What is the situation of human T cell lymphotropic virus type II (HTLV-II) in Africa? Origin and dissemination of genomic subtypes. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol, v.13 Suppl 1, p.S228-35. 1996.

Giozza, S. P., S. B. Santos, *et al.* [Salivary and lacrymal gland disorders and HTLV-1 infection]. Rev Stomatol Chir Maxillofac, v.109, n.3, Jun, p.153-7. 2008.

Goon, P. K., T. Igakura, *et al.* High circulating frequencies of tumor necrosis factor alpha- and interleukin-2-secreting human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-specific CD4+ T cells in patients with HTLV-1-associated neurological disease. J Virol, v.77, n.17, Sep, p.9716-22. 2003.

Gotuzzo, E., A. Terashima, *et al.* Strongyloides stercoralis hyperinfection associated with human T cell lymphotropic virus type-1 infection in Peru. Am J Trop Med Hyg, v.60, n.1, Jan, p.146-9. 1999.

Guerreiro, J. B., S. B. Santos, *et al.* Levels of serum chemokines discriminate clinical myelopathy associated with human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) disease from HTLV-1 carrier state. Clin Exp Immunol, v.145, n.2, Aug, p.296-301. 2006.

Hanon, E., S. Hall, *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, Feb 15, p.1386-92. 2000.

Higuchi, M. e M. Fujii. Distinct functions of HTLV-1 Tax1 from HTLV-2 Tax2 contribute key roles to viral pathogenesis. Retrovirology, v.6, p.117. 2009.

Inagaki, S., M. Takahashi, *et al.* HTLV-I-infected breast milk macrophages inhibit monocyte differentiation to dendritic cells. Viral Immunol, v.25, n.2, Apr, p.106-16. 2012.

Ingersoll, M. A., R. Spanbroek, *et al.* Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. Blood, v.115, n.3, Jan 21, p.e10-9. 2010.

- Iwashiro, M., R. J. Messer, *et al.* Immunosuppression by CD4+ regulatory T cells induced by chronic retroviral infection. Proc Natl Acad Sci U S A, v.98, n.16, Jul 31, p.9226-30. 2001.
- Jacobson, S., A. Gupta, *et al.* Immunological studies in tropical spastic paraparesis. Ann Neurol, v.27, n.2, Feb, p.149-56. 1990.
- Jacobson, S., V. Zaninovic, *et al.* Immunological findings in neurological diseases associated with antibodies to HTLV-I: activated lymphocytes in tropical spastic paraparesis. Ann Neurol, v.23 Suppl, p.S196-200. 1988.
- Jain, P., J. Ahuja, *et al.* Modulation of dendritic cell maturation and function by the Tax protein of human T cell leukemia virus type 1. J Leukoc Biol, v.82, n.1, Jul, p.44-56. 2007.
- Jarvis, G. A., E. N. Janoff, *et al.* Human T lymphotropic virus type II infection and humoral responses to pneumococcal polysaccharide and tetanus toxoid vaccines. J Infect Dis, v.191, n.8, Apr 15, p.1239-44. 2005.
- Jones, K. S., C. Petrow-Sadowski, *et al.* Cell-free HTLV-1 infects dendritic cells leading to transmission and transformation of CD4(+) T cells. Nat Med, v.14, n.4, Apr, p.429-36. 2008.
- Kinoshita, K., S. Hino, *et al.* Demonstration of adult T-cell leukemia virus antigen in milk from three sero-positive mothers. Gann, v.75, n.2, Feb, p.103-5. 1984.
- Kiyokawa, T., M. Seiki, *et al.* Identification of a protein (p40x) encoded by a unique sequence pX of human T-cell leukemia virus type I. Gann, v.75, n.9, Sep, p.747-51. 1984.
- Knight, S. C., S. E. Macatonia, *et al.* Dendritic cells in HIV-1 and HTLV-1 infection. Adv Exp Med Biol, v.329, p.545-9. 1993.
- Kramer, A., S. Jacobson, *et al.* Spontaneous lymphocyte proliferation in symptom-free HTLV-I positive Jamaicans. Lancet, v.2, n.8668, Oct 14, p.923-4. 1989.
- Kroon, F. P., M. J. Van Tol, *et al.* Immunoglobulin G (IgG) subclass distribution and IgG1 avidity of antibodies in human immunodeficiency virus-infected individuals after revaccination with tetanus toxoid. Clin Diagn Lab Immunol, v.6, n.3, May, p.352-5. 1999.
- Kubota, R., T. Kawanishi, *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, Jul 1, p.482-8. 1998.
- Lagrenade, L., B. Hanchard, *et al.* Infective dermatitis of Jamaican children: a marker for HTLV-I infection. Lancet, v.336, n.8727, Dec 1, p.1345-7. 1990.
- Lee, T. H., J. E. Coligan, *et al.* Antigens encoded by the 3'-terminal region of human T-cell leukemia virus: evidence for a functional gene. Science, v.226, n.4670, Oct 5, p.57-61. 1984.

- Macatonia, S. E., J. K. Cruickshank, *et al.* Dendritic cells from patients with tropical spastic paraparesis are infected with HTLV-1 and stimulate autologous lymphocyte proliferation. AIDS Res Hum Retroviruses, v.8, n.9, Sep, p.1699-706. 1992.
- Macnamara, A., A. Rowan, *et al.* HLA class I binding of HBZ determines outcome in HTLV-1 infection. PLoS Pathog, v.6, n.9, p.e1001117. 2010.
- Makino, M., S. Wakamatsu, *et al.* Production of functionally deficient dendritic cells from HTLV-I-infected monocytes: implications for the dendritic cell defect in adult T cell leukemia. Virology, v.274, n.1, Aug 15, p.140-8. 2000.
- Maloney, E. M., F. R. Cleghorn, *et al.* Incidence of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in Jamaica and Trinidad. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol, v.17, n.2, Feb 1, p.167-70. 1998.
- Maloney, E. M., E. L. Murphy, *et al.* Human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) seroprevalence in Jamaica. II. Geographic and ecologic determinants. Am J Epidemiol, v.133, n.11, Jun 1, p.1125-34. 1991.
- Mani, K. S., A. J. Mani, *et al.* A spastic paraplegic syndrome in South India. J Neurol Sci, v.9, n.1, Jul-Aug, p.179-99. 1969.
- Manns, A., R. J. Wilks, *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, Jul 30, p.886-91. 1992.
- Manuel, S. L., T. D. Schell, *et al.* Presentation of human T cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) Tax protein by dendritic cells: the underlying mechanism of HTLV-1-associated neuroinflammatory disease. J Leukoc Biol, v.86, n.5, Nov, p.1205-16. 2009.
- Mascarenhas, R. E., C. Brodskyn, *et al.* Peripheral blood mononuclear cells from individuals infected with human T-cell lymphotropic virus type 1 have a reduced capacity to respond to recall antigens. Clin Vaccine Immunol, v.13, n.5, May, p.547-52. 2006.
- 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.
- Matsuzaki, T., M. Nakagawa, *et al.* HTLV-I proviral load correlates with progression of motor disability in HAM/TSP: analysis of 239 HAM/TSP patients including 64 patients followed up for 10 years. J Neurovirol, v.7, n.3, Jun, p.228-34. 2001.
- Mesnard, J. M., B. Barbeau, *et al.* HBZ, a new important player in the mystery of adult T-cell leukemia. Blood, v.108, n.13, Dec 15, p.3979-82. 2006.
- Michaelsson, J., H. M. Barbosa, *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, p.41. 2008.

Mochizuki, M., T. Watanabe, *et al.* Uveitis associated with human T-cell lymphotropic virus type I. Am J Ophthalmol, v.114, n.2, Aug 15, p.123-9. 1992.

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

Nagai, M., K. Usuku, *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, Dec, p.586-93. 1998.

Nakamura, S., A. Ikebe-Hiroki, *et al.* An association between salivary gland disease and serological abnormalities in Sjogren's syndrome. J Oral Pathol Med, v.26, n.9, Oct, p.426-30. 1997.

Narikawa, K., K. Fujihara, *et al.* CSF-chemokines in HTLV-I-associated myelopathy: CXCL10 up-regulation and therapeutic effect of interferon-alpha. J Neuroimmunol, v.159, n.1-2, Feb, p.177-82. 2005.

Nascimento, C. R., M. A. Lima, *et al.* Monocytes from HTLV-1-infected patients are unable to fully mature into dendritic cells. Blood, v.117, n.2, Jan 13, p.489-99. 2011.

Nielsen, C. H., M. P. Galdiers, *et al.* The self-antigen, thyroglobulin, induces antigen-experienced CD4+ T cells from healthy donors to proliferate and promote production of the regulatory cytokine, interleukin-10, by monocytes. Immunology, v.129, n.2, Feb, p.291-9. 2009.

Nishioka, K., I. Maruyama, *et al.* Chronic inflammatory arthropathy associated with HTLV-I. Lancet, v.1, n.8635, Feb 25, p.441. 1989.

Nishiura, Y., T. Nakamura, *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, Aug, p.227-33. 1996.

O'Brien, W. A., K. Grovit-Ferbas, *et al.* Human immunodeficiency virus-type 1 replication can be increased in peripheral blood of seropositive patients after influenza vaccination. Blood, v.86, n.3, Aug 1, p.1082-9. 1995.

Olindo, S., A. Lezin, *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, Oct 15, p.53-9. 2005.

Oliveira, P., N. M. Castro, *et al.* Prevalence of erectile dysfunction in HTLV-1-infected patients and its association with overactive bladder. Urology, v.75, n.5, May, p.1100-3. 2010.

Osame, M., K. Usuku, *et al.* HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. Lancet, v.1, n.8488, May 3, p.1031-2. 1986.

Parronchi, P., D. Macchia, *et al.* Allergen- and bacterial antigen-specific T-cell clones established from atopic donors show a different profile of cytokine production. Proc Natl Acad Sci U S A, v.88, n.10, May 15, p.4538-42. 1991.

Pedral-Sampaio, D. B., E. Martins Netto, *et al.* Co-Infection of Tuberculosis and HIV/HTLV Retroviruses: Frequency and Prognosis Among Patients Admitted in a Brazilian Hospital. Braz J Infect Dis, v.1, n.1, Mar, p.31-35. 1997.

Poetker, S. K., A. F. Porto, *et al.* Clinical manifestations in individuals with recent diagnosis of HTLV type I infection. J Clin Virol, v.51, n.1, May, p.54-8. 2011.

Poiesz, B. J., F. W. Ruscetti, *et al.* Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. Proc Natl Acad Sci U S A, v.77, n.12, Dec, p.7415-9. 1980.

Popovic, M., N. Flomenberg, *et al.* Alteration of T-cell functions by infection with HTLV-I or HTLV-II. Science, v.226, n.4673, Oct 26, p.459-62. 1984.

Porto, M. A., L. M. Alcantara, *et al.* Atypical clinical presentation of strongyloidiasis in a patient co-infected with human T cell lymphotropic virus type I. Am J Trop Med Hyg, v.72, n.2, Feb, p.124-5. 2005.

Ribas, J. G. e G. C. Melo. [Human T-cell lymphotropic virus type 1(HTLV-1)-associated myelopathy]. Rev Soc Bras Med Trop, v.35, n.4, Jul-Aug, p.377-84. 2002.

Richardson, J. H., A. J. Edwards, *et al.* In vivo cellular tropism of human T-cell leukemia virus type 1. J Virol, v.64, n.11, Nov, p.5682-7. 1990.

Rosok, B., P. Voltersvik, *et al.* Dynamics of HIV-1 replication following influenza vaccination of HIV+ individuals. Clin Exp Immunol, v.104, n.2, May, p.203-7. 1996.

Sabin, E. A., M. I. Araujo, *et al.* Impairment of tetanus toxoid-specific Th1-like immune responses in humans infected with *Schistosoma mansoni*. J Infect Dis, v.173, n.1, Jan, p.269-72. 1996.

Sabouri, A. H., K. Usuku, *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, Sep 15, p.2411-20. 2008.

Saito, M., T. Matsuzaki, *et al.* In vivo expression of the HBZ gene of HTLV-1 correlates with proviral load, inflammatory markers and disease severity in HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). Retrovirology, v.6, p.19. 2009.

Santos, S. B., P. Oliveira, *et al.* Immunological and viral features in patients with overactive bladder associated with human T-cell lymphotropic virus type 1 infection. J Med Virol, v.84, n.11, Nov, p.1809-17. 2012.

Santos, S. B., A. F. Porto, *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, n.1, Mar 2, p.7. 2004.

_____. 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.

Schachter, D., L. Cartier, *et al.* Osteoporosis in HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). Bone, v.33, n.2, Aug, p.192-6. 2003.

Seiki, M., S. Hattori, *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, Jun, p.3618-22. 1983.

Shembade, N. e E. W. Harhaj. Role of post-translational modifications of HTLV-1 Tax in NF-kappaB activation. World J Biol Chem, v.1, n.1, Jan 26, p.13-20. 2010.

Silva, M. T., F. Coutinho, *et al.* Isolated bladder dysfunction in human T lymphotropic virus type 1 infection. Clin Infect Dis, v.48, n.3, Feb 1, p.e34-6. 2009.

Suzuki, M., C. S. Dezzutti, *et al.* Modulation of T-cell responses to a recall antigen in human T-cell leukemia virus type 1-infected individuals. Clin Diagn Lab Immunol, v.6, n.5, Sep, p.713-7. 1999.

Tachibana, N., A. Okayama, *et al.* Suppression of tuberculin skin reaction in healthy HTLV-I carriers from Japan. Int J Cancer, v.42, n.6, Dec 15, p.829-31. 1988.

Tacke, F. e G. J. Randolph. Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. Immunobiology, v.211, n.6-8, p.609-18. 2006.

Takamori, A., A. Hasegawa, *et al.* Functional impairment of Tax-specific but not cytomegalovirus-specific CD8+ T lymphocytes in a minor population of asymptomatic human T-cell leukemia virus type 1-carriers. Retrovirology, v.8, p.100. 2011.

Takamoto, T., M. Makino, *et al.* HTLV-I-infected T cells activate autologous CD4+ T cells susceptible to HTLV-I infection in a costimulatory molecule-dependent fashion. Eur J Immunol, v.27, n.6, Jun, p.1427-32. 1997.

Takatsuki, K. Discovery of adult T-cell leukemia. Retrovirology, v.2, p.16. 2005.

Tassignon, J., W. Burny, *et al.* Monitoring of cellular responses after vaccination against tetanus toxoid: comparison of the measurement of IFN-gamma production by ELISA, ELISPOT, flow cytometry and real-time PCR. J Immunol Methods, v.305, n.2, Oct 30, p.188-98. 2005.

Uchiyama, T., J. Yodoi, *et al.* Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. Blood, v.50, n.3, Sep, p.481-92. 1977.

Ureta-Vidal, A., C. Angelin-Duclos, *et al.* Mother-to-child transmission of human T-cell-leukemia/lymphoma virus type I: implication of high antiviral antibody titer and high proviral load in carrier mothers. Int J Cancer, v.82, n.6, Sep 9, p.832-6. 1999.

Verdonck, K., E. Gonzalez, *et al.* HTLV-1 infection is associated with a history of active tuberculosis among family members of HTLV-1-infected patients in Peru. Epidemiol Infect, v.136, n.8, Aug, p.1076-83. 2008.

White, J. D., S. L. Zaknoen, *et al.* Infectious complications and immunodeficiency in patients with human T-cell lymphotropic virus I-associated adult T-cell leukemia/lymphoma. Cancer, v.75, n.7, Apr 1, p.1598-607. 1995.

Wolk, K., W. D. Docke, *et al.* Impaired antigen presentation by human monocytes during endotoxin tolerance. Blood, v.96, n.1, Jul 1, p.218-23. 2000.

Yamano, Y., C. J. Cohen, *et al.* Increased expression of human T lymphocyte virus type I (HTLV-I) Tax11-19 peptide-human histocompatibility leukocyte antigen A*201 complexes on CD4+ CD25+ T Cells detected by peptide-specific, major histocompatibility complex-restricted antibodies in patients with HTLV-I-associated neurologic disease. J Exp Med, v.199, n.10, May 17, p.1367-77. 2004.

Yoshida, M. Multiple viral strategies of HTLV-1 for dysregulation of cell growth control. Annu Rev Immunol, v.19, p.475-96. 2001.

Younis, I. e P. L. Green. The human T-cell leukemia virus Rex protein. Front Biosci, v.10, Jan 1, p.431-45. 2005.

Yssel, H., R. De Waal Malefyt, *et al.* IL-10 is produced by subsets of human CD4+ T cell clones and peripheral blood T cells. J Immunol, v.149, n.7, Oct 1, p.2378-84. 1992.

ANEXOS

ANEXO 1

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para participação no estudo que avalia a resposta imune de indivíduos com HTLV-1 a antígenos não relacionados ao vírus

Nome do Projeto:

“Avaliação da Resposta Imune em Indivíduos Infectados pelo HTLV-1 a Antígenos não Relacionados ao Vírus”

Nome do Participante: _____

Investigador Principal: Dr. Edgar Marcelino de Carvalho Filho, pesquisador e chefe do Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Rua João das Botas, S/N - Canela - 40110-160 - Salvador - Bahia.

Comitê de Ética: Maternidade Climério de Oliveira - UFBA. Rua Augusto Viana, s/n, Canela - Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, 1º andar.

Convite e objetivos – Você está sendo convidado a participar de um estudo que tem como objetivo avaliar a resposta imunológica em indivíduos infectados pelo HTLV-1 antes e após a vacinação para tétano. Participam deste estudo pacientes portadores assintomáticos do HTLV-1 (não desenvolvem doença) e indivíduos não infectados pelo HTLV-1. Além das informações aqui prestadas você pode perguntar tudo sobre o estudo ao seu médico. Caso decida participar do estudo, será solicitada a sua assinatura neste termo de consentimento.

Participação Voluntária – A sua participação é voluntária. Você pode desistir de participar do estudo a qualquer momento. Se depois de assinar este documento você resolver desistir de participar do estudo, não haverá qualquer prejuízo para você. Participando ou não do estudo você receberá todos os cuidados médicos dispensados aos pacientes com HTLV-1. Se você é um indivíduo não infectado pelo HTLV-1, você também receberá acompanhamento médico caso aconteça algum tipo de problema durante o procedimento desta pesquisa.

Finalidade – Este estudo visa avaliar a resposta imunológica do indivíduo infectado e não infectado pelo HTLV-1 antes e após a vacinação para o tétano.

Procedimento – Caso concorde em participar do estudo, você será solicitado a doar 30 mL de sangue, coletados por punção da veia do antebraço, para realização dos estudos imunológicos antes da vacinação. Logo após, receberá uma vacina contra o tétano. Após 60 dias (2 meses), você será convocado para doar 30 mL de sangue (também por punção da veia) para realização de estudos imunológicos após a vacinação.

Duração do Estudo – Após a assinatura do Termo de Consentimento sua participação no estudo será de 3 meses.

Confidencialidade – Qualquer informação obtida dentro do estudo só será de conhecimento da equipe que participa do estudo. Você e qualquer participante deste estudo não serão identificados por nome nas publicações dos resultados do estudo.

Análise de Riscos e Benefícios – A coleta de sangue, que será realizada por um profissional da saúde treinado, pode vir acompanhada de dor ou vermelhidão no local onde é feita a retirada do sangue. Caso isso aconteça, você será atendido por um médico

do Ambulatório de HTLV-1 para diminuir tais desconfortos. Inicialmente, a vacina antitetânica não oferece risco algum para sua saúde. Caso haja coceira ou dor no local de aplicação da vacina ou da retirada do sangue, uma pomada será utilizada para aliviar os sintomas.

Retorno de Benefícios para o Sujeito e para a Sociedade - Estudos anteriores relataram que em pacientes portadores assintomáticos do HTLV-1, a resposta imunológica não é eficaz contra a toxina do tétano. Então, um estudo que investigue a falta de resposta na infecção pelo HTLV-1 faz-se necessário para que se possa compreender os mecanismos envolvidos nessa ausência de resposta. Esse entendimento contribuirá para um melhor acompanhamento dos pacientes que apresentam infecção pelo HTLV-1 e outras doenças ao mesmo tempo.

Custos - Você não terá custos com a sua participação no estudo.

Esclarecimento - Caso você precise de esclarecimentos preliminares pode contar com os seguintes investigadores pelo telefone (71) 3237-7353: Dr. Edgar Marcelino de Carvalho Filho, Dra. Silvane Braga Santos e Anselmo Souza. Se você tiver dúvidas sobre os direitos dos participantes de pesquisas ou sobre injúrias secundárias à participação em projetos de pesquisas, favor contactar o Comitê de Ética em Pesquisa Maternidade Climério de Oliveira, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, no telefone (71) 3283-8043.

Consentimento: Se você leu o consentimento informado ou este lhe foi explicado e você aceita participar do estudo, favor assinar o nome abaixo. Será entregue a você uma cópia deste formulário para guardar.

Sim, aceito participar do estudo.

Não, não aceito participar do estudo.

.....
Assinatura do participante

.....
Data

.....
Hora

.....
Assinatura do pesquisador

.....
Data

.....
Hora

.....
Assinatura da testemunha

.....
Data

.....
Hora

ANEXO 2

Ofício do Comitê de Ética em Pesquisa da MCO - UFBA



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP/MCO/UFBA
MATERNIDADE CLIMÉRIO DE OLIVEIRA
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
IORG0003460. Assurance FWA00002471, October 26, 2010
IRB00004123, October 5, 2007 - October 4, 2010

Rua Augusto Viana, s/nº, Canela – Hospital Universitário Professor Edgard Santos, 1.º andar
Cep: 40.110-160 – Salvador-Bahia telefax: (71) 3283-8043 e-mail: cepcco@ufba.br homepage: www.cepcco.ufba.br

PARECER/RESOLUÇÃO ADITIVA N.º 154/2009

Para análise e deliberação deste Institucional o Professor, Doutor, **Edgar Marcelino de Carvalho**, Pesquisador Responsável pelo Projeto de Pesquisa “**Avaliação da resposta imune em indivíduos infectados pelo HTLV-1 a antígenos não relacionados ao vírus**”, posto sob pendência em 27 de Maio de 2009 pelo Parecer/Resolução N° 039/2009 deste Colegiado, encaminhou, em 01 de Julho de 2009, o novo “**Termo de Consentimento Livre e Pré-Esclarecido**” em atendimento ao referido Parecer. Σ

Inexistindo na proposição analisada conflito administrativo, processual e ético que contra-indique a continuidade executória local do Estudo, fica a mesma **aprovada**. Σ

Antônio dos Santos Barata

Salvador, 10 de Julho de 2009

Antônio dos Santos Barata
Professor, Doutor, Antônio dos Santos Barata,
Coordenador – CEP/MCO/UFBA

Observações importantes. Toda a documentação anexa ao Protocolo proposto e rubricada pelo (a) Pesquisador (a), arquivada neste CEP, e também a outra devolvida com a rubrica da Secretária deste (a) ao (à) mesmo (a), faz parte intrínseca deste Parecer/Resolução e nas “Recomendações Adicionais” apensas, **bem como a impostergável entrega de relatórios parciais e final como consta nesta liberação**, (Modelo de Redação para Relatório de Pesquisa, anexo).

ANEXO 3

“Decrease of the immune response against tetanus toxoid in HTLV-1 infected subjects”. *Retrovirology* (em processo de submissão, *vide* Normas de Publicação no ANEXO 4).

Decrease of the immune response against tetanus toxoid in HTLV-1 infected subjects

Anselmo Souza^{1,3*}, Silvane Santos^{1,2,3*}, Lucas P. Carvalho^{1,3*}, Edgar M. Carvalho^{1,3*§}

¹Serviço de Imunologia, Hospital Professor Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil.

²Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia, Brazil

³Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Doenças Tropicais (INCT-DT)

*These authors contributed equally to this work

§Corresponding author

Email addresses:

AS: anselmossouza@yahoo.com.br

SS: silvane@ufba.br

LPC: carvalholp@ig.com.br

EMC: edgar@ufba.br

Abstract

Background: HTLV-1 is an etiologic agent of Adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL) and HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). It was shown that peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from HTLV-1 infected subjects do not proliferate after stimulation with recall antigens such as purified protein derivate (PPD) from *Mycobacterium tuberculosis* and tetanus toxoid (TT). Some factors may be involved in this abnormality: regulatory T cell function and dysfunctional antigen-presenting cells (APC). The aim of this study was To evaluate the immune response against TT in HTLV-1 infected subjects.

Results: It was selected 14HTLV-1 carriers with low IFN- γ production and 12 healthy controls (HC). It was performed serology for TT. The seronegative individuals were immunized with TT. After immunization, patients had low IgG anti-TT production when compared with healthy controls ($p = 0.007$). Frequency of CD4⁺ T cells expressing IFN- γ , TNF and IL-10, after stimulus, were lower in patients than the controls after immunization ($p = 0.01$, $p = 0.04$ and $p = 0.01$, respectively). Monocytes from patients did not increase the HLA-DR expression after stimulation with TT. TNF and IL-12 expression by monocytes from patients increased after stimulation ($p = 0.009$ and $p = 0.006$, respectively). **Conclusions:** HTLV-1 infected subjects, after vaccination, presented a decreasing of the humoral and cellular immune response against TT. Monocytes from the patients showed an impairment of antigen presentation through the HLA-DR expression mechanisms. However, the second signal (CD80 and CD86 expression) and cytokine expression did not show abnormalities. These results suggest that these immunological mechanisms may

participate of the increasing susceptibility of HTLV-1 infected subjects to acquire others infectious diseases.

Key words: HTLV-1, antibody, lymphocytes, monocytes.

Background

The human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) is a retrovirus that infects 10 to 20 million people worldwide [1]. Adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL) [2] and HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) [3] are the main diseases associated with the virus. However, a large percentage of infected individuals remain only as HTLV-1 carriers (HC) [4].

HTLV-1 infects predominantly CD4⁺ T cells leading to spontaneous lymphocyte proliferation and cytokine production in the absence of stimulus [5]. Both CD4⁺ and CD8⁺ cells produce proinflammatory cytokines, such as interferon-gamma (IFN- γ), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) [6-8]. In vitro studies have shown that HC have a higher cytokine production when compared with healthy subjects (HS) [9], and that HAM/TSP patients produce more IFN- γ and TNF- α than HC [10].

It is known that HTLV-1-infected individuals are more susceptible to infectious diseases. Subjects infected with HTLV-1 and *Strongyloides stercoralis* develop more frequently recurrent and disseminated strongyloidiasis due to an impaired immunological response to worm antigens [11, 12]. Another example is the association between tuberculosis and HTLV-1 infection. In Peru, individuals infected with HTLV-1 have a two-fold increased chance of acquiring tuberculosis [13]. In Salvador, Bahia, an endemic area for tuberculosis and HTLV-1, individuals infected with HTLV-1 have a 2.6 times greater risk of acquiring an infection with *Mycobacterium tuberculosis* [14].

Regarding immune response, the frequency of HTLV-1 carriers who have negative tuberculin skin test (TST) is higher than in seronegative controls [15].

Moreover, it has been documented that HTLV-1 infected individuals have impaired lymphoproliferation to *M. tuberculosis* antigen, tetanus toxoid, cytomegalovirus and candidin [16]. Possible factors that may contribute to this suppression include decreased ability of antigen-presenting cells (APCs) to present antigen and/or production of regulatory cytokines. In patients with ATLL, a decreased expression of HLA-DR has been documented [17, 18]. It has been shown that IL-12 enhances lymphocyte proliferation and IFN- γ production of HTLV-1 infected subjects [19].

It is known that HTLV-1 carriers have a high IL-10 production [9]. Moreover, a direct correlation between IFN- γ and IL-10 production in HTLV-1 carriers has been interpreted as an attempt to down-modulate the exaggerated immune response induced by the virus, and consequently to prevent tissue damage due to exacerbation of proinflammatory cytokine production during HTLV-1 infection [20]. However, enhancement in IL-10 production may decrease the immune response to other antigens. Our hypothesis is that HTLV-1 infected subjects have a decreased humoral and cellular immune response against tetanus toxoid (TT) and monocytes from these individuals have a decreased ability to express costimulatory molecules and/or abnormalities in cytokine production. In this study we evaluated monocyte expression of costimulatory molecules (CD80 and CD86), HLA-DR and cytokines (TNF, IL-10 and IL-12), after stimulation with and tetanus toxoid (TT).

Results

Humoral and cellular immune response against TT

The production of antigen specific IgG after immunization with TT in HTLV-1 infected subjects and controls is shown in figure 1. The median of the observances in healthy subjects (0.800) ranging from 0.52 to 1.04 was higher ($P=0.007$) than in HTLV-1 infected subjects who had median of 0.48 ranging from 0.23 to 1.1. There was no correlation between antibody titers and production of IFN- γ (Figure 1).

The frequency of CD4 and CD8 T cells displaying cytokines in cultures stimulated with TT were also different among HTLV-1 infected individuals and healthy subjects. The median of CD4 T cells expressing IFN- γ in healthy subjects was 0.3 ranging from 0.2 to 14 while in HTLV-1 infected subjects was 0.15 ranging from 0.1 to 0.4 ($P=0.01$). The frequency of CD4⁺ T cells expressing IL-10 was also higher ($P=0.01$) in healthy subjects 0.4 ranging from 0.2 to 13 than in HTLV-1 infected subjects median of 0.2 ranging from 0.1 to 0.4. Indeed the frequency of CD8 T cells expressing TNF- α in healthy subjects was also higher in healthy subjects than in HTLV-1 infected subjects ($P=0.04$) (Figure 2).

HLA-DR, CD80, CD86 and cytokines expression by monocytes

The phenotypic characteristics of monocytes in HTLV-1 infected subjects and in healthy controls were also different. Specifically the intensity of the expression of HLA-DR in CD14 cells was higher healthy subjects median of 552 ranging from 112 to 4013 than in HTLV-1 infected subjects 504 ranging from 68 to 2349. There was no difference regarding the expression of CD80 and CD86 between HTLV-1 infected individuals and healthy subjects (Figure 3).

Both HTLV-1 infected individuals and healthy subjects increased the frequency of cells expressing TNF- α , IL-12 and IL-10 after stimulation with TT but significant increasing was only observed in HTLV-1 infected individuals (Figure 4).

Discussion

The association of other infectious diseases with HTLV-1 infection is well documented and severe factors may participate to increase the susceptibility of HTLV-1 infected subjects to have an abnormal immune response to a biased antigen. Here in we showed that antibodies production as well as the frequency of cells expressing cytokines upon stimulation with TT after immunization with this antigen were higher in healthy subjects than in HTLV-1 infected individuals indicating an impairment in both antibody production and cell mediated immunity of HTLV-1 infected subjects in develop an immune response to a biased antigen.

During HTLV-1 infection immunologic abnormalities have been documented in both antigen presenting cells and in T cells which could impair immunologic response to other antigens. The increased susceptibility to *Strongyloides stercoralis* in HTLV-1 infected individuals have been associated with a decrease in the Th2 type of immune against parasite antigens [21] and also due to an increasing in regulatory T cells [22]. It has been shown in patients with HTLV-1 and strongiloidiasis a negative correlation between IFN- γ with IL-5, and IFN- γ with total and parasite specific IgE.

In the present study because the majority of subjects infected with HTLV-1 have a high production of cytokines and an increased lymphocyte proliferative response even in unstimulated culture we decide to only include subjects who had low production of IFN- γ and TNF- α . These cytokines are determined in all participants at

the admission in the HTLV-1 clinic. However when we determine the production of cytokines in unstimulated cultures previous to the immunization about 50% of infected subjects had higher levels of IFN- γ . However even having a limited number of subjects with high production of IFN- γ we showed that there was no correlation between IFN- γ productions an unstimulated cultures and production of IgG to tetanus toxoid after immunization with this antigen. IFN- γ contribute to IgG production [23] but it can down modulate IgG1 response. We did not evaluate IgG subclasses but the observation indicates that high levels of IFN- γ may have little influence in antigen specific IgG levels.

As cytokine production and frequency of cells expressing these cytokines are increased in HTLV-1 it is difficult sometimes to evaluate the influence of antigen stimulation in cytokine production and in the frequency of cells expressing cytokines. However we showed that the frequency of CD4 T cells expressing IFN- γ and IL-10 as well as the frequency of CD8 T cells expressing TNF- α was higher in healthy subjects than in HTLV-1 infected subjects in cultures stimulated with TT. This indicates that in HTLV-1 infection there is a decrease in the production of both pro-inflammatory and regulatory cytokines after immunization with TT.

The impairment in T cells in produce cytokine and produce antibody after immunization with TT antigen may be due to defect in antigen presenting cells. Because HTLV-1 infected predominantly T cells very little attention have be given to antigen present cells. However HTLV-1 may infected monocytes/macrophages as well as dendritic cells [24, 25]. Moreover it has been shown that dendritic cells from HTLV-1 infected subjects express less HLA-DR [17] and that there is impairment on the differentiation of macrophages to dendritic cells in HTLV-1 infected subjects. It is relevant to pointed out that these previous studies included patients with HAM/TSP,

whose are known to present more immunologic abnormalities, since lymphocyte proliferation and IFN- γ production in unstimulated cultures are higher in HAM/TSP than in HTLV-1 carriers. Here all participants of the study were HTLV-1 carriers and the majority of them had little or no evidence of lymphocyte activation measured by secretion of IFN- γ . So even in HTLV-1 carriers without evidence of great T cell activation we showed an impairment in the expression of HLA-DR molecules that are important to the generation of an immune response. Therefore it is possible that the decreasing in the insensitivity of expression of HLA-DR by impair antigen presentation to T cells had contributed to the decreasing in antibody and in cell mediated immunity in HTLV-1 infected subjects after immunization with TT.

The cytokine production by antigen presenting cells such as IL-12 and IL-10 may influence the immunologic responses to other antigens in HTLV-1 infected subjects. We have previously shown that compared to uninfected controls HTLV-1 carriers produce more IL-10 the most important cytokine that down modulate the immunologic response in humans [9]. It was also shown that levels of IL-12 is reduced in supernatants of HTLV-1 infected subjects with tuberculosis in cultures stimulated with PPD [26] and that exogenous addition of IL-12 to lymphocyte cultures of HTLV-1 infected subjects enhance lymphocyte proliferation to PPD [19]. However our data did not show impairment in IL-12 neither higher expression of IL-10 by monocytes. Therefore while we cannot ruled out a role for regulatory cytokines in the impairment of the immune response in HTLV-1 infected subjects, as our studies were performed only monocytes we show that decreasing expression of HLA-DR may play an important role in the immune response to a biased antigen in HTLV-1 infection and may participate in the increasing susceptibility of HTLV-1 infected subjects to develop other infectious disease.

Conclusions

This study showed that HTLV-1 infected subjects, after vaccination, presented a decreasing of the humoral and cellular immune response against TT. Monocytes from the patients showed an impairment of antigen presentation through the HLA-DR expression mechanisms. However, the second signal (CD80 and CD86 expression) and cytokine expression did not show abnormalities. These results suggest that these immunological mechanisms may participate of the increasing susceptibility of HTLV-1 infected subjects to acquire others infectious diseases

Methods

Subjects

HTLV-1 carriers (HTLV, n = 14) were selected from the HTLV-1 clinic at the Hospital Universitario Professor Edgard Santos, Federal University of Bahia, Brazil. The diagnosis of HTLV-1 was performed by ELISA (Murex Biotech Limited, Dartford, UK) and confirmed by Western Blot (HTLV blot 2.4, Genelabs, Singapore). Exclusion criteria included the use of antiviral drugs or immunomodulators in the previous 90 days, helminthic infection, co-infection with HIV, HCV, HBV or tuberculosis and presence of diseases. Motor dysfunction was determined by Osame's Motor Disability Score (OMDS) [3] and the degree of neurological involvement was assessed by the Expanded Disability Status Scale (EDSS) [27]. Patients with OMDS = 0 and EDSS = 0 were selected.

HTLV-1 seronegative healthy subjects (HS, n = 12) were employees from the Immunology Service, Hospital Universitario Professor Edgard Santos. The Ethical Committee of the Maternidade Climério de Oliveira approved this study (number 154/2009) and informed consent was obtained from all prospectively enrolled subjects.

Serology for tetanus toxoid and immunization

The serology for TT consisted of ELISA. A 96-wells plate was coated with TT (0.1 Lf/mL), overnight, 4 °C. The sera from patients and HS were diluted (1:100) and incubated during 1 hour, 37 °C. Anti-human IgG alkaline phosphatase conjugate (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA) was diluted (1:1,000) and incubated for 1 hour, 37 °C. 1 mg/mL of pNPP (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA) was used to

reveal the reaction. The plate was read at 405 nm. Serum of immunized individuals was used as positive control. Serum of non-immunized individuals (more than 10 years of the last immunization) was used as negative controls. It was considered seronegative to TT if the optical density (O.D.) was lower than the *cut-off*. The *cut-off* was calculated with the mean of the O.D. from the negative controls plus two standard deviation (mean + 2 x S.D.).

Patients and HS with negative serology to TT were immunized. After two vaccine doses, they returned to collect the blood and serum. Immunological evaluations were performed before and after immunization.

PBMC isolation and Flow cytometry

PBMC from HTLV-1 and HS were obtained from heparinized venous blood samples by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation. Cultures of 4×10^5 PBMC were prepared in RPMI 1640 plus 5% heat inactivated human AB serum (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO), antibiotics and glutamine.

To evaluate the cytokine expression by monocytes, PBMC were cultured during 20 hours with TT (0,5 Lf/mL). The last four hours it was added Brefeldin A (1 μ g/mL). The cells were labeled with anti-CD4 and anti-CD8 and fixed with formaldehyde. After, cells were labeled with anti-IFN- γ , anti-TNF and anti-IL-10 for 30 minutes at room temperature.

To evaluate costimulatory molecules and HLA-DR expression in monocytes, PBMC were cultured during 6 hours without stimulus, or were stimulated with tetanus toxoid (0.5 Lf/mL). Cells were then incubated with FITC, PE or PE-Cy5-labeled monoclonal antibodies (Ig controls, CD14, HLA-DR, CD80 and CD86) for 20 minutes at 4°C. All mentioned reagents were from BD Pharmingen, Franklin Lakes,

NJ. After staining, preparations were washed with phosphate-buffer saline (PBS), fixed with 2% formaldehyde in PBS and kept at 4 °C until data acquisition using a FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA). To evaluate cytokine expression, the fixed cells were permeabilized with a solution of Saponin and stained, for 30 minutes at 4 °C, using anti-cytokine monoclonal antibodies (TNF- α , IL-12, IL-10) conjugated with PE (BD Pharmingen).

In all cases, 100,000 gated events were acquired for later analysis in FACScanto II cytometer. Analysis was performed using FlowJo Software version 7.6.1.

Statistical analysis

Wilcoxon signed rank test was used to compare the cytokine and surface molecule expression between cells with or without stimulation. Mann-Whitney test was used to compare results between the HS group and the HTLV-1 group. An alpha of 5% ($p < 0.05$) was considered for statistical significance. Analyses were performed using Graphpad Prism version 5.0.

Competing interests

The author(s) have no competing interests.

Authors' contributions

AS, SS, LPC and EMC participated equally in the study design.

AS and EMC drafted the manuscript.

AS and SS performed PBMC isolation.

AS and LPC performed flow cytometry.

All the authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We are grateful to Elbe Myrtes Silva and Lúcia Reis for their secretarial assistance.

This work was supported by the CNPq, and the NIH Training Grants R01 AI079238A (EMC). AS, SS, LPC and EMC are funded by the CNPq.

References

1. Edlich RF, Arnette JA, Williams FM: **Global epidemic of human T-cell lymphotropic virus type-I (HTLV-I).** *J Emerg Med* 2000, **18**:109-119.
2. Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC: **Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980, **77**:7415-7419.
3. Osame M, Usuku K, Izumo S, Ijichi N, Amitani H, Igata A, Matsumoto M, Tara M: **HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity.** *Lancet* 1986, **1**:1031-1032.
4. Hollsberg P, Hafler DA: **Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Pathogenesis of diseases induced by human lymphotropic virus type I infection.** *N Engl J Med* 1993, **328**:1173-1182.
5. Prince H, Kleinman S, Doyle M, Lee H, Swanson P: **Spontaneous lymphocyte proliferation in vitro characterizes both HTLV-I and HTLV-II infection.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 1990, **3**:1199-1200.
6. 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, **161**:482-488.
7. Nishimoto N, Yoshizaki K, Eiraku N, Machigashira K, Tagoh H, Ogata A, Kuritani T, Osame M, Kishimoto T: **Elevated levels of interleukin-6 in serum and cerebrospinal fluid of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis.** *J Neurol Sci* 1990, **97**:183-193.
8. Osame M: **Pathological mechanisms of human T-cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy (HAM/TSP).** *J Neurovirol* 2002, **8**:359-364.
9. Carvalho EM, Bacellar O, Porto AF, Braga S, Galvao-Castro B, Neva F: **Cytokine profile and immunomodulation in asymptomatic human T-lymphotropic virus type 1-infected blood donors.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2001, **27**:1-6.
10. Santos SB, Porto AF, Muniz AL, de Jesus AR, Magalhaes E, Melo A, Dutra WO, Gollob KJ, Carvalho EM: **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.
11. Porto MA, Alcantara LM, Leal M, Castro N, Carvalho EM: **Atypical clinical presentation of strongyloidiasis in a patient co-infected with human T cell lymphotropic virus type I.** *Am J Trop Med Hyg* 2005, **72**:124-125.
12. Porto AF, Santos SB, Muniz AL, Basilio V, Rodrigues W, Jr., Neva FA, Dutra WO, Gollob KJ, Jacobson S, Carvalho EM: **Helminthic infection down-regulates type 1 immune responses in human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) carriers and is more prevalent in HTLV-1 carriers than in patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis.** *J Infect Dis* 2005, **191**:612-618.
13. Verdonck K, Gonzalez E, Schrooten W, Vanham G, Gotuzzo E: **HTLV-1 infection is associated with a history of active tuberculosis among family members of HTLV-1-infected patients in Peru.** *Epidemiol Infect* 2008, **136**:1076-1083.

14. de Lourdes Bastos M, Osterbauer O, Mesquita DL, Carrera CA, Albuquerque MJ, Silva L, Pereira DN, Riley L, Carvalho EM: **Prevalence of human T-cell lymphotropic virus type 1 infection in hospitalized patients with tuberculosis.** *Int J Tuberc Lung Dis* 2009, **13(12)**:1519-1523.
15. Tachibana N, Okayama A, Ishizaki J, Yokota T, Shishime E, Murai K, Shioiri S, Tsuda K, Essex M, Mueller N: **Suppression of tuberculin skin reaction in healthy HTLV-I carriers from Japan.** *Int J Cancer* 1988, **42**:829-831.
16. Mascarenhas RE, Brodskyn C, Barbosa G, Clarencio J, Andrade-Filho AS, Figueiroa F, Galvao-Castro B, Grassi F: **Peripheral blood mononuclear cells from individuals infected with human T-cell lymphotropic virus type 1 have a reduced capacity to respond to recall antigens.** *Clin Vaccine Immunol* 2006, **13**:547-552.
17. Makino M, Wakamatsu S, Shimokubo S, Arima N, Baba M: **Production of functionally deficient dendritic cells from HTLV-I-infected monocytes: implications for the dendritic cell defect in adult T cell leukemia.** *Virology* 2000, **274**:140-148.
18. Nascimento CR, Lima MA, de Andrada Serpa MJ, Espindola O, Leite AC, Echevarria-Lima J: **Monocytes from HTLV-1-infected patients are unable to fully mature into dendritic cells.** *Blood* 2011, **117**:489-499.
19. Suzuki M, Dezzutti CS, Okayama A, Tachibana N, Tsubouchi H, Mueller N, Lal RB: **Modulation of T-cell responses to a recall antigen in human T-cell leukemia virus type 1-infected individuals.** *Clin Diagn Lab Immunol* 1999, **6**:713-717.
20. Santos SB, Porto AF, Muniz AL, Luna T, Nascimento MC, Guerreiro JB, Oliveira-Filho J, Morgan DJ, Carvalho EM: **Modulation of T cell responses in HTLV-1 carriers and in patients with myelopathy associated with HTLV-1.** *Neuroimmunomodulation* 2006, **13**:145-151.
21. Porto AF, Santos SB, Alcantara L, Guerreiro JB, Passos J, Gonzalez T, Neva F, Gonzalez D, Ho JL, Carvalho EM: **HTLV-1 modifies the clinical and immunological response to schistosomiasis.** *Clin Exp Immunol* 2004, **137**:424-429.
22. Montes M, Sanchez C, Verdonck K, Lake JE, Gonzalez E, Lopez G, Terashima A, Nolan T, Lewis DE, Gotuzzo E, White AC, Jr.: **Regulatory T cell expansion in HTLV-1 and strongyloidiasis co-infection is associated with reduced IL-5 responses to Strongyloides stercoralis antigen.** *PLoS Negl Trop Dis* 2009, **3**:e456.
23. Kawano Y, Noma T, Yata J: **Regulation of human IgG subclass production by cytokines. IFN-gamma and IL-6 act antagonistically in the induction of human IgG1 but additively in the induction of IgG2.** *J Immunol* 1994, **153**:4948-4958.
24. de Revel T, Mabondzo A, Gras G, Delord B, Roques P, Boussin F, Neveux Y, Bahuau M, Fleury HJ, Dormont D: **In vitro infection of human macrophages with human T-cell leukemia virus type 1.** *Blood* 1993, **81**:1598-1606.
25. 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**:545-549.
26. Bastos MD, Santos S, Souza A, Finkmoore B, Bispo O, Barreto T, Cardoso I, Bispo I, Bastos F, Pereira D, et al: **Influence of HTLV-1 on the clinical,**

- microbiologic and immunologic presentation of tuberculosis.** *BMC Infect Dis* 2012, **12**:199.
27. Kurtzke JF: **Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS).** *Neurology* 1983, **33**:1444-1452.

Figure Legends

Figure 1. Serology for TT from HTLV-1 infected individuals and healthy subjects after immunization for TT. The dashed line represents the cut-off (O.D. = 0,238). Statistical analysis was performed using Mann-Whitney test.

Figure 2. Expression of cytokines from CD4⁺ and CD8⁺ T cell, stimulated with TT, from HTLV-1 infected individuals and HS before and after immunization. Statistical analysis was performed using Wilcoxon test.

Figure 3. HLA-DR (A), CD80 (B) and CD86 (C) expression by CD14⁺ monocytes from HTLV-1 infected individuals and HS with or without TT stimulation. Statistical analysis was performed using Wilcoxon test. MFI = mean of fluorescence intensity.

Figure 4. TNF (A), IL-12 (B) and IL-10 (C) expression by CD14⁺ monocytes from HTLV-1 infected individuals and HS with or without TT stimulation. Statistical analysis was performed using Wilcoxon and Mann-Whitney tests.

FIGURE 1

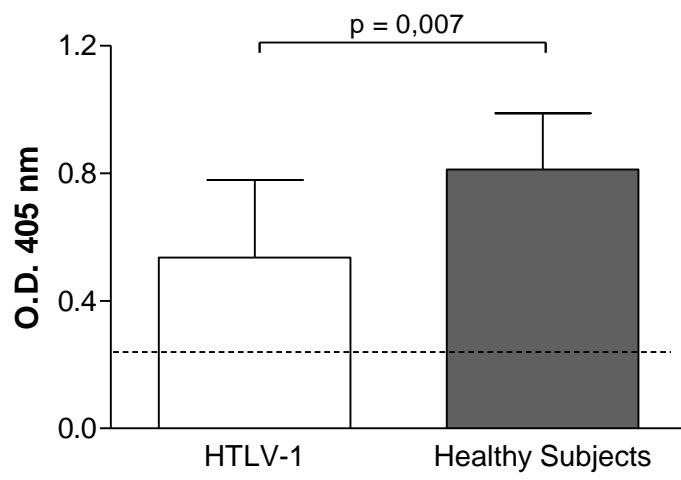


FIGURE 2

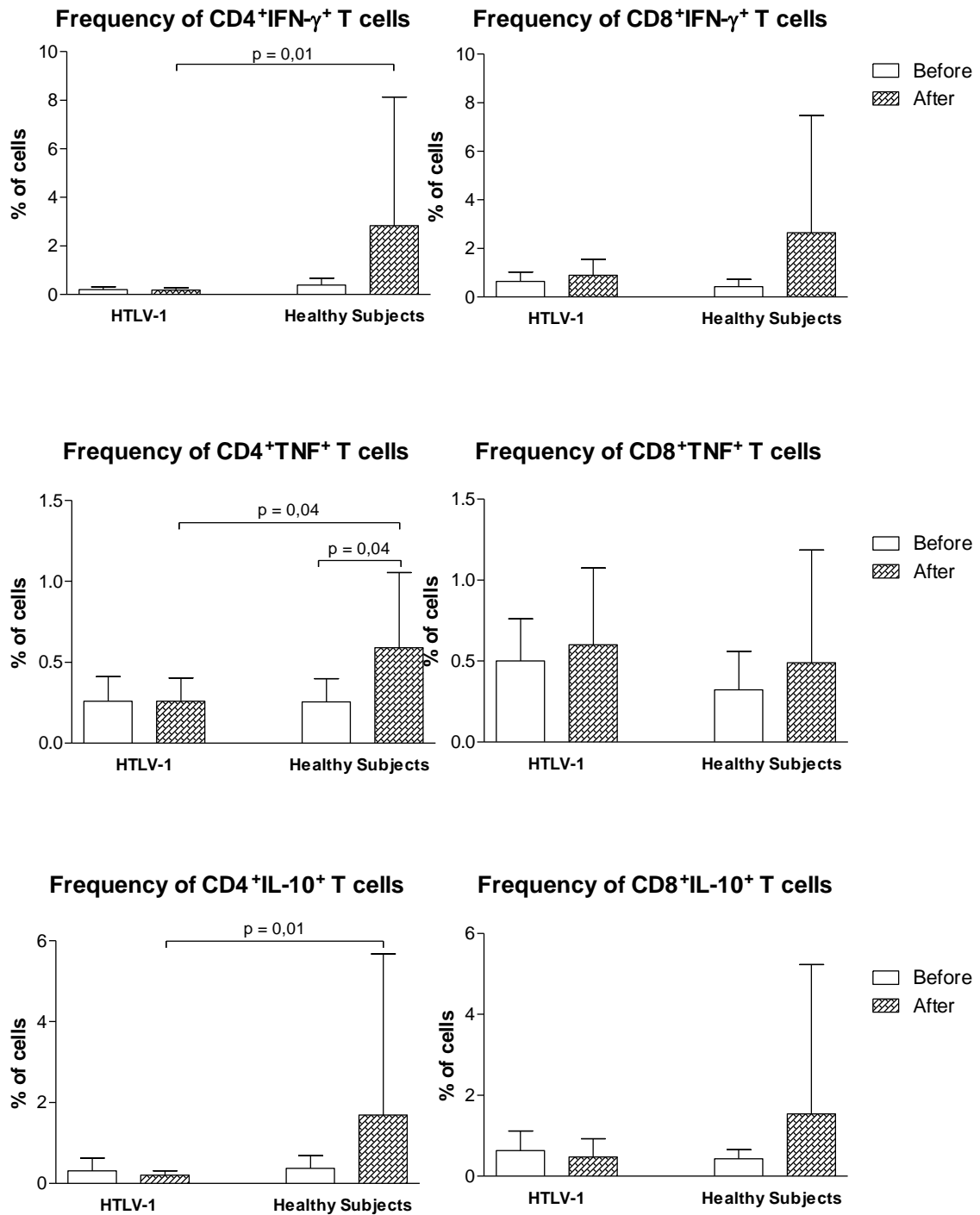


FIGURE 3

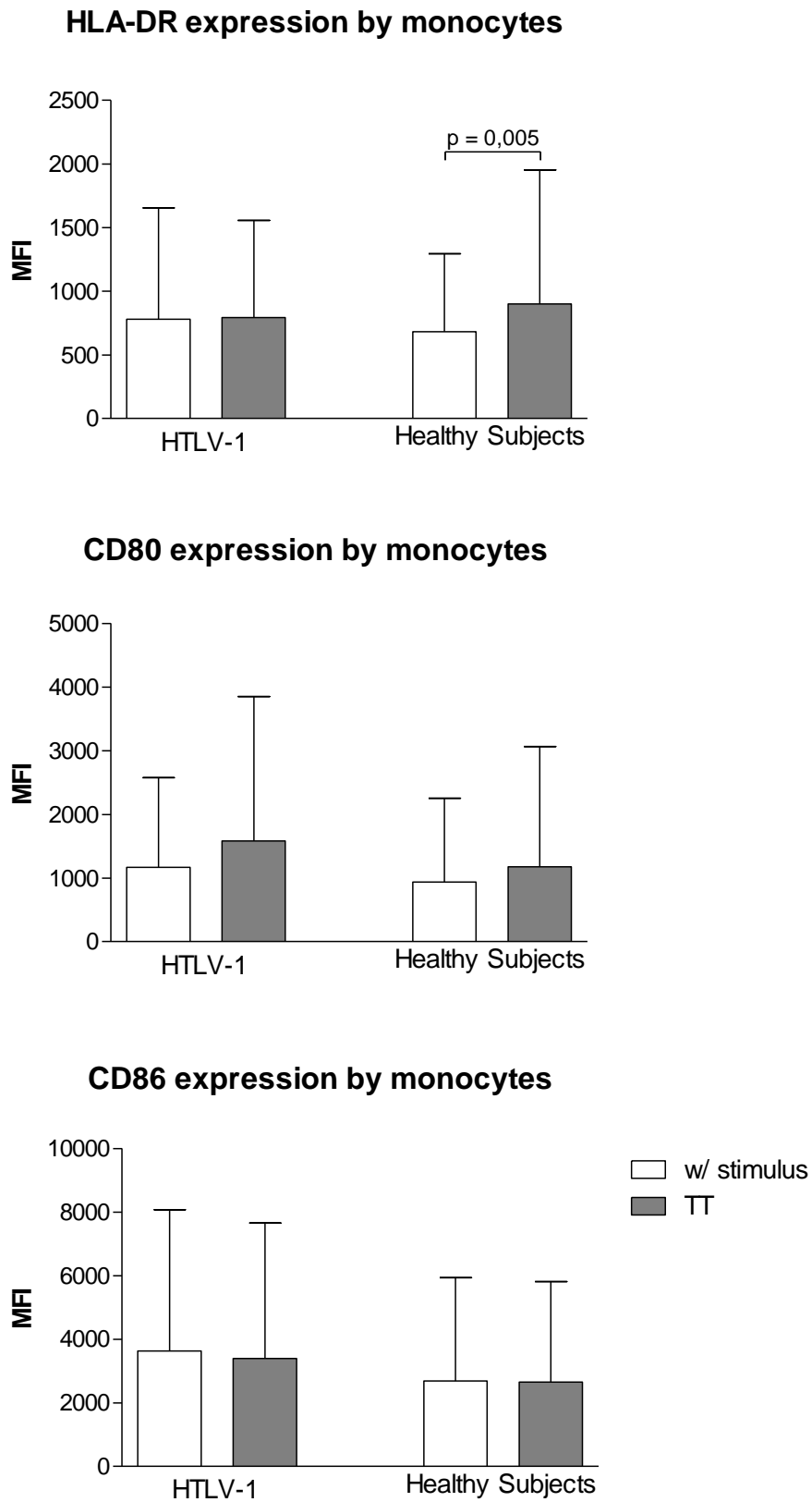
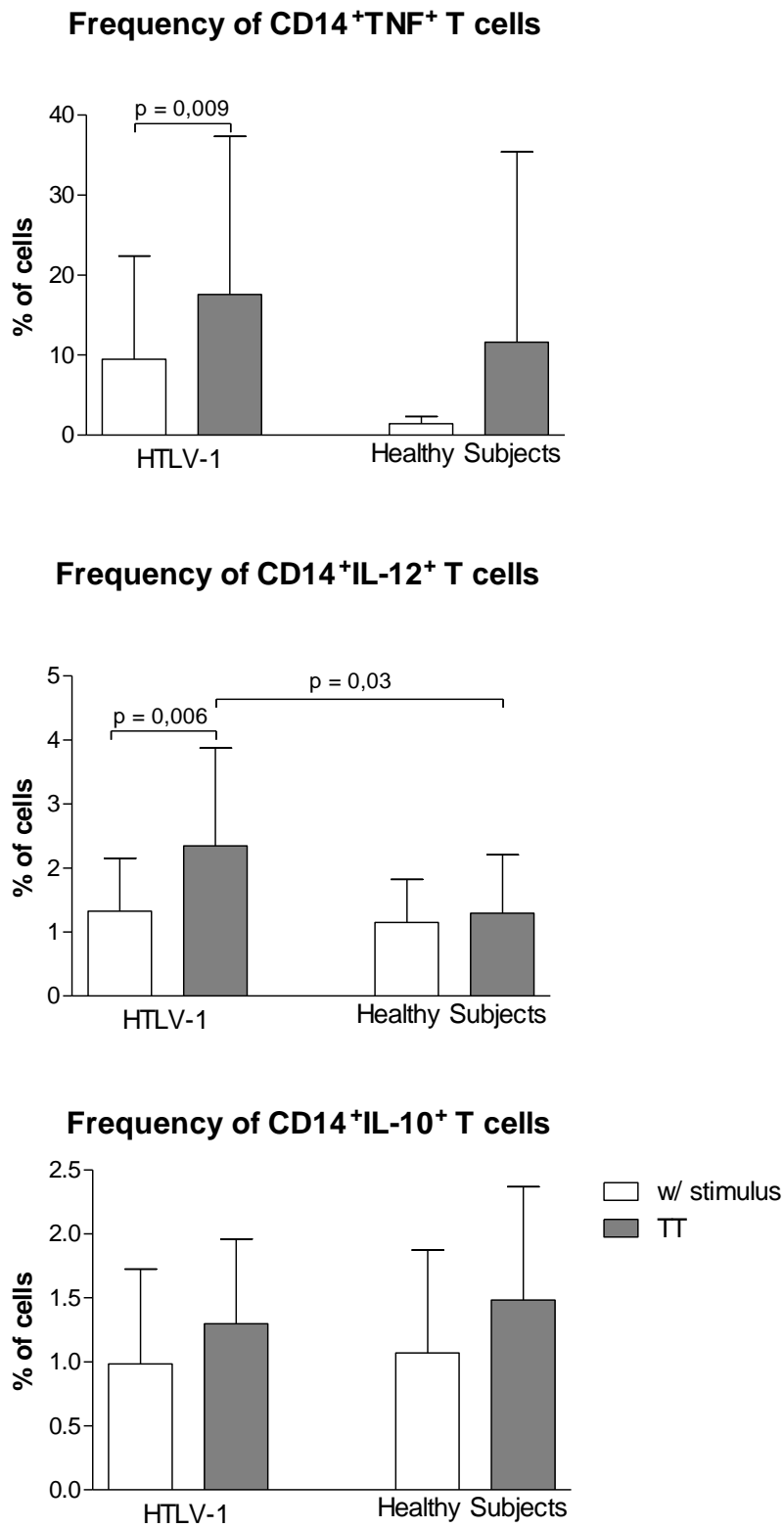


FIGURE 4



ANEXO 4

Normas de publicação da revista *Retrovirology*



Instructions for authors

Research Articles

[Submission process](#) | [Preparing main manuscript text](#) | [Preparing illustrations and figures](#) | [Preparing tables](#) | [Preparing additional files](#) | [Style and language](#)

See ['About this journal'](#) for descriptions of different article types and information about policies and the refereeing process.

Submission process

Manuscripts must be submitted by one of the authors of the manuscript, and should not be submitted by anyone on their behalf. The submitting author takes responsibility for the article during submission and peer review.

Please note that *Retrovirology* levies an article-processing charge on all accepted Research Articles; if the submitting author's institution is a [BioMed Central member](#) the cost of the article-processing charge may be covered by the membership (see [About](#) page for detail). Please note that the membership is only automatically recognised on submission if the submitting author is based at the member institution.

To facilitate rapid publication and to minimize administrative costs, *Retrovirology* accepts only [online submission](#).

Files can be submitted as a batch, or one by one. The submission process can be interrupted at any time; when users return to the site, they can carry on where they left off.

See below for examples of [word processor](#) and [graphics file formats](#) that can be accepted for the main manuscript document by the online submission system. Additional files of any type, such as [movies](#), animations, or [original data files](#), can also be submitted as part of the manuscript.

During submission you will be asked to provide a cover letter. Use this to explain why your manuscript should be published in the journal, to elaborate on any issues relating to our editorial policies in the ['About Retrovirology'](#) page, and to declare any potential competing interests. You will be also asked to provide the contact details (including email addresses) of potential peer reviewers for your manuscript. These should be experts in their field, who will be able to provide an objective assessment of the manuscript. Any suggested peer reviewers should not have published with any of the authors of the manuscript within the past five years, should not be current collaborators, and should not be members of the same research institution. Suggested reviewers will be considered alongside potential reviewers recommended by the Editor-in-Chief and/or Editorial Board members.

Assistance with the process of manuscript preparation and submission is available from [BioMed Central customer support team](#).

We also provide a collection of links to useful tools and resources for scientific authors on our [Useful Tools](#) page.

File formats

The following word processor file formats are acceptable for the main manuscript document:

- Microsoft word (DOC, DOCX)
- Rich text format (RTF)
- Portable document format (PDF)
- TeX/LaTeX (use [BioMed Central's TeX template](#))
- DeVice Independent format (DVI)

Users of other word processing packages should save or convert their files to RTF before uploading. Many free tools are available which ease this process.

TeX/LaTeX users: We recommend using [BioMed Central's TeX template and BibTeX stylefile](#). If you use this standard format, you can submit your manuscript in TeX format. If you have used another template for your manuscript, or if you do not wish to use BibTeX, then please submit your manuscript as a DVI file. We do not recommend converting to RTF.

Note that [figures](#) must be submitted as separate image files, not as part of the submitted manuscript file.

Publishing Datasets

Through a special arrangement with [LabArchives](#), LLC, authors submitting manuscripts to *Retrovirology* can obtain a [complimentary subscription to LabArchives](#) with an allotment of 100MB of storage. LabArchives is an Electronic Laboratory Notebook which will enable scientists to share and publish data files in situ; you can then link your paper to these data. Data files linked to published articles are assigned digital object identifiers (DOIs) and will remain available in perpetuity. Use of LabArchives or similar data publishing services does not replace preexisting data deposition requirements, such as for nucleic acid sequences, protein sequences and atomic coordinates.

Instructions on assigning DOIs to datasets, so they can be permanently linked to publications, can be found on the LabArchives website. Use of LabArchives' software has no influence on the editorial decision to accept or reject a manuscript.

Authors linking datasets to their publications should include an [Availability of supporting data](#) section in their manuscript and cite the dataset in their reference list.

Preparing main manuscript text

General guidelines of the journal's style and language are given [below](#).

Overview of manuscript sections for Research Articles

Manuscripts for Research Articles submitted to *Retrovirology* should be divided into the following sections (in this order):

- [Title page](#)
- [Abstract](#)
- [Keywords](#)
- [Background](#)
- [Results and discussion](#)
- [Conclusions](#)
- [Methods](#)
- [Availability of supporting data](#)
- [List of abbreviations used](#) (if any)
- [Competing interests](#)
- [Authors' contributions](#)
- [Authors' information](#)

[Acknowledgements](#)

[Endnotes](#)

[References](#)

[Illustrations and figures](#) (if any)

[Tables and captions](#)

[Preparing additional files](#)

The **Accession Numbers** of any nucleic acid sequences, protein sequences or atomic coordinates cited in the manuscript should be provided, in square brackets and include the corresponding database name; for example, [EMBL:AB026295, EMBL:AC137000, DDBJ:AE000812, GenBank:U49845, PDB:1BFM, Swiss-Prot:Q96KQ7, PIR:S66116].

The databases for which we can provide direct links are: EMBL Nucleotide Sequence Database ([EMBL](#)), DNA Data Bank of Japan ([DDBJ](#)), GenBank at the NCBI ([GenBank](#)), Protein Data Bank ([PDB](#)), Protein Information Resource ([PIR](#)) and the Swiss-Prot Protein Database ([Swiss-Prot](#)).

You can [download a template](#) (Mac and Windows compatible; Microsoft Word 98/2000) for your article.

For reporting standards please see the information in the [About](#) section.

Title page

The title page should:

- provide the title of the article
- list the full names, institutional addresses and email addresses for all authors
- indicate the corresponding author

Please note:

- abbreviations within the title should be avoided

Abstract

The Abstract of the manuscript should not exceed 350 words and must be structured into separate sections: **Background**, the context and purpose of the study; **Results**, the main findings; **Conclusions**, brief summary and potential implications. Please minimize the use of abbreviations and do not cite references in the abstract.

Keywords

Three to ten keywords representing the main content of the article.

Background

The Background section should be written in a way that is accessible to researchers without specialist knowledge in that area and must clearly state - and, if helpful, illustrate - the background to the research and its aims. The section should end with a brief statement of what is being reported in the article.

Results and discussion

The Results and discussion may be combined into a single section or presented separately. The Results and discussion sections may also be broken into subsections with short, informative headings.

Conclusions

This should state clearly the main conclusions of the research and give a clear explanation of their importance and relevance. Summary illustrations may be included.

Methods

The methods section should include the design of the study, the type of materials involved, a clear description of all comparisons, and the type of analysis used, to enable replication.

Availability of supporting data

Retrovirology requires authors to deposit the data set(s) supporting the results reported in submitted manuscripts in a publicly-accessible data repository. This section should only be included when supporting data are available and must include the name of the repository and the permanent identifier or accession number and persistent hyperlink(s) for the data set(s). The following format is required:

"The data set(s) supporting the results of this article is(are) available in the [repository name] repository, [unique persistent identifier and hyperlink to dataset(s) in http:// format]."

We also recommend that the data set(s) be cited, where appropriate in the manuscript, and included in the reference list.

A list of available scientific research data repositories can be found [here](#). A list of all BioMed Central journals that require or encourage this section to be included in research articles can be found [here](#).

List of abbreviations

If abbreviations are used in the text they should be defined in the text at first use, and a list of abbreviations can be provided, which should precede the competing interests and authors' contributions.

Competing interests

A competing interest exists when your interpretation of data or presentation of information may be influenced by your personal or financial relationship with other people or organizations. Authors must disclose any financial competing interests; they should also reveal any non-financial competing interests that may cause them embarrassment were they to become public after the publication of the manuscript.

Authors are required to complete a declaration of competing interests. All competing interests that are declared will be listed at the end of published articles. Where an author gives no competing interests, the listing will read 'The author(s) declare that they have no competing interests'.

When completing your declaration, please consider the following questions:

Financial competing interests

In the past five years have you received reimbursements, fees, funding, or salary from an organization that may in any way gain or lose financially from the publication of this manuscript, either now or in the future? Is such an organization financing this manuscript (including the article-processing charge)? If so, please specify.

Do you hold any stocks or shares in an organization that may in any way gain or lose financially from the publication of this manuscript, either now or in the future? If so, please specify.

Do you hold or are you currently applying for any patents relating to the content of the manuscript? Have you received reimbursements, fees, funding, or salary from an organization that holds or has applied for patents relating to the content of the manuscript? If so, please specify.

Do you have any other financial competing interests? If so, please specify.

Non-financial competing interests

Are there any non-financial competing interests (political, personal, religious, ideological, academic, intellectual, commercial or any other) to declare in relation to this manuscript? If so, please specify.

If you are unsure as to whether you, or one your co-authors, has a competing interest please discuss it with the editorial office.

Authors' contributions

In order to give appropriate credit to each author of a paper, the individual contributions of authors to the manuscript should be specified in this section.

An 'author' is generally considered to be someone who has made substantive intellectual contributions to a published study. To qualify as an author one should 1) have made substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data; 2) have been involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content; and 3) have given final approval of the version to be published. Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content. Acquisition of funding, collection of data, or general supervision of the research group, alone, does not justify authorship.

We suggest the following kind of format (please use initials to refer to each author's contribution): AB carried out the molecular genetic studies, participated in the sequence alignment and drafted the manuscript. JY carried out the immunoassays. MT participated in the sequence alignment. ES participated in the design of the study and performed the statistical analysis. FG conceived of the study, and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

All contributors who do not meet the criteria for authorship should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support.

Authors' information

You may choose to use this section to include any relevant information about the author(s) that may aid the reader's interpretation of the article, and understand the standpoint of the author(s). This may include details about the authors' qualifications, current positions they hold at institutions or societies, or any other relevant background information. Please refer to authors using their initials. Note this section should not be used to describe any competing interests.

Acknowledgements

Please acknowledge anyone who contributed towards the article by making substantial contributions to conception, design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data, or who was involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content, but who does not meet the criteria for authorship. Please also include the source(s) of funding for each author, and for the manuscript preparation. Authors must describe the role of the funding body, if any, in design, in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. Please also acknowledge anyone who contributed materials essential for the study. If a language editor has made significant revision of the manuscript, we recommend that you acknowledge the editor by name, where possible.

Authors should obtain permission to acknowledge from all those mentioned in the Acknowledgements section.

Endnotes

Endnotes should be designated within the text using a superscript lowercase letter and all notes (along with their corresponding letter) should be included in the Endnotes section. Please format this section in a paragraph rather than a list.

References

All references, including URLs, must be numbered consecutively, in square brackets, in the order in which they are cited in the text, followed by any in tables or legends. Each reference must have an individual reference number. Please avoid excessive referencing. If automatic numbering systems are used, the reference numbers must be finalized and the bibliography must be fully formatted before submission.

Only articles, datasets and abstracts that have been published or are in press, or are available through public e-print/preprint servers, may be cited; unpublished abstracts, unpublished data and personal communications should not be included in the reference list, but may be included in the text and referred to as "unpublished observations" or "personal communications" giving the names of the involved researchers. Obtaining permission to quote personal communications and unpublished data from the cited colleagues is the responsibility of the author. Footnotes are not allowed, but endnotes are permitted. Journal abbreviations follow Index Medicus/MEDLINE. Citations in the reference list should include all named authors, up to the first 30 before adding '*et al.*'.

Any *in press* articles cited within the references and necessary for the reviewers' assessment of the manuscript should be made available if requested by the editorial office.

Style files are available for use with popular bibliographic management software:

[BibTeX](#)

[EndNote style file](#)

[Reference Manager](#)

[Zotero](#)

Examples of the *Retrovirology* reference style are shown [below](#). Please ensure that the reference style is followed precisely; if the references are not in the correct style they may have to be retyped and carefully proofread.

All web links and URLs, including links to the authors' own websites, should be given a reference number and included in the reference list rather than within the text of the manuscript. They should be provided in full, including both the title of the site and the URL, in the following format: **The Mouse Tumor Biology Database** [<http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do>]. If an author or group of authors can clearly be associated with a web link, such as for weblogs, then they should be included in the reference.

Examples of the *Retrovirology* reference style*Article within a journal*

Koonin EV, Altschul SF, Bork P: **BRCA1 protein products: functional motifs.** *Nat Genet* 1996, **13**:266-267.

Article within a journal supplement

Orengo CA, Bray JE, Hubbard T, LoConte L, Sillitoe I: **Analysis and assessment of ab initio three-dimensional prediction, secondary structure, and contacts prediction.** *Proteins* 1999, **43**(Suppl 3):149-170.

In press article

Kharitonov SA, Barnes PJ: **Clinical aspects of exhaled nitric oxide.** *Eur Respir J*, in press.

Published abstract

Zvaifler NJ, Burger JA, Marinova-Mutafchieva L, Taylor P, Maini RN: **Mesenchymal cells, stromal derived factor-1 and rheumatoid arthritis [abstract].** *Arthritis Rheum* 1999, **42**:s250.

Article within conference proceedings

Jones X: **Zeolites and synthetic mechanisms.** In *Proceedings of the First National Conference on Porous Sieves: 27-30 June 1996; Baltimore*. Edited by Smith Y. Stoneham: Butterworth-Heinemann; 1996:16-27.

Book chapter, or article within a book

Schnepf E: **From prey via endosymbiont to plastids: comparative studies in dinoflagellates.** In *Origins of Plastids. Volume 2*. 2nd edition. Edited by Lewin RA. New York: Chapman and Hall; 1993:53-76.

Whole issue of journal

Ponder B, Johnston S, Chodosh L (Eds): **Innovative oncology.** In *Breast Cancer Res* 1998, **10**:1-72.

Whole conference proceedings

Smith Y (Ed): *Proceedings of the First National Conference on Porous Sieves: 27-30 June 1996; Baltimore*. Stoneham: Butterworth-Heinemann; 1996.

Complete book

Margulis L: *Origin of Eukaryotic Cells*. New Haven: Yale University Press; 1970.

Monograph or book in a series

Hunninghake GW, Gadek JE: **The alveolar macrophage**. In *Cultured Human Cells and Tissues*. Edited by Harris TJR. New York: Academic Press; 1995:54-56. [Stoner G (Series Editor): *Methods and Perspectives in Cell Biology*, vol 1.]

Book with institutional author

Advisory Committee on Genetic Modification: *Annual Report*. London; 1999.

PhD thesis

Kohavi R: **Wrappers for performance enhancement and oblivious decision graphs**. *PhD thesis*. Stanford University, Computer Science Department; 1995.

Link / URL

The Mouse Tumor Biology Database [<http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do>]

Link / URL with author(s)

Neylon C: Open Research Computation: an ordinary journal with extraordinary aims. [http://blogs.openaccesscentral.com/blogs/bmcblog/entry/open_research_computation_an_ordinary]

Dataset with persistent identifier

Zheng, L-Y; Guo, X-S; He, B; Sun, L-J; Peng, Y; Dong, S-S; Liu, T-F; Jiang, S; Ramachandran, S; Liu, C-M; Jing, H-C (2011): **Genome data from sweet and grain sorghum (*Sorghum bicolor*)**. *GigaScience*. <http://dx.doi.org/10.5524/100012>.

Preparing illustrations and figures

Illustrations should be provided as separate files, not embedded in the text file. Each figure should include a single illustration and should fit on a single page in portrait format. If a figure consists of separate parts, it is important that a single composite illustration file be submitted which contains all parts of the figure. There is no charge for the use of color figures.

Please read our [figure preparation guidelines](#) for detailed instructions on maximising the quality of your [figures](#).

Formats

The following file formats can be accepted:

- PDF (preferred format for diagrams)
- DOCX/DOC (single page only)
- PPTX/PPT (single slide only)
- EPS
- PNG (preferred format for photos or images)
- TIFF
- JPEG
- BMP

Figure legends

The legends should be included in the main manuscript text file at the end of the document, rather than being a part of the figure file. For each figure, the following information should be provided: Figure number (in sequence, using Arabic numerals - i.e. Figure 1, 2, 3 etc); short title of figure (maximum 15 words); detailed legend, up to 300 words.

Please note that it is the responsibility of the author(s) to obtain permission from the copyright holder to reproduce figures or tables that have previously been published elsewhere.

Preparing a personal cover page

If you wish to do so, you may submit an image which, in the event of publication, will be used to create a cover page for the PDF version of your article. The cover page will also display the journal logo, article title and citation details. The image may either be a figure from your manuscript or another relevant image. You must have permission from the copyright to reproduce the image. Images that do not meet our requirements will not be used.

Images must be 300dpi and 155mm square (1831 x 1831 pixels for a raster image).

Allowable formats - EPS, PDF (for line drawings), PNG, TIFF (for photographs and screen dumps), JPEG, BMP, DOC, PPT, CDX, TGF (ISIS/Draw).

Preparing tables

Each table should be numbered and cited in sequence using Arabic numerals (i.e. Table 1, 2, 3 etc.). Tables should also have a title (above the table) that summarizes the whole table; it should be no longer than 15 words. Detailed legends may then follow, but they should be concise. Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

Smaller tables considered to be integral to the manuscript can be pasted into the end of the document text file, in A4 portrait or landscape format. These will be typeset and displayed in the final published form of the article. Such tables should be formatted using the 'Table object' in a word processing program to ensure that columns of data are kept aligned when the file is sent electronically for review; this will not always be the case if columns are generated by simply using tabs to separate text. Columns and rows of data should be made visibly distinct by ensuring that the borders of each cell display as black lines. Commas should not be used to indicate numerical values. Color and shading may not be used; parts of the table can be highlighted using symbols or bold text, the meaning of which should be explained in a table legend. Tables should not be embedded as figures or spreadsheet files.

Larger datasets or tables too wide for a landscape page can be uploaded separately as additional files. Additional files will not be displayed in the final, laid-out PDF of the article, but a link will be provided to the files as supplied by the author.

Tabular data provided as additional files can be uploaded as an Excel spreadsheet (.xls) or comma separated values (.csv). As with all files, please use the standard file extensions.

Preparing additional files

Although *Retrovirology* does not restrict the length and quantity of data included in an article, we encourage authors to provide datasets, tables, movies, or other information as additional files.

Please note: All Additional files **will be published** along with the article. Do not include files such as patient consent forms, certificates of language editing, or revised versions of the main manuscript document with tracked changes. Such files should be sent by email to editorial@retrovirology.com, quoting the Manuscript ID number.

Results that would otherwise be indicated as "data not shown" can and should be included as additional files. Since many weblinks and URLs rapidly become broken, *Retrovirology* requires that supporting data are included as additional files, or deposited in a recognized repository. Please do not link to data on a personal/departmental website. The maximum file size for additional files is 20 MB each, and files will be virus-scanned on submission.

Additional files can be in any format, and will be downloadable from the final published article as supplied by the author. reuse. e.g. We recommend CSV rather than PDF for tabular data.

Certain supported files formats are recognized and can be displayed to the user in the browser. These include most movie formats (for users with the Quicktime plugin), mini-websites prepared according to our guidelines, chemical structure files (MOL, PDB), geographic data files (KML).

If additional material is provided, please list the following information in a separate section of the manuscript text:

File name (e.g. Additional file 1)

File format including the correct file extension for example .pdf, .xls, .txt, .pptx (including name and a URL of an appropriate viewer if format is unusual)

Title of data

Description of data

Additional files should be named "Additional file 1" and so on and should be referenced explicitly by file name within the body of the article, e.g. 'An additional movie file shows this in more detail [see Additional file 1]'.
 Additional file 1

Additional file formats

Ideally, file formats for additional files should not be platform-specific, and should be viewable using free or widely available tools. The following are examples of suitable formats.

Additional documentation

PDF (Adobe Acrobat)

Animations

SWF (Shockwave Flash)

Movies

MP4 (MPEG 4)

MOV (Quicktime)

Tabular data

XLS, XLSX (Excel Spreadsheet)

CSV (Comma separated values)

As with figure files, files should be given the standard file extensions.

Mini-websites

Small self-contained websites can be submitted as additional files, in such a way that they will be browsable from within the full text HTML version of the article. In order to do this, please follow these instructions:

Create a folder containing a starting file called index.html (or index.htm) in the root.

Put all files necessary for viewing the mini-website within the folder, or sub-folders.

Ensure that all links are relative (ie "images/picture.jpg" rather than "/images/picture.jpg" or "http://yourdomain.net/images/picture.jpg" or "C:\Documents and Settings\username\My Documents\mini-website\images\picture.jpg") and no link is longer than 255 characters.

Access the index.html file and browse around the mini-website, to ensure that the most commonly used browsers (Internet Explorer and Firefox) are able to view all parts of the mini-website without problems, it is ideal to check this on a different machine.

Compress the folder into a ZIP, check the file size is under 20 MB, ensure that index.html is in the root of the ZIP, and that the file has .zip extension, then submit as an additional file with your article.

Style and language

General

Currently, *Retrovirology* can only accept manuscripts written in English. Spelling should be US English or British English, but not a mixture.

There is no explicit limit on the length of articles submitted, but authors are encouraged to be concise.

Retrovirology will not edit submitted manuscripts for style or language; reviewers may advise rejection of a manuscript if it is compromised by grammatical errors. Authors are advised to write clearly and simply, and to have their article checked by colleagues before submission. In-house copyediting will be minimal. Non-native speakers of English may choose to make use of a copyediting service.

Help and advice on scientific writing

The abstract is one of the most important parts of a manuscript. For guidance, please visit our page on [Writing titles and abstracts for scientific articles](#).

Tim Albert has produced for BioMed Central a [list of tips](#) for writing a scientific manuscript. [American Scientist](#) also provides a list of resources for science writing. For more detailed guidance on preparing a manuscript and writing in English, please visit the [BioMed Central author academy](#).

Abbreviations

Abbreviations should be used as sparingly as possible. They should be defined when first used and a list of abbreviations can be provided following the main manuscript text.

Typography

Please use double line spacing.

Type the text unjustified, without hyphenating words at line breaks.

Use hard returns only to end headings and paragraphs, not to rearrange lines.

Capitalize only the first word, and proper nouns, in the title.

All pages should be numbered.

Use the *Retrovirology* [reference format](#).

Footnotes are not allowed, but endnotes are permitted.

Please do not format the text in multiple columns.

Greek and other special characters may be included. If you are unable to reproduce a particular special character, please type out the name of the symbol in full. **Please ensure that all special characters used are embedded in the text, otherwise they will be lost during conversion to PDF.**

Genes, mutations, genotypes, and alleles should be indicated in italics, and authors are required to use approved gene symbols, names, and formatting. Protein products should be in plain type.

Units

SI units should be used throughout (liter and molar are permitted, however).

ANEXO 5

Publicação científica no período de 2009-2012.

INFLUÊNCIA DO HTLV-I NA INCIDÊNCIA, RESPOSTA IMUNE E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DE OUTRAS DOENÇAS INFECCIOSAS

INFLUENCE OF HTLV-I IN THE INCIDENCE, IMMUNE RESPONSE AND CLINICAL MANIFESTATIONS OF OTHER INFECTIOUS DISEASES

Anselmo Souza¹, Aurélia Porto², Silvane B. Santos¹, Maria de Lourdes Bastos³, Edgar M. Carvalho¹

¹Serviço de Imunologia, Complexo Hospitalar Universitário Prof. Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA;

²Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, SE; ³Hospital Especializado Octávio Mangabeira, Salvador, BA; Brasil

O vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 1 (HTLV-I) é o agente causal da mielopatia associada ao HTLV-I (HAM/TSP) e da leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL) e é prevalente no Brasil, África, América Central e Japão. O vírus infecta células T e tem sido observado que a infecção pelo HTLV-I pode interferir na incidência, expressão de doença e resposta imune de outras doenças infecciosas, tais como estrangiloidíase, sarna norueguesa, tuberculose e esquistossomose. Neste trabalho, foi revisado o que há na literatura sobre a associação entre HTLV-I e outras doenças infecciosas, enfatizando a tuberculose, outras doenças bacterianas, helmintíases, infecções virais e sarna norueguesa. Além disso, foram adicionados dados ainda não publicados de pesquisa que vem sendo desenvolvida no Serviço de Imunologia do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos, UFBA.

Palavras chave: HTLV-I e estrangiloidíase, tuberculose e HTLV-I, escabiose e HTLV-I, esquistossomose e HTLV-I.

Human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) is causal agent of HTLV-I-associated myelopathy (HAM/TSP) and adult T cell leukemia/lymphoma (ATLL) and its prevalent in Brazil, Africa and Central America. The virus infects predominantly CD4⁺ T cells and it has been observed that HTLV-I infection may influence the incidence, clinical manifestations and immune response of other diseases like strongyloidiasis, scabies and schistosomiasis. Here we revised publications about association between HTLV-I and others infectious diseases, with emphasis in tuberculosis, helminthiasis, scabies and viral and bacterial infections. Moreover, we added data generated in the Immunology Service of the Complexo Hospitalar Universitário Prof. Edgard Santos.

Key words: HTLV-I and strongyloidiasis, tuberculosis in HTLV-I, scabies and HTLV-I, schistosomiasis and HTLV-I.

O vírus linfotrópico de células T humanas tipo I (HTLV-I) tem alta prevalência no Brasil, América Central e África, regiões com elevada incidência de doenças infecto-parasitárias, fazendo com que a associação entre o HTLV-I e doenças infecciosas sejam comuns nestas áreas^(7,18). O HTLV-I é o agente causal da mielopatia associada ao vírus ou paraparesia espástica tropical (HAM/TSP)⁽²⁸⁾ e da leucemia de células T do adulto (ATLL)⁽⁵⁷⁾. O vírus infecta, predominantemente, células T, induzindo ativação e proliferação celular com produção de concentrações elevadas de citocinas associadas com a resposta Th1, como Interleucina (IL)-2, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon-gama (IFN- γ)^(8,47). Essas alterações são observadas em portadores assintomáticos do vírus, mas são mais marcantes em pacientes com HAM/TSP⁽⁴⁷⁾. Como a resposta imune desempenha papel importante na patogênese das doenças infecciosas, é esperado que as

alterações imunológicas induzidas pelo HTLV-I possam interferir na incidência, resposta imune e manifestações clínicas das doenças infecciosas em pacientes coinfectados.

Estudos de corte transversal tem identificado que pacientes infectados pelo HTLV-I tem mais doenças parasitárias, doenças virais, doenças causadas por bactérias extra e intracelulares do que indivíduos soronegativos para este vírus^(23,33,42,43). Investigadores do Serviço de Imunologia do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos (SIM-HUPES) acompanham, há cerca de 10 anos, indivíduos infectados pelo HTLV-I e o papel da infecção pelo HTLV-I em modificar a resposta imune e manifestações de doenças infecciosas tem sido estudado. No presente trabalho foi feita uma revisão sobre a associação entre HTLV-I e outros agentes infecciosos assim como é mostrada a experiência deste grupo nestas coinfeções.

Material e Métodos

Foram revisados artigos que tem como foco a infecção pelo HTLV-I associada com outras doenças infecciosas como: Tuberculose, Estrangiloidíase, Esquistossomose, infecções virais, infecções bacterianas e sarna norueguesa. Os dados gerados no SIM-HUPES ainda não publicados foram obtidos através de estudo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Maternidade Climério de Oliveira aprovado em 20/06/2006.

Recebido em 29/06/2009

Aceito em 30/10/2009

Endereço para correspondência: Dr. Edgar M. Carvalho - Serviço de Imunologia, 5º andar, Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos, Rua João das Botas s/n, Canela, 40110-160, Salvador, BA, Brasil. Phone (55.71) 3237-7353, Fax: (55.71) 3245-7110. E-mail: edgar@ufba.br and imunolo@ufba.br.

Fonte de financiamento: Este trabalho teve o suporte do National Institute of Health projeto R01 AI079238A.



Review Article/Artigo de Revisão

Immunopathogenesis and neurological manifestations associated to HTLV-1 infection

Imunopatogênese e manifestações neurológicas associadas à infecção pelo HTLV-1

Anselmo Souza^{1,2,3}, Davi Tanajura^{1,2}, Cristina Toledo-Cornell^{1,3,4}, Silvane Santos^{1,2} and Edgar Marcelino de Carvalho¹

ABSTRACT

The human T lymphotropic virus type-1 (HTLV-1) was the first human retrovirus identified. The virus is transmitted through sexual intercourse, blood transfusion, sharing of contaminated needles or syringes and from mother to child, mainly through breastfeeding. In addition to the well-known association between HTLV-1 and HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP), several diseases and neurologic manifestations have been associated with the virus. This review was conducted through a PubMed search of the terms HTLV-1, immune response and neurological diseases. Emphasis was given to the most recent data regarding pathogenesis and clinical manifestations of HTLV-1 infection. The aim of the review is to analyze the immune response and the variety of neurological manifestations associated to HTLV-1 infection. A total of 102 articles were reviewed. The literature shows that a large percentage of HTLV-1 infected individuals have others neurological symptoms than HAM/TSP. Increased understanding of these numerous others clinical manifestations associated to the virus than adult T cell leukemia/lymphoma (ATLL) and HAM/TSP has challenged the view that HTLV-1 is a low morbidity infection.

Keywords: HTLV-1. Immune response. HAM/TSP. Neurologic disease.

RESUMO

O vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1) foi o primeiro retrovírus humano identificado. O vírus é transmitido via relação sexual, transfusão de sangue, compartilhamento de agulhas ou seringas contaminadas ou da mãe para o filho, principalmente através da amamentação. Além da conhecida associação entre o HTLV-1 e a mielopatia associada ao HTLV-1 (HAM/TSP), várias doenças e manifestações neurológicas tem sido associadas com o vírus. Esta revisão de literatura foi conduzida através de pesquisa ao banco de dados do PubMed, com os termos HTLV-1, resposta imune e doenças neurológicas. Foram enfatizados os dados mais recentes sobre a patogênese e às manifestações clínicas na infecção pelo HTLV-1. O objetivo dessa revisão é analisar a resposta imune e a variedade de manifestações neurológicas associadas com a infecção pelo HTLV-1. Um total de 102 artigos foi analisado. A literatura mostra que grande porcentagem de indivíduos infectados pelo HTLV-1 apresenta sintomas neurológicos mesmo na ausência de HAM/TSP. Uma maior compreensão das várias manifestações clínicas associadas ao vírus, além da leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL) e HAM/TSP, auxilia a estabelecer que, na realidade, a infecção pelo vírus possui uma morbidade maior do que se pensava.

Palavras-chaves: HTLV-1. Resposta imune. HAM/TSP. Doença neurológica.

INTRODUCTION

The human T lymphotropic virus type-1 (HTLV-1) was the first human retrovirus identified¹. The virus is transmitted through sexual intercourse, blood transfusion, sharing of contaminated needles or syringes and from mother to child, mainly through breastfeeding^{2,3}. The infection occurs predominantly in Africa, South America, the Caribbean and southeast Japan, with Brazil being significantly affected^{3,4}.

The pathogenesis of HTLV-1 infection is not completely understood, but both T cell activation and proviral load are determinants of disease outcome. The two major diseases associated to the virus infection are adult T cell leukemia/lymphoma (ATLL) and HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP)⁵. These clinical manifestations occur in less than 5% of HTLV-1 infected patients and have been considered a low morbidity infection. However, several studies showed that a large number of HTLV-1 infected individuals develop symptoms of inflammatory disease^{6,7}. Moreover, a large percentage of affected individuals have neurological symptoms other than HAM/TSP⁸.

In this review, the most recent data regarding pathogenesis and neurological manifestations of HTLV-1 infection were analyzed. Emphasis is given to immune response and the variety of neurological diseases associated with HTLV-1 infection.

For this review, we examined 398 articles from journals indexed in PubMed. The terms used for the research were: HTLV-1, immune response, HAM/TSP and neurological diseases associated with HTLV-1 infection. Of this total, 102 articles were selected.

STRUCTURE, GENOME AND PERSISTENCE OF THE HTLV-1

The HTLV-1 genome consists of a single-stranded ribonucleic acid (RNA). The two ends of the genome have long terminal repeats (LTRs) that help in the integration of proviral deoxyribonucleic acid (DNA) into chromosomal DNA. Structural and

1. Serviço de Imunologia, Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA. 2. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Doenças Tropicais, Salvador, BA. 3. Fogarty International Clinical Research Scholars and Fellows Program, Vanderbilt University, Nashville, Tennessee, USA. 4. Division of International Medicine and Infectious Diseases, Department of Medicine, Weill Medical College, Cornell University, New York, USA. 5. Escola Baiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, BA.

Address to: Edgar Marcelino de Carvalho. Serviço de Imunologia/Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos/UFBA. Rua João das Botas s/n, Canela 40110-160 Salvador, BA, Brasil.

Phone: 55 71 3237-7353; Fax: 55 71 3245-7110

e-mail: edgar@ufba.br

Received in 20/12/2011

Accepted in 14/09/2012

Immunological and Viral Features in Patients With Overactive Bladder Associated With Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 Infection

Silvane Braga Santos,^{1,2} Paulo Oliveira,¹ Tania Luna,¹ Anselmo Souza,^{1,2} Márcia Nascimento,¹ Isadora Siqueira,¹ Davi Tanajura,^{1,2} André Luiz Muniz,^{1,2} Marshall J. Glesby,³ and Edgar M. Carvalho^{1,2*}

¹Immunology Service, Professor Edgard Santos University Hospital, Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, Brazil

²National Institute of Science and Technology of Tropical Diseases (CNPq/MCT), Salvador, Bahia, Brazil

³Weill Cornell Medical College, New York, New York

The majority of patients infected with human T-cell lymphotropic virus-type 1 (HTLV-1) are considered carriers, but a high frequency of urinary symptoms of overactive bladder, common in HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) have been documented in these patients. The aim of this study was to determine if immunological and viral factors that are seen in HAM/TSP are also observed in these patients. Participants were classified as HTLV-1 carriers ($n = 45$), HTLV-1 patients suffering from overactive bladder ($n = 45$) and HAM/TSP ($n = 45$). Cells from HTLV-1 overactive bladder patients produced spontaneously more proinflammatory cytokines than carriers. TNF- α and IL-17 levels were similar in HAM/TSP and HTLV-1 overactive bladder patients. High proviral load was found in patients with overactive bladder and HAM/TSP and correlated with proinflammatory cytokines. In contrast with findings in patients with HAM/TSP, serum levels of Th1 chemokines were similar in HTLV-1 overactive bladder and carriers. Exogenous addition of regulatory cytokines decreased spontaneous IFN- γ production in cell cultures from HTLV-1 overactive bladder patients. The results show that HTLV-1 overactive bladder and HAM/TSP patients have in common some immunological features as well as similar proviral load profile. The data show that HTLV-1 overactive bladder patients are still able to down regulate their inflammatory immune response. In addition, these patients express levels of chemokines similar to carriers, which may explain why they have yet to develop the same degree of spinal cord damage as seen in patients with HAM/TSP. These patients present symptoms of

overactive bladder, which may be an early sign of HAM/TSP. **J. Med. Virol.** 84:1809–1817, 2012. © 2012 Wiley Periodicals, Inc.

KEY WORDS: HTLV-1; immune response; cytokines; chemokines; proviral load

INTRODUCTION

Human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) is a complex retrovirus belonging to the *Deltaretrovirus* family. It is associated etiologically with adult T cell leukemia/lymphoma (ATLL) and HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) [Uchiyama, 1997]. The HTLV-1 infection has been considered an infection with low morbidity. However, a cross-sectional study showed a higher frequency of neurological symptoms, erectile dysfunction, and urinary disturbances in HTLV-1 carriers than in uninfected healthy controls, suggesting that the spectrum of disease may be broader [Caskey et al., 2007].

Grant sponsor: National Institute of Health; Grant numbers: AI079238; K24 AI078884; Grant sponsor: Brazilian National Research Council (CNPq).

Conflicts of interest: None.

*Correspondence to: Edgar M. Carvalho, Serviço de Imunologia, Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Rua João das Botas s/n, Canela, 40110-160, BA, Brazil.
E-mail: imuno@ufba.br, edgar@ufba.br

Accepted 24 May 2012

DOI 10.1002/jmv.23341

Published online in Wiley Online Library
(wileyonlinelibrary.com).

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Influence of HTLV-1 on the clinical, microbiologic and immunologic presentation of tuberculosis

Maria de Lourdes Bastos^{1,2,3}, Silvane B Santos¹, Anselmo Souza¹, Brooke Finkmoore⁴, Ohana Bispo^{1,2}, Tasso Barreto^{1,2}, Ingrid Cardoso^{1,2}, Iana Bispo^{1,2}, Flávia Bastos^{1,2}, Daniele Pereira^{1,2}, Lee Riley⁴ and Edgar M Carvalho^{1,2,5,6*}

Abstract

Background: HTLV-1 is associated with increased susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis* infection and severity of tuberculosis. Although previous studies have shown that HTLV-1 infected individuals have a low frequency of positive tuberculin skin test (TST) and decreasing in lymphoproliferative responses compared to HTLV-1 uninfected persons, these studies were not performed in individuals with history of tuberculosis or evidence of *M. tuberculosis* infection. Therefore the reasons why HTLV-1 infection increases susceptibility to infection and severity of tuberculosis are not understood. The aim of this study was to evaluate how HTLV-1 may influence the clinical, bacteriologic and immunologic presentation of tuberculosis.

Methods: The study prospectively enrolled and followed 13 new cases of tuberculosis associated with HTLV-1 (cases) and 25 patients with tuberculosis without HTLV-1 infection (controls). Clinical findings, bacterial load in the sputum, x-rays, immunological response and death were compared in the two groups.

Results: There were no differences in the demographic, clinical and TST response between the two study groups. IFN- γ and TNF- α production was higher in unstimulated cultures of mononuclear cells of case than in control patients ($p < 0.01$). While there was no difference in IFN- γ production in PPD stimulated cultures, TNF- α levels were lower in cases than in controls ($p = 0.01$). There was no difference in the bacterial load among the groups but sputum smear microscopy results became negative faster in cases than in controls. Death only occurred in two co-infected patients.

Conclusion: While the increased susceptibility for tuberculosis infection in HTLV-1 infected subjects may be related to impairment in TNF- α production, the severity of tuberculosis in co-infected patients may be due to the enhancement of the Th1 inflammatory response, rather than in their decreased ability to control bacterial growth.

Keywords: HTLV-1, Tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*

Background

The human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) has a worldwide distribution; it is most prevalent in Central and South America, Central Africa and south-western Japan [1]. HTLV-1 infects predominantly CD4 T cells inducing cell activation and proliferation of both CD4 and CD8 T cells [2,3]. Moreover, the high production of pro-inflammatory cytokines (TNF- α and IFN- γ)

has been associated with central nervous system (CNS) damage and the development of HTLV-1 associated myelopathy (HAM) [2,3].

There is evidence that HTLV-1 infection increases severity and susceptibility to strongyloidiasis, scabies and tuberculosis [4-9]. In patients co-infected with HTLV-1 and *Strongyloides stercoralis* the exaggerated Th1 immune response and increased regulatory T cell response decrease the Th2 immune response, which plays a pivotal role in host defense against helminthes [9-12]. HTLV-1 infected individuals have two to four-fold increased chance to acquire tuberculosis [6,13-15]. Additionally, in one retrospective study, it was observed that

* Correspondence: edgar@ufba.br

¹Serviço de Imunologia do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brazil

²Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, BA, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article