



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA

MARIELE GUERRA LEMOS DA SILVA

**PAPEL DE QUIMIOCINAS E MOLÉCULAS DE ADESÃO NA
PATOGENESE DA INFECÇÃO PELO HTLV-1**

Salvador, BA

2016

MARIELE GUERRA LEMOS DA SILVA

**PAPEL DE QUIMIOCINAS E MOLÉCULAS DE ADESÃO NA
PATOGENESE DA INFECÇÃO PELO HTLV-1**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia, da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Imunologia.

Orientadora: Profa. Dra. Silvane Maria Braga Santos

Co-orientadora: Profa. Dra. Luciana Cardoso

Salvador, BA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Processamento Técnico, Biblioteca Universitária de Saúde,
Sistema de Bibliotecas da UFBA

S586 Silva, Mariele Guerra Lemos da.
Papel de quimiocinas e moléculas de adesão na patogênese da infecção pelo HTLV-1 / Mariele Guerra Lemos da Silva. - Salvador, 2016.
66 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Silvane Maria Braga Santos.

Coorientadora: profa. Dra. Luciana Santos Cardoso.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Imunologia, Salvador, 2016.

1. Vírus 1 Linfotrópico T Humano. 2. Infecções por HTLV-I. 3. Paraparesia espástica tropical. 4. Patogênese. 5. Quimiocinas. 6. Moléculas de adesão celular. I. Santos, Silvane Maria Braga. II. Cardoso, Luciana Santos. III. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Imunologia. IV. Título.

CDU: 578:577.27

COMISSÃO EXAMINADORA

Membros Titulares

- **Lucas Pedreira de Carvalho**

Professor Adjunto de Imunologia da Universidade Federal da Bahia e Pesquisador do CPqGM, FIOCRUZ

- **Rita Elizabeth Moreira Mascarenhas**

Graduação em Farmácia pela Universidade Federal da Bahia, Graduação em Análises Clínicas e Saúde Pública pela Universidade Federal da Bahia, mestrado em Imunologia pela Universidade Federal da Bahia e doutorado em Biologia Celular e Molecular pelo Instituto Oswaldo Cruz.

Membro Suplente

- **Maria Luiza Brito de Sousa Atta**

Graduação em Farmácia, Opção Análises Clínicas e Saúde Pública pela Universidade Federal da Bahia, mestrado e doutorado em Imunologia pela Universidade Federal da Bahia.

INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES

Instituições

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

- Complexo do Hospital Professor Edgar Santos (COM-HUPES).
 - Serviço de Imunologia
 - Ambulatório Magalhães Neto – Ambulatório Multidisciplinar de HTLV-1

EQUIPE

- Camila Farias Amorim – Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde pela Universidade Federal da Bahia.
- Maria de la Glória Orge – Farmacêutica do Ambulatório Multidisciplinar de HTLV-1
- Dr. Anselmo de Santana Souza - Doutor em Ciências da Saúde pela Universidade Federal da Bahia – Pós-doutorado no Serviço de Imunologia.
- Dra. Natália Barbosa Carvalho - Doutora em Imunologia pela Universidade Federal de Minas Gerais - Pós-doutorado no Serviço de Imunologia.

FONTE DE FINANCIAMENTO

- Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais (INCT-DT)
(INCT-DT – 573839/2008-5).
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ele ter abençoado o meu caminho me iluminando para que eu vencesse mais uma etapa da minha vida.

Aos meus pais, Milton e Gal, por todo o amor, carinho e compreensão me apoiando e incentivando para que eu seguisse sempre em frente.

À minha irmã Mércia, meu cunhado, Samuel, e meu sobrinho Noah, que mesmo distantes sei que sempre torceram e se preocuparam por mim.

À Michelle, minha irmã e meu cunhado Bruno pelo apoio sempre solicitado e a sua cumplicidade em todos os momentos.

A todos os familiares, de sangue e de coração, pelas palavras de apoio.

Ao Serviço de Imunologia, colegas e todos os funcionários pela oportunidade de estágio e aprendizado.

Ao Laboratório de HTLV-1 (Anselmo, Natália, Camila e Glória) por me ensinarem, por me acompanharem em toda técnica desenvolvida nesse trabalho e por tirarem as minhas dúvidas sempre com muita paciência e dedicação. Obrigada por serem excelentes companheiros de laboratório.

À Silvane e Luciana, minha orientadora e coorientadora, por ter me acompanhado desde o início e me orientado durante todo o desenvolvimento do projeto. Obrigada pela oportunidade

Ao Programa de Pós graduação em Imunologia, aos Mestres e colegas por todos os ensinamentos.

RESUMO

O vírus linfotrófico de células T humana tipo 1 (HTLV-1) é encontrado no mundo todo. A infecção pelo HTLV-1 é caracterizada por uma resposta imune exacerbada, com produção espontânea de IFN- γ e TNF. Estas citocinas são responsáveis por aumentar a expressão de quimiocinas e moléculas de adesão e facilitar a entrada de linfócitos ativados para o sistema nervoso central (SNC). O objetivo deste estudo foi avaliar o papel de quimiocinas e moléculas de adesão na patogênese da infecção pelo HTLV-1. Quimiocinas pró-inflamatórias (CXCL9 e CXCL10) e moléculas de adesão solúveis (sICAM-1 e sVCAM-1) foram determinadas por ELISA, no soro e líquido de diferentes grupos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 (portador assintomático, indivíduos com bexiga hiperativa e HAM/TSP). Frequência e mediana de intensidade de fluorescência (MIF) de linfócitos e de monócitos expressando ligantes das moléculas de adesão (CD11a e CD49d) e receptor de quimiocinas (CXCR3) foram analisadas por citometria de fluxo. CXCL9 e CXCL10 estavam mais elevados tanto no soro quanto no líquido dos pacientes com HAM/TSP ($p > 0,05$). As moléculas de adesão não diferiram entre os grupos, apesar da tendência de maior produção de sVCAM-1 na HAM/TSP. sVCAM-1 correlacionou-se positivamente com quimiocinas no soro dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 ($p > 0,05$). De modo geral, a MIF de células CD4⁺, CD8⁺ e CD14⁺ expressando CD11a e CXCR3 foi menor na HAM/TSP. Estes achados confirmam a participação das quimiocinas na migração das células infectadas pelo HTLV-1 para o SNC e sugerem, porém não são suficientes para atestar a participação das moléculas de adesão na patogênese da HAM/TSP.

Palavras-chave: HTLV-1, HAM/TSP, patogênese, quimiocinas, moléculas de adesão.

ABSTRACT

Human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) is found worldwide. HTLV-1 infection is characterized by an exaggerated immune response with spontaneous production of IFN- γ and TNF. These cytokines are responsible for increasing the expression of chemokines and adhesion molecules and facilitate the entry of activated lymphocytes into the CNS. The objective of this study was to evaluate the role of chemokines and adhesion molecules in the pathogenesis of HTLV-1. Pro inflammatory chemokines (CXCL9 and CXCL10) and soluble adhesion molecules (sICAM-1 and sVCAM-1) were determined by ELISA in the serum and cerebrospinal fluid (CSF) of different groups of HTLV-1 infected individuals (asymptomatic carrier, subjects with overactive bladder and HAM/TSP). Frequency and median fluorescence intensity (MIF) of lymphocytes and monocytes expressing ligands of adhesion molecules (CD11a and CD49d) and chemokine receptor (CXCR3) were analyzed by flow cytometry. CXCL9 and CXCL10 were higher in both serum and CSF of patients with HAM / TSP ($p > 0.05$). Adhesion molecules did not differ between the groups, despite the trend of increased production of sVCAM-1 in HAM/TSP. sVCAM-1 were positively correlated with chemokines in serum of HTLV-1 infected individuals ($p > 0.05$). Altogether, MIF of CD4⁺, CD8⁺ and CD14⁺ cells expressing CD11 and CXCR3 were smaller in the HAM / TSP. These findings confirm the involvement of chemokines in the migration of HTLV-1 infected cells to the CNS and suggest, but are not enough to prove the involvement of adhesion molecules in the pathogenesis of HAM / TSP.

Keywords: HTLV-1, HAM/TSP, pathogenesis, chemokines, adhesion molecules.

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Áreas endêmicas do HTLV-1	04
Figura 2. Prevalência de HTLV no Brasil	05
Figura 3. Estrutura do vírus	05
Figura 4. Organização genômica	06
Figura 5. Sequencia de eventos na migração de leucócitos para o local da infecção	14
Figura 6. Características das Moléculas de adesão celular	17
Figura 7. Estratégia de análise de dados de citometria de fluxo	22
Figura 8. Quimiocinas no soro e líquido de indivíduos infectados pelo HTLV-1	26
Figura 9. Moléculas de adesão solúveis no soro e líquido de indivíduos infectados pelo HTLV-1	28
Figura 10. Correlação entre moléculas de adesão solúveis no soro e líquido e quimiocinas séricas de indivíduos infectados pelo HTLV-1	29
Figura 11. Mediana de intensidade de fluorescência (MIF) das células CD4 ⁺ , CD8 ⁺ e CD14 ⁺ expressando CD11a e CD49d	31
Figura 12. Frequência e mediana de intensidade de fluorescência (MIF) de células CD4 ⁺ , CD8 ⁺ e CD14 ⁺ expressando CXCR3	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características demográficas, carga proviral e citocinas pró-inflamatórias dos diferentes grupos de indivíduos infectados pelo HTLV-1	25
Tabela 2. Frequência de células T (CD4 ⁺ e CD8 ⁺) e monócitos (CD14 ⁺) em CMSP de indivíduos infectados pelo HTLV-1	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATL - Leucemia das Células T do Adulto

BHE - Barreira hematoencefálica

BH-HTLV- Indivíduo infectado pelo HTLV-1 com manifestação de bexiga hiperativa, (provável HAM/TSP).

CD14⁺ - Monócitos

CD4⁺ - Linfócito T CD4⁺ / Linfócito T auxiliar

CD8⁺ (LTC) - Linfócito T CD8⁺ / Linfócito citotóxico

CMSP - Células mononucleares do sangue periférico

CXCL10/ IP-10 - Proteína induzida por interferon gama

CXCL9/ MIG - Monocina induzida por interferon gama

CXCR3 - Receptor de quimiocina do tipo 3

DNA - Ácido desoxirribonucleico

GM-CSF - Fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos

HAM/TSP - Mielopatia Associada ao HTLV/ Paraparesia Espástica Tropical

HIV - Vírus da imunodeficiência humana

HTLV-1 - Vírus linfotrópico de células T humana tipo 1

HTLV-2 - Vírus linfotrópico de células T humana tipo 2

ICAM-1 (CD54) - Molécula 1 de Adesão Intercelular

IFN- γ - Interferon gama

IL-1 α - Interleucina 1alpha

IL-10 - Interleucina 10

IL-13 - Interleucina 13

IL-15 - Interleucina 15

IL-2 - Interleucina 2

IL-2R - Receptor de Interleucina 2

IL-4 - Interleucina 4

IL-5 - Interleucina 5

IL-6 - Interleucina 6

LFA-1 (CD11a/CD18) - Antígeno 1 associado à função de linfócitos

MIF - Mediana de intensidade de fluorescência

ng/mL - Nanograma por mililitro

NK - Células natural killer

OMS - Organização Mundial de Saúde

PCR - Reação da polimerase em cadeia

pg/mL - Picogramas por mililitro

RNA - Ácido ribonucléico

RNAm - RNA mensageiro

Rpm - Rotação por minuto

SNC - Sistema Nervoso Central

Th1- Linfócitos T auxiliar tipo 1

Th2 - Linfócitos T auxiliar tipo 2

TNF - Fator de necrose tumoral

VCAM-1 (CD106) - Proteína de adesão celular vascular 1

VLA-4 (CD49d/CD29) - Antígeno muito tardio tipo 4

VR - Valor de referência

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	01
2	REFERENCIAL TEÓRICO	03
2.1	Aspectos gerais e epidemiologia do HTLV-1	03
2.2	O vírus	05
2.3	Doenças associadas ao HTLV-1	06
	<i>Leucemia das Células T do Adulto (ATL)</i>	06
	<i>Mielopatia Associada ao HTLV/ Paraparesia Espástica Tropical (HAM/TSP)</i>	07
	<i>Outras Manifestações Clínicas Associadas ao HTLV-1</i>	07
	<i>Bexiga Hiperativa Associada ao HTLV-1</i>	08
2.4	Aspectos imunológicos	09
	<i>Resposta Imune na Infecção pelo HTLV-1</i>	09
	<i>Fatores Envolvidos na Patogênese da HAM/TSP</i>	11
	<i>Comprometimento da barreira hematoencefálica na HAM/TSP</i>	12
2.5	Quimiocinas	13
2.6	Moléculas de adesão	15
3	OBJETIVOS	19
3.1	Gerais	19
3.2	Específicos	19
4	METODOLOGIA	20
4.1	Desenho do estudo, local e população estudada	20
4.2	Preparação das amostras e avaliação da resposta imune	21
	<i>Obtenção das amostras</i>	21
	<i>Separação das células mononucleadas do sangue periférico</i>	21
	<i>Quantificação de moléculas de adesão solúveis</i>	21
	<i>Determinação da concentração de quimiocinas</i>	21
	<i>Concentração fenotípica dos linfócitos por citometria de fluxo</i>	22
4.3	Análise estatística	23
4.4	Cálculo amostral	23

5	RESULTADOS	24
5.1	Características gerais dos pacientes	24
5.2	Quimiocinas pró-inflamatórias (CXCL9 e CXCL10) no soro e líquido de indivíduos infectados pelo HTLV-1	25
5.3	Moléculas de adesão solúvel (sICAM-1 e sVCAM-1) no soro e líquido de indivíduos infectados pelo HTLV-1	27
5.4	Correlação entre moléculas de adesão e quimiocinas pró-inflamatórias no soro e líquido de indivíduos infectados pelo HTLV-1	28
5.5	Frequências de células T CD4 ⁺ , CD8 ⁺ e monócitos CD14 ⁺ nos diferentes grupos de indivíduos infectados pelo HTLV-1	29
5.6	Mediana de intensidade de fluorescência (MIF) de células T CD4 ⁺ , CD8 ⁺ e monócitos CD14 ⁺ , expressando ligantes das moléculas de adesão (CD11a e CD49d)	30
5.7	Frequência e mediana de intensidade de fluorescência (MIF) de células T CD4 ⁺ , CD8 ⁺ e monócitos CD14 ⁺ , expressando o receptor de quimiocinas (CXCR3)	31
6	DISCUSSÃO	33
7	SUMÁRIO DOS RESULTADOS	38
8	CONCLUSÃO GERAL	39
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
10	ANEXOS	48
	Anexo I: Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Bahia - Plataforma Brasil	48
	Anexo II: Termo de consentimento livre e esclarecido	49

1. INTRODUÇÃO

Aproximadamente 10-20 milhões de indivíduos estão infectados pelo vírus linfotrópico de células T humana tipo 1 (HTLV-1) em todo o mundo (**GESSAIN & CASSAR, 2012**). A cidade de Salvador, na Bahia apresenta a maior soro prevalência (1,35%) entre doadores de sangue e dados estimam que aproximadamente 40 mil soteropolitanos estejam infectados por este vírus (**GALVÃO-CASTRO et. al. 1997; DOURADO et. al, 2003**).

Grande parte dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 são portadores assintomáticos. Diversos são os fatores (genética, carga proviral e resposta imune) que fazem com que estes indivíduos desenvolvam uma leucemia das células T do adulto (ATL) ou a mielopatia associada ao HTLV/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP) (**EDLICH et. al, 2000; ARAÚJO & SILVA, 2006**). Tem sido documentado que uma proporção considerável dos portadores assintomáticos do HTLV-1 desenvolve manifestações urinárias de bexiga hiperativa (**CASTRO et. al, 2007; CASKEY et. al, 2007 OLIVEIRA et. al, 2010**). A presença da bexiga hiperativa pode ser um estágio precoce da mielopatia de forma que estes indivíduos são classificados como prováveis HAM/TSP, segundo critérios estabelecidos por De Castro-Costa (2007) (**De CASTRO-COSTA et. al, 2007**).

O HTLV-1 infecta predominantemente células T CD4⁺ e CD8⁺, embora outras células também sejam infectadas (**MARTINS & BRITO-MELO, 2006**). Em resposta a infecção viral as células proliferam-se espontaneamente sendo capazes de produzir, em grandes quantidades, citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , TNF, IL-1 α e IL-6 (**KRAMER et. al, 1989; SANTOS et. al, 2004**). Células mononucleares do sangue periférico (CMSP) dos pacientes com HAM/TSP, quando comparados com portadores assintomáticos, apresentam uma maior produção espontânea de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e TNF (**SANTOS et. al., 2004**).

Na HAM/TSP, as citocinas pró-inflamatórias são encontradas no soro e líquido e são secretadas por células infectadas que conseguem ultrapassar a barreira hematoencefálica (BHE) e migrar para o sistema nervoso central (SNC). Uma vez que essas células ultrapassem esta barreira, começam a produzir moléculas pró-inflamatórias suficientes para desestabilizar os componentes da BHE e facilitar a migração de mais células infectadas para o SNC, contribuindo assim para inflamação tecidual (**OSAME et. al, 2002; NAGAI et. al, 2003; AFONSO et. al, 2008**). Induzidas por citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas como CXCL9 e CXCL10, cuja função é atrair células infectadas para os locais da inflamação, participam dos processos responsáveis pelo comprometimento da integridade da BHE (**ESCHE et. al, 2005**;

MONTANHEIRO et. al, 2007). Estudos tem demonstrado uma produção elevadas dessas quimiocinas, tanto no soro quanto no líquido de indivíduos infectados pelo HTLV-1, principalmente HAM/TSP (**GUERREIRO et. al, 2006; SANTOS et. al, 2012; ANDO et. al, 2013; SATO et. al, 2013**).

As citocinas pró-inflamatórias também são responsáveis por aumentar a expressão de moléculas de adesão celular, facilitando a adesão das células endoteliais com as células sanguíneas e permitindo a entrada das células infectadas pelo vírus para o SNC (**ADAMS & SHAW, 1994**). As principais moléculas de adesão são as integrinas LFA-1 (antígeno associado à função leucocitária-1 ou CD11a/CD18) e a VLA-4 (antígeno de ativação muito tardia ou CD49d/CD29). Estas moléculas, presentes na superfície de células sanguíneas (**SHIMIZU et. al 1992**), se ligam respectivamente a moléculas de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e as moléculas de adesão vascular-1 (VCAM-1), pertencentes a superfamília das imunoglobulinas (**WITKOWSKA & BORAWSKA, 2004**).

Considerando que as quimiocinas e as moléculas de adesão celular têm um importante papel na migração das células T ativadas do sangue periférico para o SNC e conseqüentemente no estabelecimento do processo inflamatório, o objetivo deste estudo foi avaliar o papel destas moléculas na patogênese da infecção pelo HTLV-1, analisando a produção e a expressão destas moléculas nas diferentes apresentações clínicas da infecção pelo HTLV-1 (portador assintomático, indivíduo com bexiga hiperativa associada ao HTLV e pacientes com HAM/TSP).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ASPECTOS GERAIS E EPIDEMIOLOGIA DO HTLV-1

O vírus linfotrófico de células T humana tipo 1 (HTLV-1) foi o primeiro retrovírus humano descrito, inicialmente associado com uma leucemia de células T, em adultos (UCHIYAMA *et. al*, 1977), posteriormente isolado de um paciente com linfoma cutâneo de células T (POIESZ *et. al*, 1980) e somente depois associado à doenças neurológicas (GESSAIN *et. al*, 1985; OSAME *et. al*, 1986). Estudos epidemiológicos sugerem que o HTLV-1 tenha surgido na África, por meio da transmissão entre espécies, a partir de primatas não humanos, sendo levado para todo o mundo no século XVI, com o tráfico negreiro. Outra hipótese também aceita é a de que o vírus tenha sido espalhado inicialmente para Ásia e Europa e depois para as Américas pelo Estreito de Bering e mais recentemente pela migração japonesa no século XX (SANTOS & MENDONÇA LIMA, 2005, PAIVA & CASSEB, 2015).

Os principais subtipos do HTLV-1 são: tipo I - Cosmopolita, com distribuição mundial, apresentando cinco subgrupos relacionados com a distribuição geográfica (Transcontinental, Japonês, Norte Africano, Oeste Africano e Peruano), tipo II - África Central, tipo III - Malásia, com cepas distribuídas em Papua Nova Guiné e Austrália, tipo IV - isolado a partir de pigmeus de Camarões e de um indivíduo infectado no Gabão, tipo V - isolado do Gongo, tipo VI - proveniente de um indivíduo do Gabão e o tipo VII - descrito como um novo subtipo na África Central (VICENTE *et. al*, 2006). Estudos realizados no Brasil demonstram que o HTLV-1 pertence principalmente ao tipo Cosmopolita, sub-grupo transcontinental (KASHIMA *et. al*, 2006). O HTLV-2 foi descrito em 1982 e somente em 2005 dois novos tipos de HTLV (HTLV-3 e HTLV-4) foram descritos (KOON & PROIETTI, 2006).

A transmissão do HTLV-1 ocorre principalmente por três vias: a) horizontal (contato sexual) onde ocorre troca de fluidos corporais, sendo mais frequentemente transmitida do homem para mulher; b) vertical ou perinatal (da mãe para o filho), predominantemente através da amamentação, podendo ocorrer também durante o parto; c) parenteral, por meio de contato com seringas contendo sangue contaminado e por transfusão sanguínea (SANTOS e MENDONÇA LIMA, 2005; EDLICH *et. al*, 2000).

O diagnóstico da infecção pelo HTLV-1 é feito inicialmente com testes sorológicos que detectam anticorpos contra o vírus utilizando o método de ELISA. A confirmação é feita pelo teste de *Western blot*, capaz de discriminar se a infecção se dá pelo HTLV-1 ou HTLV-2. Em alguns casos esses testes não são suficientes para o diagnóstico, sendo então necessário recorrer

a testes moleculares, onde a técnica da reação da polimerase em cadeia (PCR), capaz de detectar o material genético proviral, é utilizada (CARNEIRO-PROIETTI *et. al*, 2002).

Estima-se que 10 a 20 milhões de pessoas no mundo são portadoras do HTLV-1 (GESSAIN & CASSAR, 2012). A infecção pelo HTLV-1 é endêmica do Japão, Caribe, região central da África, Oceania e Oriente Médio. A América do Sul também é considerada uma área endêmica, ocorrendo na Colômbia, Equador, Peru, Bolívia, Argentina, Chile e Brasil (Figura 1).



Figura 1. Áreas endêmicas do HTLV-1 (GESSAIN & CASSAR, 2012)

No Brasil, o HTLV-1 foi primeiramente descrito em 1986, em uma comunidade japonesa residente em Campo Grande (MS) (SANTOS & MENDONÇA LIMA, 2005). É possível que o vírus tenha chegado ao Brasil juntamente com o tráfico negreiro e com a vinda de imigrantes japoneses (CATALAN-SOARES & PROIETTI, 2006). O vírus está presente em quase todos os estados brasileiros e estimativa aponta que 2,5 milhões de pessoas estão infectadas, tornando o Brasil, um dos países com maior número de casos (CARNEIRO-PROIETTI *et. al*, 2002). Estudo de soroprevalência realizado em doadores de sangue em diversas capitais brasileiras mostrou uma maior prevalência do HTLV-1 nas regiões Norte (Belém) e Nordeste (São Luís, Salvador e Recife) (CATALAN-SOARES & PROIETTI, 2006) (Figura 2). Um estudo multicêntrico e de base populacional registrou, em Salvador, uma das maiores prevalências do HTLV-1, com aproximadamente 1,8% da população geral infectada (DOURADO *et. al*, 2003). A soropositividade para o HTLV-1 é observada principalmente na idade adulta, onde homens e mulheres se infectam pela via sexual e por meio de transfusões sanguíneas (CARNEIRO-PROIETTI *et. al*, 2002).

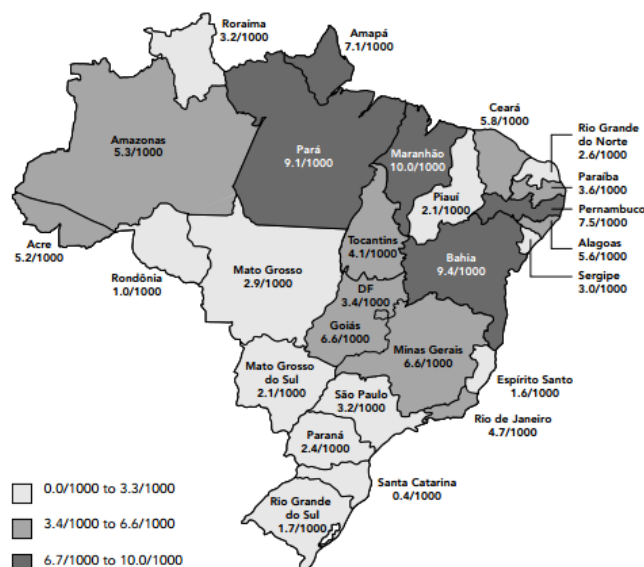


Figura 2. Prevalência de HTLV no Brasil (CATALAN SOARES, *et. al*, 2005).

2.2 O VÍRUS

O HTLV-1 é um retrovírus encapsulado pertencente à família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae* e ao gênero do *Deltaretrovírus* (SAITO, 2010; RAMANAN *et. al*, 2014). É constituído de um nucleocapsídeo e um nucleoide e possui morfologia esférica medindo de 80 a 100 nm de diâmetro (Figura 3) (KROON & PROIETTI, 2006). Seu genoma é composto por RNA de fita simples, possuindo os genes *gag*, *pol* e *env*, além de uma região pX que contém os genes reguladores *tax* e *rex* (Figura 4). O *rex* estabiliza o RNA mensageiro (RNAm) e regula o seu *splicing* e transporte. O *tax* é importante para a transcrição viral e o principal alvo da resposta imune pelos linfócitos T citotóxicos (GOON *et. al*, 2002).

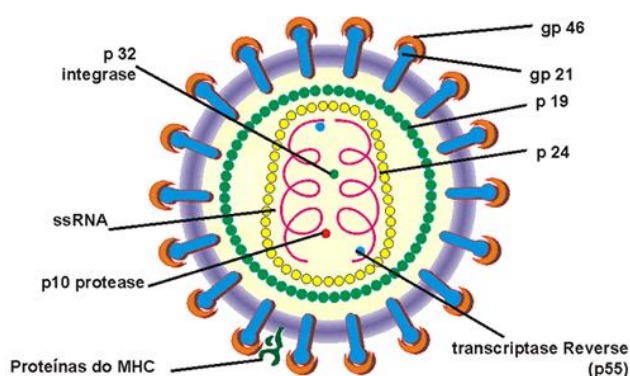


Figura 3. Estrutura do vírus (Adaptado de www.htlv.com.br)

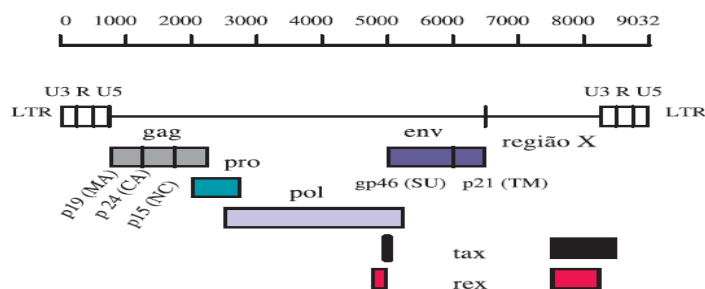


Figura 4. Organização genômica (KROON & PROIETTI, 2006)

O ciclo de multiplicação do HTLV-1 ocorre inicialmente com a ligação do vírus a célula do hospedeiro, por meio de receptores. Em seguida o vírus é capaz de penetrar na célula liberando todo o material genético no citoplasma. A fita simples de RNA viral é transcrita para uma fita dupla de DNA, por meio da enzima transcriptase reversa, que migra para o núcleo e integra-se ao DNA do hospedeiro. Uma vez unido, na forma de provírus, utiliza a maquinaria do hospedeiro para o desenvolvimento de novos vírus (SANTOS & MENDONÇA LIMA, 2005).

2.3 DOENÇAS ASSOCIADAS AO HTLV-1

A maioria dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 permanece assintomática por toda a vida, enquanto que aproximadamente 5% dos infectados desenvolve doença (EDLICH *et. al*, 2000). Estudos tem demonstrado que fatores genéticos e imunológicos do hospedeiro são responsáveis pelo aparecimento de duas doenças claramente associadas com soropositividade para o HTLV-1: a Leucemia das Células T do Adulto (ATL) e a Mielopatia Associada ao HTLV/ Paraparesia Espástica Tropical (HAM/TSP).

Leucemia das Células T do Adulto (ATL)

A ATL é caracterizada por uma linfoproliferação maligna, devido ao crescimento clonal de células T CD4⁺ infectadas. Os pacientes apresentam hipercalcemia, infiltração grave de células leucêmicas em vários órgãos e uma curta sobrevivência. A ATL ocorre predominantemente em adultos, com igual frequência entre homens e mulheres (ARAÚJO & SILVA, 2006; CARNEIRO-PROIETTI *et. al*, 2006) onde a idade média para o início da doença é de 55 anos, após um longo período de latência (UCHIYAMA, 1997). Clinicamente a ATL é dividida nas formas: aguda, crônica, linfomatosa e indolente (*smoldering*). Os mecanismos patogênicos ainda não são bem esclarecidos, mas estudos indicam que a proteína

viral TAX desempenha um papel importante na patogênese da ATL (**CARNEIRO-PROIETTI et. al, 2006**).

Mielopatia Associada ao HTLV/ Paraparesia Espástica Tropical (HAM/TSP)

A HAM/TSP é uma doença inflamatória crônica de início lento e insidioso, caracterizada por incapacidade neurológica (paraparesia espástica). Por volta de 1985 dois grupos de pesquisa encontraram, de forma independente, anticorpos para HTLV-1 no soro de pacientes com comprometimento neurológico. O primeiro grupo, na Martinica, demonstrou a presença de anticorpos anti-HTLV-1 no soro de 65% dos pacientes com diagnóstico de Paraparesia Espástica Tropical (TSP); achado confirmado posteriormente em pacientes na Jamaica e Colômbia (**GESSAIN et. al; 1985; RODGERS JOHNSON, 1985**). O segundo grupo, em Kagoshima, no Japão, observou que etiologia similar estava envolvida em uma mielopatia espástica crônica, denominando-a de Mielopatia Associada ao HTLV-1 (HAM), considerando inadequado o termo tropical, uma vez que o Japão se encontra na zona temperada (**OSAME et. al, 1986**). Por meio de estudos comparativos foi demonstrado que estas duas entidades se tratavam de uma mesma doença e em 1989 a OMS recomendou a utilização do termo HAM/TSP, utilizado até hoje (**OSAME, 1990**).

No Brasil, somente em 1989, foram feitos relatos de casos suspeitos de TSP em Fortaleza, entretanto não foi realizada a pesquisa para anticorpos anti-HTLV-1(**CASTRO-COSTA et. al., 1989**). No mesmo ano, em São Paulo, foram detectados anticorpos anti-HTLV-1 no soro de pacientes com mielopatia crônica de origem desconhecida (**MARTINS-CASTRO et. al., 1989**).

A HAM/TSP acomete principalmente indivíduos adultos, acima de 40 anos, ocorrendo mais frequentemente em mulheres do que em homens (**ARAÚJO & SILVA, 2006; CARNEIRO-PROIETTI et. al, 2006**). Cerca de 60% dos pacientes com HAM/TSP apresentam fraqueza muscular nos membros inferiores, e em alguns casos nos membros superiores também. Posteriormente estes pacientes progridem para uma espasticidade muscular anormal. Outros sintomas podem ser também observados nos pacientes com HAM/TSP como: prisão de ventre, dor nas costas, síndrome de Sjogren, distúrbios sensoriais, disfunção erétil e sintomas urinários (**ARAÚJO & SILVA, 2006**).

Outras Manifestações Clínicas Associadas ao HTLV-1

O espectro de doenças causadas pelo HTLV-1 ainda permanece desconhecido. Além da ATL e da HAM/TSP, outras condições inflamatórias também têm sido associadas como, por

exemplo, artrite, polimiosite, alveolite linfocítica, uveíte e síndrome de Sjogren (**EDLICH et. al, 2000**). O HTLV-1 também tem sido associado a várias condições infecciosas como, por exemplo, dermatite infectiva em crianças (**La GRENADÉ et. al, 1990; OLIVEIRA et. al, 2005**) e risco aumentado de *estrongiloidíase* disseminada em indivíduos co-infectados (**PORTO et. al., 2002**). Tuberculose, sarna norueguesa, hanseníase, hepatites, HIV e sífilis também têm sido associadas à infecção pelo HTLV-1 (**VERDNOCK et. al, 2007; BRITES et. al, 2002; BRITES et. al, 2009; MACHADO et. al, 2012**). Como a maioria desses estudos foi realizada com uma casuísta pequena, continuam sendo necessários estudos para comprovar a participação do HTLV-1 na etiologia dessas doenças.

Bexiga Hiperativa Associada ao HTLV-1

Apesar da estimativa de que menos de 5% dos indivíduos infectados desenvolve doenças associadas ao HTLV-1, enquanto a maioria permanece assintomática, estudos recentes têm demonstrando uma prevalência elevada de complicações que podem estar associadas à infecção pelo HTLV-1. Disfunção erétil, sinais e sintomas neurológicos, gengivite, periodontite e sintomas urinários de bexiga hiperativa são algumas das manifestações clínicas observadas em indivíduos infectados pelo HTLV-1, considerados como portadores assintomáticos por não preencherem os critérios da OMS para HAM/TSP (**CASTRO et. al, 2007; CASKEY et. al, 2007; POETKER et. al, 2011; OLIVEIRA et. al, 2010; TANAJURA et. al, 2015**).

Enquanto os sintomas urinários de bexiga hiperativa são documentados em 100% dos pacientes com HAM/TSP, 25-30% dos portadores assintomáticos apresentam queixas urinárias (**CASTRO et. al, 2007**). As queixas urinárias (noctúria, urgência e incontinência) podem representar os primeiros sintomas da mielopatia, sendo documentados anos antes do desenvolvimento da HAM/TSP (**ARAUJO et. al, 1998; CASTRO et. al, 2007; OLIVEIRA et. al, 2007**). Estudos urodinâmicos e imunológicos sugerem que estes sintomas urinários podem representar uma manifestação precoce da HAM/TSP (**CASTRO et. al, 2007; SANTOS et. al, 2012**). Indivíduos infectados pelo HTLV-1, sem HAM/TSP e com bexiga hiperativa, apresentaram alterações imunológicas (produção espontânea de IFN- γ e TNF) e alta carga proviral, semelhantes às observadas nos pacientes com HAM/TSP, sugerindo que estes indivíduos poderiam estar em um estágio inicial da HAM/TSP (**SANTOS et. al, 2012**). Os indivíduos com bexiga hiperativa associada à infecção pelo HTLV-1, que não preenchem os critérios da OMS para serem considerados como pacientes com HAM/TSP, passaram então a ser denominados como prováveis HAM/TSP, de acordo com novos critérios diagnósticos propostos por **DE CASTRO-COSTA et. al (2006)**.

2.4 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS

A infecção pelo HTLV-1 não necessariamente implica no desencadeamento de processos patogênicos em seus portadores. Diferentes fatores estão envolvidos na interação vírus/hospedeiro. O modo como essas interações ocorrem irá determinar o estado do portador como indivíduo assintomático ou paciente (MARTINS & STANCIOLI, 2006).

Durante uma infecção viral, o organismo fica exposto a vários antígenos derivados do vírus, respondendo a estímulos por meio de interações entre elementos celulares e moleculares. A resposta imune inata é a primeira a atuar através do sistema Complemento e da ação de fagócitos, monócitos e células *natural killer* - NK. A resposta imune adaptativa aparece tardiamente e apresenta elementos fundamentais à ativação de linfócitos B, produzindo anticorpos, e à ativação de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺). Os linfócitos B após interagirem com as estruturas do vírus são capazes de secretar anticorpos que podem eliminar o antígeno por neutralização. As células apresentadoras de antígeno (APC), monócitos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos B, endocitam e processam as partículas virais em sequências menores de aminoácidos que se ligam ao complexo principal de histocompatibilidade (*major histocompatibility complex*, MHC) para serem apresentados aos linfócitos T. As células T CD4⁺ têm como principal função a produção de citocinas, que desencadeiam e amplificam a resposta imunológica, incluindo a resposta citotóxica, a produção de anticorpos e os processos fagocíticos; e as células T CD8⁺, através da síntese de citocinas e da indução de seus mecanismos efetores, têm a função de lisar células infectadas.

Após a ativação celular, diversas moléculas são expressas na superfície das células. Os mecanismos de ativação e também os de recrutamento são importantes para guiar as células ativadas até o foco inflamatório. Essa migração envolve várias etapas de interação entre os leucócitos e as células do endotélio, incluindo: liberação de fatores quimiotáticos, adesão celular, rolamento e diapedese (MARTINS & BRITO-MELO, 2006).

Resposta Imune na Infecção pelo HTLV-1

O HTLV-1 infecta predominantemente os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, embora outros tipos celulares (macrófagos, linfócitos B e células dendríticas), tanto *in vitro* quanto *in vivo*, também possam ser alvos do HTLV-1 (MARTINS & BRITO-MELO, 2006). Uma vez infectadas pelo HTLV-1 ocorre expansão clonal preferencial dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, estimulados pela ação transativadora de Tax. A proteína viral Tax atua ativando e regulando a expressão de vários genes celulares, além de interagir com fatores de transcrição impedindo que a célula

entre em apoptose. Observa-se assim, a expressão constitutiva do receptor da Interleucina (IL)-2R e a produção de citocinas como IL-1 α , IL-2, IL-15, GM-CSF, capazes de induzir ativação e proliferação celular persistente (YOSHIDA *et. al*, 2001). Em resposta a infecção pelo HTLV-1, os linfócitos T infectados tornam-se capazes de proliferar espontaneamente, independente de presença estímulos (KRAMER *et. al*, 1989), gerando uma intensa produção espontânea de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , TNF e IL-6. Citocinas do perfil Th1, em especial o IFN- γ , são essenciais para a função citotóxica e modulam negativamente a resposta Th2, como observado nos pacientes com doenças alérgicas e parasitárias (SOUZA-MACHADO, 2003). A eficiência da resposta celular do hospedeiro à Tax é reconhecida como um fator importante para o desenvolvimento das doenças associadas ao HTLV-1, principalmente a HAM/TSP. Células T CD4⁺ de pacientes com HAM/TSP produzem grandes quantidades de IFN- γ , TNF, GM-CSF e IL-1 α (NISCHIURA *et. al*, 1996; GOON *et. al*, 2002, GOON *et. al*, 2003). A análise do perfil de citocinas produzidas pelas células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de portadores assintomáticos do HTLV-1 demonstrou uma alta produção espontânea de IFN- γ , TNF, IL-5 e IL-10, quando comparada à produção espontânea de células de indivíduos de sorologia negativa para HTLV-1, sugerindo que células de indivíduos infectados pelo HTLV-1 apresentam um perfil de citocinas tanto Th1 quanto Th2 (CARVALHO *et. al*, 2001). Estudos adicionais confirmaram a maior linfoproliferação e produção espontânea de IFN- γ pelas células dos pacientes com mielopatia quando comparado aos portadores assintomáticos e chamaram a atenção para a variabilidade de produção de IFN- γ entre os portadores, com aproximadamente 40% apresentando um padrão similar ao observado nos pacientes com HAM/TSP (SANTOS *et. al*, 2004). Em resposta à infecção pelo HTLV-1, os linfócitos T citotóxicos CD8⁺ (LTC), auxiliados pelas células T CD4⁺ produtoras de citocinas tipo 1, desempenham um papel fundamental no reconhecimento e lise das células infectadas. Estudos apontam tanto para o papel protetor quanto para a participação dos LTCs na patogênese da HAM/TSP. Assim, uma resposta eficiente dos LTCs suprimiria a frequência de células expressando Tax e conseqüentemente reduziria a carga proviral do HTLV-1, diminuindo o risco da mielopatia (BANGHAM & OSAME, 2005). Por outro lado, uma resposta imune intensa e exacerbada dos LTCs, com grande produção de citocinas como IFN- γ e TNF, poderia contribuir para o dano tecidual observado no sistema nervoso central (SNC) dos pacientes com HAM/TSP (AZIME *et. al*, 2000; JACOBSON, 2002) como demonstrado pelo encontro de uma elevada frequência de LTCs específicos para o HTLV-1 no líquido e sangue periférico dos pacientes com HAM/TSP (NAGAI *et. al*, 2001).

Fatores Envolvidos na Patogênese da HAM/TSP

Apesar dos avanços, nem todos os mecanismos responsáveis pela patogênese da HAM/TSP são conhecidos. Alterações na estrutura viral, fatores genéticos do hospedeiro, carga proviral e as alterações na resposta imune, com a participação das células T CD4⁺ e CD8⁺ produzindo citocinas pró-inflamatórias, têm sido descritos como fatores de risco para desenvolvimento de HAM/TSP.

Entre os fatores relacionados ao vírus foi observado que alterações na estrutura do HTLV-1 (substituições de nucleotídeos no gene tax) estariam associadas ao risco de desenvolver HAM/TSP (**FURUKAWA *et. al*, 2000**). Outro importante fator de risco é a carga proviral do HTLV-1, ou seja, a percentagem de células mononucleares do sangue periférico que carregam o provirus do HTLV-1. Vários estudos apontam para a associação entre alta carga proviral e o desenvolvimento de HAM/TSP. A carga proviral, tanto no sangue periférico quanto no líquido de pacientes com HAM/TSP é significativamente mais elevada do que a carga proviral dos portadores assintomáticos, constituindo assim um importante pré-requisito para o desenvolvimento da HAM/TSP (**NAGAI *et. al*, 1998**; **OLINDO *et. al*, 2005**; **GRASSI *et. al* 2011**).

Estudos recentes demonstram que a carga proviral e o risco de HAM/TSP são diretamente influenciados pela eficiência da resposta imune celular contra o HTLV-1 (**BANGHAM, 2008**). Uma resposta eficiente dos LTC CD8⁺ específicos para Tax manteria a população de células infectadas em equilíbrio, reduzindo a carga proviral, enquanto que em uma resposta celular pouco eficiente, a carga viral continuaria alta e os LTC, constantemente estimulados, produziram citocinas inflamatórias (IFN- γ e TNF) que participariam do processo patogênico da HAM/TSP (**BANGHAM, 2009**). Como a resposta dos LTC apresenta variação individual, sugeriu-se também que fatores genéticos do hospedeiro poderiam estar implicados no controle da carga proviral e, portanto influenciariam na susceptibilidade ou resistência à HAM/TSP (**JEFFERY *et. al*, 1999**).

A eficiência da resposta imune celular do hospedeiro frente à expressão de Tax é reconhecidamente um fator de risco importante para o desenvolvimento da HAM/TSP (**HANON *et. al.*, 2000**). O envolvimento das células T CD4⁺ infectadas pelo HTLV-1, foi descrito em estudos que mostravam um aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias no sangue e líquido e em lesões medulares de pacientes com HAM/TSP quando comparados com portadores assintomáticos (**NISHIURA *et. al*, 1996**; **FURUKAWA *et. al*, 2003**; **GOON *et. al*, 2003**, **SANTOS *et. al*, 2004**). Existem também fortes evidências de que as células T CD8⁺

participam da patogênese da HAM/TSP, uma vez que estas células foram encontradas em maior frequência no líquido do que no sangue periférico destes pacientes (**JACOBSON et. al 1992**).

O encontro de citocinas pró-inflamatórias no líquido dos pacientes com HAM/TSP sugere que células infectadas pelo HTLV-1 migram do sangue periférico para o SNC e ultrapassam a barreira hematoencefálica (BHE), tendo então um papel importante na patogênese da HAM/TSP. Algumas hipóteses foram propostas para explicar o papel do HTLV-1 no desenvolvimento da HAM/TSP: a da toxicidade direta, onde células da glia infectadas seriam destruídas por citocinas produzidas por linfócitos T CD8⁺ específico para o HTLV-1 após atravessarem a BHE; a da autoimunidade, que sugere que células da glia apresentando antígenos semelhantes aos antígenos virais seriam atacadas por células T CD4⁺ ativadas que atravessaram a BHE e a última e mais aceita das hipóteses, que é a do dano circundante ou “bystanter”, que propõe que células T CD4⁺ e CD8⁺ infectadas atravessariam a BHE e produzindo grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias induziria intensa inflamação e destruição tecidual (**OSAME et. al, 2002; NAGAI et. al, 2003**).

Comprometimento da barreira hematoencefálica na HAM/TSP

A BHE está localizada na interface entre o sangue e o tecido cerebral, é formada por células endoteliais e é responsável por separar o sistema imune e o SNC. Nas condições fisiológicas normais, esta barreira mantém a homeostase do SNC e regula seletivamente a passagem de íons, moléculas e células, fornecendo ao SNC uma proteção contra a toxicidade de compostos químicos e patógenos (**PUCCIONI-SOHLER, 1997**). Uma variedade de doenças neurológicas é responsável pela disfunção da BHE levando a um aumento da permeabilidade que pode facilitar a infiltração de células infectadas para o SNC (**WEISS et. al, 2009**). No contexto da infecção pelo HTLV-1, tem sido demonstrado que células infectadas atravessam a BHE, produzem citocinas pró-inflamatórias (IL-1 α e TNF) e são suficientes para perturbar a permeabilidade da barreira (**AFONSO et. al, 2008**).

Não se sabe ao certo como a integridade da BHE é desfeita. O comprometimento da integridade da BHE tem sido verificado em outras infecções retrovirais (**AFONSO et. al, 2008; AFONSO et. al, 2007**), entretanto, os mecanismos envolvidos neste processo ainda não são bem compreendidos. Vários estudos tem demonstrado que as quimiocinas podem participar deste processo, comprometer a BHE e participar da patogênese da HAM/TSP (**NARIKAWA et. al, 2005; GUERREIRO et. al, 2006; MONTANHEIRO et. al, 2007**).

2.5 QUIMIOCINAS

As quimiocinas foram estabelecidas como citocinas quimioatraentes, pois se acreditava que sua única função era quimiotática. Atualmente se reconhece que a principal função das quimiocinas é o recrutamento de células para o sítio inflamatório (GUERREIRO *et. al*, 2011). Entretanto estas moléculas também possuem atividade microbicida, participam da ativação celular e da polarização das células T CD4⁺, além de exercerem efeitos sobre células estruturais e estarem envolvidas na hematopoiese e angiogênese (ESCHE *et. al*, 2005; OLIVEIRA *et. al*, 2007). As quimiocinas são proteínas solúveis de baixo peso molecular (8-12 kDa), produzidas principalmente por linfócitos e células teciduais, constitutivamente ou por indução, com poder de exercer ação autócrina ou parácrina (OLIVEIRA *et. al*, 2007). Possuem de 70 a 130 aminoácidos de comprimento e quatro resíduos de cisteínas. De acordo com o número e o espaçamento dos aminoácidos existentes nos dois primeiros resíduos de cisteína da extremidade amino terminal são classificadas em quatro subfamílias: CC, CXC, XC e CX₃C, onde C é uma cisteína e X, a quantidade de aminoácidos. Funcionalmente as quimiocinas podem ser classificadas em homeostáticas, produzidas constitutivamente por várias células e capazes de recrutar leucócitos mesmo na ausência de inflamação; e quimiocinas inflamatórias, secretadas por diversos tipos celulares em resposta a um estímulo inflamatório e com capacidade de recrutar leucócitos para os locais da inflamação. De maneira geral as quimiocinas podem ser induzidas por citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 α , TNF e IFN- γ e associadas a uma resposta Th1 (quimiocinas tipo 1) ou serem induzidas por citocinas envolvidas na resposta Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) e associadas à respostas Th2 (quimiocinas Th2) (GUERREIRO *et. al*, 2011).

As quimiocinas inflamatórias atraem um conjunto diversificado de leucócitos efetores para locais inflamatórios e desempenham um papel chave na resposta imune inata, através do recrutamento de neutrófilos, monócitos/macrófagos, células dendríticas e células NK e na resposta adaptativa, recrutando células T CD4⁺ e CD8⁺ e células dendríticas. Os mecanismos responsáveis pelo recrutamento destas células para os tecidos envolve a secreção de citocinas capazes de ativar a expressão de moléculas de adesão (ESCHE *et. al*, 2005).

A primeira etapa do recrutamento dos leucócitos para o tecido envolve o rolamento destas células na superfície endotelial é mediado por moléculas da família das selectinas. O rolamento é seguido por uma adesão mais firme, agora mediada por integrinas na superfície dos leucócitos e que se ligam as moléculas de adesão expressas nas células endoteliais. Neste processo, as quimiocinas exercem o seu efeito ativando inicialmente as integrinas, resultando

na avidez às moléculas de adesão. Ao fazerem isso facilitam a transição entre o rolamento rápido e lento para firmar a adesão. Depois da migração, os gradientes de quimiocinas encontrados dentro do tecido determinarão onde os leucócitos se localizarão (ESCHE *et. al*, 2005) (Figura 5).

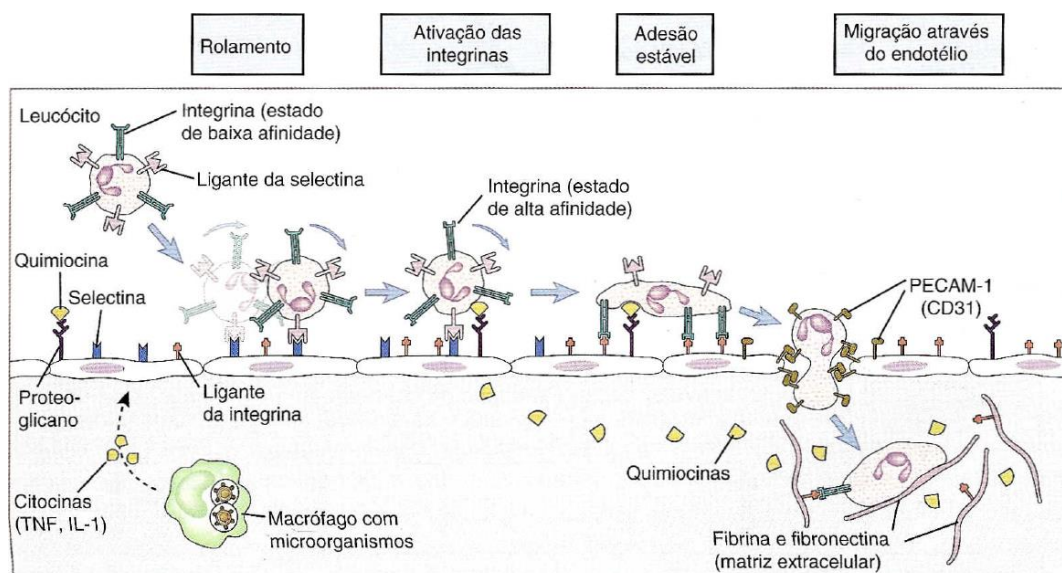


Figura 5. Sequencia de eventos na migração de leucócitos para o local da infecção (Abbas & Lichtman, 2007).

Dentre as quimiocinas inflamatórias do tipo 1 se destacam a CXCL9, conhecida como monocina induzida por interferon gama (MIG) e a CXCL10, denominada de proteína induzida por interferon gama (IP-10). CXCL9 e CXCL10 são secretadas por vários tipos celulares incluindo monócitos, células endoteliais, fibroblastos e células da micróglia, como os astrócitos, em resposta ao IFN- γ (LUSTER & RAVETCH, 1987; ANDO *et. al*, 2013). Ambas são reconhecidas pelo seu papel no tráfego de leucócitos, principalmente agindo em células ativadas como, por exemplo, as células T CD4⁺, CD8⁺ e células NK (MULLER *et. al*, 2010).

As quimiocinas exercem seus efeitos biológicos ligando-se a receptores específicos (superfamília de receptores acoplados à proteína G). Os receptores de quimiocinas têm sido identificados em diversos tipos celulares como, por exemplo, em linfócitos T, B, eosinófilos, basófilos, células NK e neutrófilos e em tecidos inflamatórios. Para cada família de quimiocinas, existe um receptor específico (CCR, CXCR, XCR e CX₃CR) mediando suas funções junto às proteínas alvo. A maioria dos receptores reconhece mais de uma quimiocina e muitas quimiocinas se ligam a mais de um receptor. Contudo receptores CXC (CXCR) se ligam apenas as quimiocinas CXC, do mesmo modo ocorre com o grupo dos CCR que se ligam

somente a quimiocinas CC (**OLIVEIRA et. al, 2007**). O CXCR3 é reconhecido por se ligar a três quimiocinas altamente inflamatórias: CXCL9, CXCL10 e CXCL11, todas quimioatraentes (**GUERREIRO e col, 2011**).

Quimiocinas pró-inflamatórias como CXCL9 e CXCL10 têm sido detectadas no soro e líquido de pacientes com doenças autoimunes e doenças inflamatórias, sugerindo um papel fisiopatológico dessas moléculas. Dentre as doenças em que se observa altas concentrações destas moléculas destacam-se a encefalite auto-imune, a Coreia de Sydeham e a HAM/TSP (**FIFE et. al, 2001; TEIXEIRA et. al, 2004; NARIKAWA et. al, 2005; TANAKA et. al, 2008**). Estudo desenvolvido por Guerreiro e colaboradores (2006) demonstrou altas concentrações de CXCL9 e CXCL10 no soro de pacientes com HAM/TSP em relação aos portadores assintomáticos e controles saudáveis. Também foi observado que a produção de IFN- γ pelas CMSP dos pacientes com HTLV-1 correlacionava-se positivamente com a produção destas quimiocinas sugerindo o papel destas moléculas na patogênese da HAM/TSP (**GUERREIRO et. al, 2006**). Estudos recentes mostraram que tanto CXCL9 quanto CXCL10 estão elevados no líquido de pacientes com HAM/TSP indicando a importância destas moléculas no desenvolvimento do processo inflamatório crônico da mielopatia associada ao HTLV-1 (**ANDO et. al, 2013; SATO et. al, 2013**).

A participação das quimiocinas na patogênese da HAM/TSP é também sugerida em estudo que demonstra uma maior concentração destas moléculas no soro de pacientes com HAM/TSP quando comparado aos indivíduos assintomáticos e aos indivíduos infectados pelo HTLV-1 com manifestação de bexiga hiperativa (**SANTOS et. al, 2012**). ANDO e colaboradores (2013) demonstraram que os astrócitos são as principais fontes produtoras de CXCL10 quando analisaram cortes histológicos de lesões medulares de pacientes com HAM/TSP. Estes autores também observaram que a produção de CXCL10 era muito maior que a produção de CXCL9 quando analisaram o líquido de pacientes com HAM/TSP indicando que os astrócitos eram as células mais ativas na produção desta quimiocina (**ANDO et. al, 2013**). Dados de outro estudo indicam que CXCL9 e CXCL10 desempenham um papel chave na patogênese da HAM/TSP pelo fato de recrutarem células inflamatórias para o SNC e induzirem dano tecidual (**SATO et. al, 2013**).

2.6 MOLÉCULAS DE ADESÃO

Para que ocorra inflamação do SNC é necessário que células responsáveis pelo processo inflamatório se liguem a células vizinhas por meio das moléculas de adesão celular. Estas

moléculas são expressas na superfície celular e atuam como mediadores da adesão célula-célula ou célula-matriz extracelular. Estas moléculas são classificadas em quatro grandes famílias (superfamília caderina, selectinas, integrinas e a superfamília das imunoglobulinas) (SELLER, 2001).

A superfamília das imunoglobulinas compreende uma variedade de proteínas de membrana das quais fazem parte a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e a molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1), ambas reconhecidas por sua participação na migração transendotelial dos leucócitos (WITKOWSKA & BORAWSKA, 2004). Estas moléculas são ligantes de moléculas de adesão pertencentes às famílias das selectinas e das integrinas. A ICAM-1 é expressa constitutivamente nos leucócitos (neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos) e nas células endoteliais e epiteliais (LEWCZUK *et. al.*1998). A VCAM-1 também é encontrada constitutivamente nas células endoteliais e em células dendríticas. Tanto ICAM-1 quanto VCAM-1 apresentam baixa expressão nas condições fisiológicas normais, entretanto aumentam sua síntese após estímulo por citocinas (VALOIS, 2006).

As integrinas são uma grande família de receptores de superfície celular responsáveis por ancorar células à matriz extracelular, funcionando como adesão célula-célula, podendo também atuar como via de sinalização intracelular (SELLER, 2001). Compreende um grupo amplo de moléculas heterodiméricas constituídas por subunidades polipeptídicas denominadas de cadeias α e β . As principais integrinas são a LFA-1 (antígeno associado à função leucocitária-1 também designado de CD11a/CD18), uma $\beta 2$ integrina e a VLA-4 (antígeno de ativação muito tardia ou CD49d/CD29), uma $\alpha 4\beta 1$ integrina. Estas moléculas estão presentes na superfície de uma grande variedade de tipos celulares, com função de mediar adesão a outras células e aos componentes da matriz extracelular, desempenhando assim, um papel importante de adesão ao endotélio ativado (SHIMIZU *et. al* 1992).

O LFA-1 é expresso em todos os leucócitos, principalmente nos linfócitos. É mais presente em células de memória do que nas células virgens (*naives*) e está muito envolvido no tráfego de linfócitos. O VLA-4 esta presente em linfócitos, monócitos e eosinófilos. É encontrado em baixa expressão nas células *naives* e tem uma expressão muito heterogênea nas células T de memória. As integrinas LFA-1 e VLA-4 ligam-se, respectivamente a ICAM-1 e a VCAM-1 (SHIMIZU *et. al* 1992). Abaixo estão apresentadas as características das moléculas de adesão celular avaliadas neste estudo (Figura 6).

Classificação	Molécula de adesão	Nomenclatura	Localização	Ligantes
Superfamília das imunoglobulinas	ICAM-1	CD54	Todos os leucócitos, células epiteliais e endoteliais	LFA-1
	VCAM-1	CD106	Células endoteliais e algumas células dendríticas	VLA-4
Família das integrinas	LFA-1	CD11a/CD18	Todos os leucócitos, principalmente linfócitos	ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3
	VLA-4	CD49d/CD29	Linfócitos, monócitos e eosinófilos	VCAM-1

Figura 6. Características das moléculas de adesão celular (modificado de VALOIS, 2006)

A ICAM-1 serve como principal contra-receptor para o LFA-1. A interação entre ICAM-1, presente em células endoteliais e o LFA-1, nos linfócitos, facilita a adesão e migração destas células através do endotélio. ICAM-1 é constitutivamente expresso ou é induzível sobre células em repouso (linfócitos T, linfócitos B, células hematopoiéticas, fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais). VCAM-1 não é expressa sobre condições normais na maioria dos tecidos. Apresenta uma expressão restrita, limitada às células endoteliais e a alguns outros tipos celulares (UMEHARA *et. al*, 1996; HILDRETH *et. al*, 1997). Esta molécula está ausente no endotélio inativado, ou seja, exibe uma baixa expressão sobre as células endoteliais não estimuladas, mas sua expressão é rapidamente aumentada quando as células endoteliais são ativadas por citocinas. A VCAM-1 esta presente também em células dendríticas, macrófagos e fibroblastos de tecidos da medula óssea (SHIMIZU *et. al*, 1992; SELLER, 2001; GOLIAS *et. al*, 2007).

As formas solúveis de ICAM-1 e VCAM-1 (sICAM-1 e sVCAM-1) representam as formas circulantes destas moléculas e são encontradas em fluídos corporais como soro, líquido, líquido sinovial, escarro, urina e fluido broncoalveolar (UMEHARA *et. al*, 1996, WITKOWSKA & BORAWSKA, 2004). A liberação destas moléculas da membrana celular é induzida por citocinas (TNF, IFN- γ , IL-1 α , IL-6) e por outros fatores como álcool e ácidos graxos, entretanto os mecanismos para a geração da forma solúvel não são completamente elucidados (WITKOWSKA & BORAWSKA, 2004; SELLER, 2001). O aumento de sICAM-1 e sVCAM-1 têm sido associado a várias condições patológicas como por exemplo, infecções virais, doenças autoimune, risco para aterosclerose e doenças cardíacas, câncer, transplantes e rejeição de enxerto e em desordens neurológicas. Doenças autoimunes e

condições inflamatórias causadas por vírus e bactérias tem sido associadas com aumento da concentração sérica de sICAM-1 (LEWCZUK *et. al*, 1998; GOLIAS *et. al*, 2007). Concentrações elevadas de sICAM-1 e sVCAM-1 foram descritas tanto no soro quanto no líquido de pacientes com esclerose múltipla (MS), em pacientes com HAM/TSP foi demonstrado que o aumento destas moléculas no soro destes pacientes correlacionava-se com a atividade da doença (TSUKADA *et. al*, 1993; SHARIEF *et. al* 1993; RIECKMANN *et. al*, 1997 – citado por Borawska, 2004).

Estudos avaliando a expressão de moléculas de adesão em lesões da medula espinhal de pacientes com HAM/TSP demonstram que, quando comparado com controles, cortes histológicos da medula dos pacientes com HAM/TSP apresentavam uma maior expressão de VCAM-1 no endotélio e uma maior expressão de LFA-1 nos linfócitos. Este estudo foi o primeiro a sugerir que a interação VLA-4/VCAM-1 tinha um papel importante na migração e recrutamento de células inflamatórias para o SNC de pacientes com mielopatia (UMEHARA *et. al*, 1996). Experimentos funcionais mostraram que linfócitos de pacientes com HAM/TSP, expressando moléculas de adesão, tinham uma maior capacidade de aderir às culturas de células endoteliais ativadas do que as células dos portadores ou controles. Este estudo sugere que esta poderia ser uma etapa inicial do processo inflamatório observado no SNC dos pacientes com HAM/TSP (AL-FAHIM *et. al*, 1999). Posteriormente, foi demonstrado que a proteína Tax do HTLV-1 induzia a expressão de moléculas de adesão, aumentando a interação celular e a proliferação de linfócitos não infectados, favorecendo a disseminação do HTLV-1 e contribuindo para o processo patogênico causado pelo HTLV-1 (VALENTIN *et. al*, 2001).

Diante do exposto acima e para melhor compreender o papel de quimiocinas e moléculas de adesão na patogênese da infecção pelo HTLV-1 nos propomos a estudar o perfil de quimiocinas induzidas por citocinas Th1 (CXCL9 e CXCL10), moléculas de adesão solúveis (sICAM-1 e sVCAM-1) e a expressão de um receptor de quimiocinas (CXCR3) e de ligantes de moléculas de adesão (LFA-1 e VLA-4) em linfócitos e monócitos de indivíduos com diferentes apresentações clínicas da infecção pelo HTLV-1. Nossa hipótese é que quimiocinas pró-inflamatórias, moléculas da adesão solúveis e células expressando receptor de quimiocinas (CXCR3) e integrinas (LFA-1 e VLA-4) estão aumentadas na HAM/TSP e participam da patogênese da infecção pelo HTLV-1.

3 OBJETIVO

3.1 GERAL

- Avaliar o papel de quimiocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão na patogênese da infecção pelo HTLV-1.

3.2 ESPECÍFICOS

- Determinar a concentração de quimiocinas pró-inflamatórias (CXCL9 e CXCL10) e de moléculas de adesão solúveis (sICAM-1 e sVCAM-1) no plasma e líquido de diferentes grupos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 (portador assintomático, indivíduos com bexiga hiperativa associada ao HTLV-1 - BH-HTLV e pacientes com HAM/TSP).
- Correlacionar a concentração das quimiocinas pró-inflamatórias (CXCL9 e CXCL10) com a concentração das moléculas de adesão solúveis (sICAM-1 e sVCAM-1) detectadas no plasma e líquido dos indivíduos infectados pelo HTLV-1.
- Analisar frequência e a mediana de intensidade de fluorescência (MIF) de linfócitos e monócitos expressando ligantes das moléculas de adesão, as integrinas LFA-1 (CD11a) e VLA-4 (CD49d)
- Verificar frequência e MIF do receptor de quimiocinas (CXCR3) em células dos diferentes grupos de indivíduos infectados pelo HTLV-1.

4 METODOLOGIA

4.1 DESENHO DO ESTUDO, LOCAL E POPULAÇÃO ESTUDADA

O presente trabalho é um estudo de corte transversal, com a finalidade de avaliar o papel de quimiocinas e moléculas de adesão na patogênese das diferentes apresentações clínicas da infecção pelo HTLV-1. Participaram deste estudo 120 indivíduos infectados pelo HTLV-1, atendidos no Ambulatório Multidisciplinar de HTLV-1 do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos (ComHUPES) da Universidade Federal da Bahia (UFBA) e acompanhados por uma equipe multidisciplinar (infectologistas, neurologistas, reumatologistas, urologistas, pneumologistas, enfermeiros, psicólogos, farmacêuticos e fisioterapeutas). Indivíduos de ambos os sexos, com idade superior a 18 e inferior a 60 anos foram incluídos no estudo. Foram excluídos indivíduos co-infectados com o vírus da imunodeficiência (HIV), vírus da hepatite B e C, com sífilis, em uso de drogas imunossupressoras ou gravidez. O diagnóstico da infecção pelo HTLV foi feito pela documentação da presença de anticorpos para HTLV pelo método ELISA e posterior confirmação pelo *Western blot*.

Os indivíduos infectados pelo HTLV-1 foram classificados em 03 grupos (40 indivíduos por grupo): 1. Portador assintomático – indivíduos infectados pelo HTLV-1 sem manifestação de bexiga hiperativa e sem mielopatia associada ao HTLV-1; 2. Indivíduo com bexiga hiperativa associada ao HTLV-1 (BH-HTLV) – indivíduos que apresentavam manifestações urinárias indicativas de bexiga hiperativa, confirmada por estudo urodinâmico. Estes pacientes são considerados como prováveis HAM/TSP, segundo os critérios de **DE CASTRO-COSTA, 2006**; 3. HAM/TSP – indivíduos infectados pelo HTLV-1 que preenchem os critérios para HAM/TSP, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS). Para alguns experimentos, indivíduos saudáveis, não infectados pelo HTLV-1, foram incluídos como grupo controle.

Os indivíduos infectados pelo vírus e acompanhados no ambulatório realizam semestralmente ou anualmente, avaliação imunológica para dosagem de citocinas (IFN- γ , TNF, IL-5 e IL-10) e determinação da carga proviral. Os resultados das citocinas e da carga proviral são adicionados no banco de dados do HTLV, mantidos no Serviço de Imunologia e podem ser utilizados em estudos posteriores.

A participação dos indivíduos incluídos no estudo foi voluntária. Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Bahia - Plataforma Brasil (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética - CAAE:

46953414.4.0000.5577 – Anexo I). Uma vez esclarecido sobre a natureza da pesquisa e aceitando participar do estudo, assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), Anexo II.

4.2 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS E AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE

Obtenção das amostras

Os soros/plasmas utilizados nos ensaios imunoenzimáticos (ELISAs) foram obtidos de alíquotas guardadas após coleta de 30 mL sangue de cada participante (controle, portador assintomático, BH-HTLV e HAM/TSP). As amostras de líquido de alguns indivíduos com BH-HTLV e pacientes com HAM/TSP estavam armazenadas no Biobanco do SIM (em construção) e foram cedidas pelo Serviço de Imunologia do ComHUPES-UFBA.

Separação das células mononucleares do sangue periférico

Aproximadamente 30 mL de sangue heparinizado foram coletados dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 e dos controles para obtenção das células mononucleares do sangue periférico (CMSP). As CMSP foram isoladas pelo gradiente de Ficoll-Hypaque após centrifugação (400 g) por 30 minutos. O anel de células mononucleares foi coletado na interface e lavado 3 vezes com salina estéril. Em seguida, 4×10^5 células foram colocadas por poço em placa de 96 poços com fundo em “U” contendo meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino e 0,05% de gentamicina para realização dos experimentos de citometria de fluxo.

Quantificação de moléculas de adesão solúveis

As concentrações de ICAM-1 e VCAM-1 solúveis foram determinadas pelo método de ELISA *sandwich* em amostras de soros/plasmas e líquido dos diferentes grupos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e do grupo controle. Foram utilizados kits comercialmente disponíveis, segundo o protocolo do fabricante (R&D Systems, MN, USA).

Determinação da concentração de quimiocinas

As concentrações das quimiocinas pró-inflamatórias (CXCL9 e CXCL10) foram determinadas pelo método de ELISA *sandwich*, utilizando soros/plasmas dos diferentes grupos de estudo. Foram utilizados reagentes comercialmente disponíveis (BD Bioscience, San Diego, CA).

Caracterização fenotípica dos linfócitos por citometria de fluxo

A avaliação das populações de linfócitos T ($CD4^+$ e $CD8^+$) e monócitos ($CD14^+$) expressando os ligantes de ICAM-1 (CD11a ou LFA-1) e VCAM-1 (CD49d ou VLA-4) e o receptor de quimiocinas (CXCR3) foi realizada com 4×10^5 células/poço dos diferentes grupos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 (portador assintomático, BH-HTLV e HAM/TSP). Células de indivíduos saudáveis foram utilizadas como controle. Células não estimuladas foram marcadas *ex vivo* com anticorpos monoclonais (anti- $CD4^+$, anti- $CD8^+$, anti- $CD14^+$, anti-CXCR3, anti-CD11a e anti-CD49d). Nesses experimentos não foram utilizados os controles de isotipo para a análise dos dados, mas sim o controle não corado (**BAUMGARTH & ROEDERER, 2000**). As CMSP foram ajustadas e colocadas em placas de 96 poços, específicas para citometria de fluxo, centrifugadas por 7 minutos a 1500 rpm (4°C). Em seguida as células foram lavadas com PBS e fixadas com formaldeído a 2% e armazenadas a 4°C até o dia da aquisição. No mínimo 100000 eventos das amostras foram adquiridos utilizando o citômetro de fluxo FACSCanto II. Posteriormente os dados foram analisados utilizando o programa FloJow.

A Figura 7 mostra a estratégia utilizada para identificação de linfócitos, baseados nos parâmetros de tamanho (FSC) e granulidade (SSC).

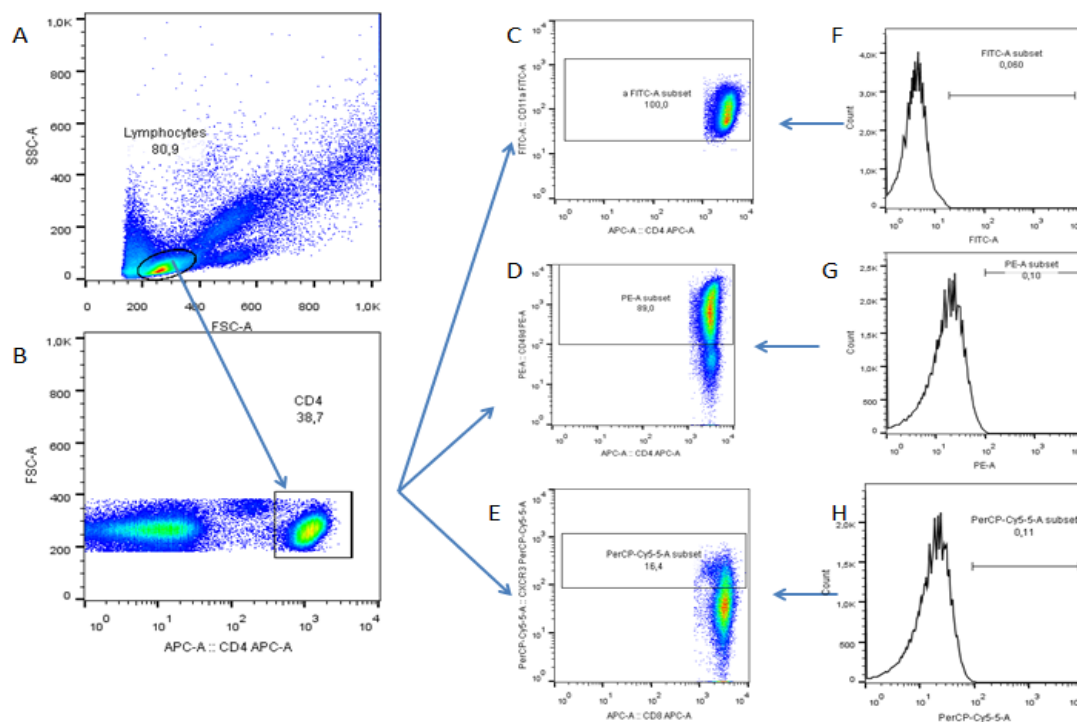


Figura 7. Estratégia de análise dos dados de citometria de fluxo. (A) Dot Plot representativo de CMSP de um paciente assintomático mostrando *gate* para linfócito. (B) *Gate* de linfócito T $CD4^+$. (C) Marcação de $CD4^+/CD11a^+$ (D) Marcação de $CD4^+/CD49d^+$ (E) Marcação de $CD4^+/CXCR3^+$ (F) Controle não corada para FITC (G) Controle não corada para PE (H) Controle não corada para Percp-Cy5.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Dados foram analisados utilizando GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USAS). O teste de Fisher foi usado para comparações de gênero. Para avaliar as diferenças entre os grupos foram utilizados os testes de Mann-Whitney (comparação de dois grupos independentes) e o teste de Kruskal-Wallis (para comparação estatística entre mais de dois grupos). O teste de Spearman foi utilizado para verificar correlação entre as concentrações de quimiocinas e as moléculas de adesão. Um erro α de 5% ($p < 0,05$) foi considerado para obtenção da significância estatística.

4.4 CÁLCULO AMOSTRAL

Baseado em resultados preliminares, obtidos com a dosagem de VCAM-1 solúvel onde foi observada uma diferença estatística significativa entre portadores assintomáticos e HAM/TSP (1100 ± 600 ng/mL X 1600 ± 700 ng/mL; $p=0,04$, teste de Mann-Whitney), é esperado um aumento na produção destas moléculas. Para alcançar uma significância estatística de 0,05 com um poder 0,80, um número (N) superior a 35 pacientes por grupo foi suficiente (*Stata 13 software*).

5 RESULTADOS

5.1 Características gerais dos pacientes

Os 120 indivíduos infectados pelo HTLV-1, selecionados aleatoriamente para o estudo, foram distribuídos em 03 grupos, cada um com 40 indivíduos (portador assintomático, BH-HTLV e HAM/TSP). Os grupos não diferiram quanto ao gênero ($p=0,83$) e idade ($p=0,33$). Dados obtidos no banco de dados do HTLV mostraram que a carga proviral dos pacientes com HAM/TSP foi maior (149016 cópias/ 10^6 células) do que a carga proviral dos portadores assintomáticos (34584 cópias/ 10^6 células) ou dos indivíduos com BH-HTLV (77249 cópias/ 10^6 células), $p=0,007$. A produção espontânea de IFN- γ nas culturas de CMSP dos pacientes com HAM/TSP foi significativamente maior (mediana de 2412 pg/ml, variando de 49 a 3710 pg/ml) do que nos indivíduos com BH-HTLV (1353 pg/ml, variando de 0 a 3337 pg/ml) e entre portadores assintomáticos (572 pg/ml, variando de 0 a 3374 pg/ml), $p=0,0001$. A produção espontânea de TNF também variou entre os grupos, com células dos portadores assintomáticos produzindo menor concentração espontânea de TNF (117 pg/ml, variando de 0 a 2197 pg/ml), do que os BH-HTLV (320 pg/ml, variando de 0 a 4686 pg/ml) e HAM/TSP (993 pg/ml, variando de 0 a 4952 pg/ml), $p=0,0001$.

A tabela 1 resume as características demográficas (gênero e idade), carga proviral e produção espontânea de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ e TNF) dos indivíduos infectados pelo HTLV-1, avaliados neste estudo.

Tabela 1. Características demográficas, carga proviral e citocinas pró-inflamatórias dos diferentes grupos de indivíduos infectados pelo HTLV-1

	Portador assintomático (n=40)	BH-HTLV (n=40)	HAM/TSP (n=40)	Valor de p
Gênero Feminino (N, %)	26 (65,0%)	26 (65,0%)	25 (62,5%)	0,83*
Idade^a (anos)	51,0 (25-69)	55,5 (25-71)	55,5 (23-75)	0,33**
Carga proviral^a (No. cópias/10 ⁶ CMSP)	34584 (0-757662)	77249 (0- 992164)	149016 (0-1768442)	0,007**
IFN-γ^b (pg/ml)	572 (0- 3374)	1353 (0- 3337)	2412 (49- 3710)	0,0001**
TNF^b (pg/ml)	117 (0- 2197)	320 (0- 4686)	993 (0- 4952)	0,0001**

HTLV-1- vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1; BH-HTLV= bexiga hiperativa associada ao HTLV-1; CMSP - células mononucleares do sangue periférico

*Teste exato de Fisher (χ^2).

**Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns.

^a Mediana e variação (p<0,05 - Portador assintomático versus HAM/TSP)

^b Produção espontânea das citocinas em culturas de CMSP (mediana e variação; p<0,05 – Portador assintomático versus HAM/TSP e BH-HTLV versus HAM/TSP)

5.2 Quimiocinas pró-inflamatórias (CXCL9 e CXCL10) no soro e líquido de indivíduos infectados pelo HTLV-1.

A concentração das quimiocinas CXCL9 e CXCL10 no soro e líquido dos diferentes grupos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 (portador assintomático, BH-HTLV-1 e HAM/TSP) foi analisada pelo método de ELISA (Figura 8). Soros dos pacientes com HAM/TSP apresentaram maiores concentrações de CXCL9 (mediana de 2428 pg/ml, variando de 584 a 9162 pg/ml) do que os soros dos portadores assintomáticos (1224, variando de 124 a 7974 pg/ml) e dos BH-HTLV (1104 pg/ml, variando de 229 a 5313 pg/ml), p<0,0001. Não foram observadas diferenças na produção de CXCL9 quando os portadores assintomáticos e os indivíduos com BH-HTLV foram comparados (Figura 8A). A produção sérica de CXCL10 foi significativamente maior nos pacientes com HAM/TSP (639 pg/ml, variando de 99 a 2483 pg/ml) do que nos portadores assintomáticos (239 pg/ml, variando de 71 a 5068 pg/ml) e nos BH-HTLV (226 pg/ml, variando de 51 a 652 pg/ml), p<0,0001. Também não foram observadas diferenças significativas na produção de CXCL10 quando os soros dos portadores assintomáticos e dos indivíduos com BH-HTLV foram comparados (Figura 8B).

A concentração de CXCL9 e CXCL10 foi determinada somente no líquido dos indivíduos com BH-HTLV e dos pacientes com HAM/TSP. A concentração de CXCL9 no líquido dos pacientes com HAM/TSP (1167 pg/ml, variando de 44 a 3518 pg/ml) foi significativamente

maior do que a observada para os BH-HTLV (19 pg/ml, variando de 0 a 503 pg/ml), $p < 0,0001$ (Figura 8C). Similar ao observado com a concentração de CXCL9, a concentração de CXCL10 no líquido dos pacientes com HAM/TSP foi maior (1491 pg/ml variando de 99 a 2355 pg/ml) do que nos BH-HTLV (300 pg/ml, variando de 98 a 3171 pg/ml), $p < 0,01$ (Figura 8D). Questões éticas impedem a coleta do líquido dos portadores assintomáticos, de forma que não foi possível comparar a produção destas moléculas no líquido dos portadores assintomáticos com a produção nos outros dois grupos (BH-HTLV e HAM/TSP).

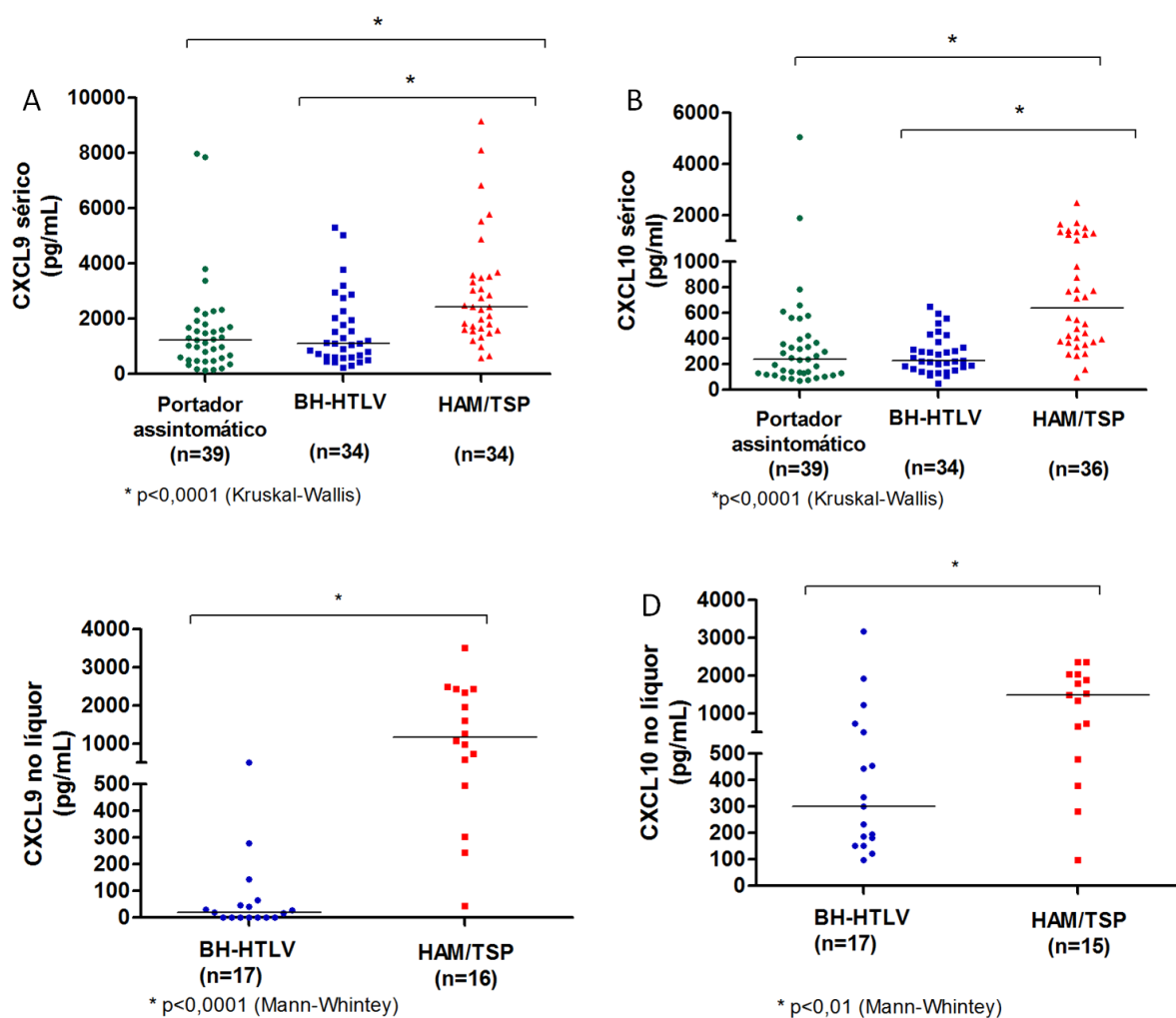


Figura 8. Quimiocinas no soro e líquido de indivíduos infectados pelo HTLV-1. (A) CXCL9 e (B) CXCL10, no soro de portadores assintomáticos de HTLV-1 (n=39), indivíduos com bexiga hiperativa associada ao HTLV-1, BH-HTLV (n=34) e pacientes com HAM/TSP (n=34). Os resultados foram expressos em mediana e variação e o teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunns, utilizado para análise estatística. (C) CXCL9 e (D) CXCL10 no líquido dos BH-HTLV (n=17) e HAM/TSP (n=17). Os resultados foram expressos em mediana e variação e o teste de Mann-Whitney utilizado para análise estatística.

5.3 Moléculas de adesão solúveis (sICAM-1 e sVCAM-1) no soro e líquido de indivíduos infectados pelo HTLV-1.

A concentração de sICAM-1 e sVCAM-1 em soro e líquido dos diferentes grupos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 foram analisadas pelo método de ELISA (Figura 9). A produção sérica de sICAM-1 não diferiu entre os grupos. A concentração de sICAM-1 no soro dos portadores assintomáticos (mediana de 184 ng/mL, variação de 24 a 404 ng/mL) foi similar a observada no soro dos BH-HTLV (186 ng/mL, variação de 43 a 350 ng/mL) e no soro dos pacientes com HAM/TSP (180 ng/mL, variação de 27 a 307 ng/mL), $p>0,05$. O valor de referencia (VR) fornecido pelo kit, calculado utilizando soro de controles soronegativos, determina uma concentração média de 208 ng/mL (variação de 100 a 320 ng/mL). Podemos observar que mais de 50% dos indivíduos, nos 3 grupos de indivíduos infectados pelo HTLV-1, apresentaram concentrações de sICAM-1 abaixo do valor de referencia fornecido pelo kit (Figura 9A). A concentração de sVCAM-1 no soro dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 ficou muito acima dos VR fornecidos pelo kit (557 ng/mL, variação de 349 a 991 ng/ml), entretanto quando os grupos foram comparados entre si, não foi observada diferença estatística entre eles ($p>0,05$). Os portadores assintomáticos apresentaram uma alta concentração de sVCAM-1 (1352 ng/mL, variação de 102 a 2559 ng/mL), igual ao observado nos BH-HTLV (1373 ng/mL, variação de 558 a 2617 ng/mL) e HAM/TSP (1710 ng/mL, variando de 681 a 2704 ng/ml), (Figura 9B). Observamos que os pacientes com HAM/TSP apresentaram tendência de uma concentração mais elevada de sVCAM-1 porém, não houve diferença estatística, quando os grupos foram comparados.

A liberação de moléculas de adesão solúveis no líquido de indivíduos com BH-HTLV ($n=17$) e de pacientes com HAM/TSP ($n=17$) foi também avaliada. A produção de sICAM-1 e sVCAM-1 no líquido destes pacientes foi quantitativamente muito baixa. A concentração de sICAM-1 no líquido dos pacientes com HAM/TSP (1,9 ng/mL com variação de 1,4 a 3,6 ng/ml) foi similar a concentração desta molécula no líquido dos indivíduos com BH-HTLV (1,7 ng/mL variando de 1,4 a 5,7 ng/ml), $p=0,07$ (Figura 9C). Observamos que no líquido a concentração de sVCAM-1 foi quantitativamente mais elevada do que sICAM-1. Também não foram observadas diferenças estatísticas na concentração de sVCAM-1 quando líquido dos indivíduos BH-HTLV-1 (4,5 ng/mL com variação de 1,7 a 38 ng/ml) e HAM/TSP (6,4 ng/mL, variação de 3 a 20 ng/ml) foram comparados ($p=0,2$, Figura 9D). Como comentado acima, questões éticas impediram a comparação da concentração destas moléculas no líquido dos portadores assintomáticos com os outros dois grupos (BH-HTLV e HAM/TSP).

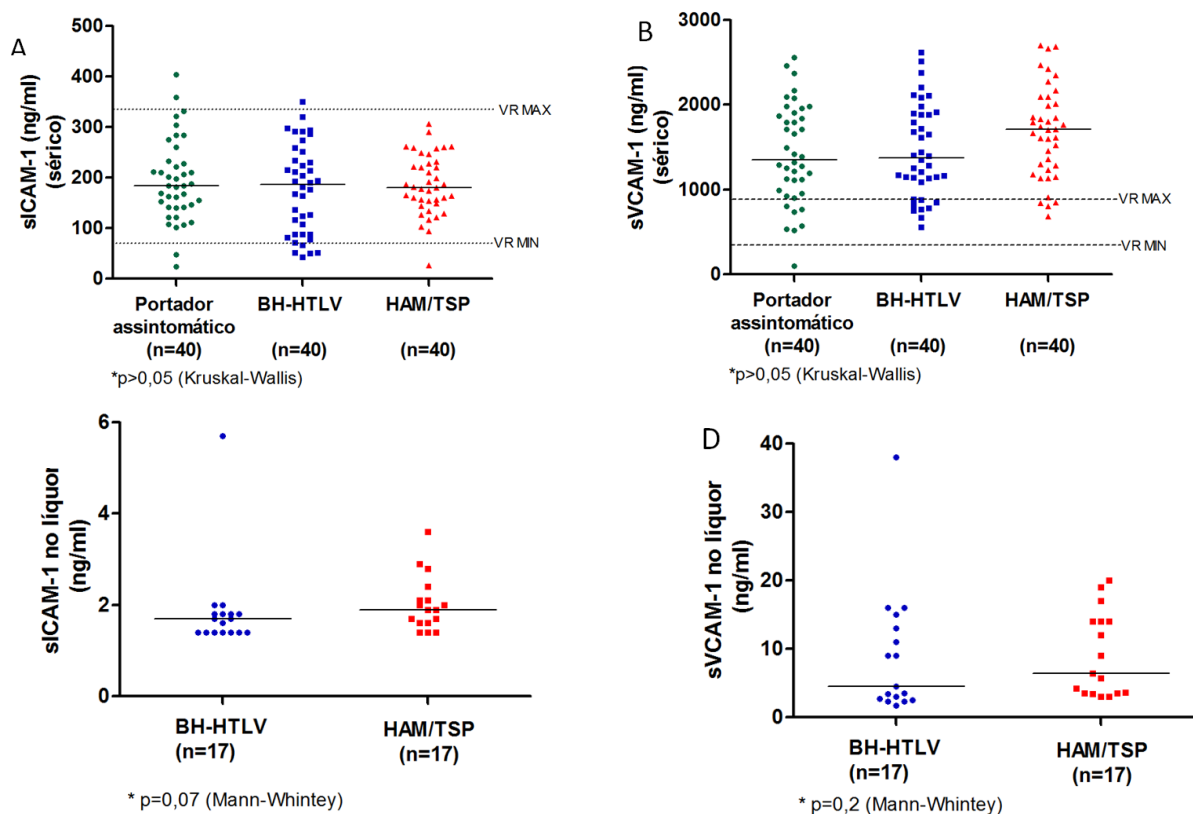


Figura 9. Moléculas de adesão solúveis no soro e líquido de indivíduos infectados pelo HTLV-1. (A) sICAM-1 e (B) sVCAM, no soro de portadores assintomático de HTLV-1 (n=40), BH-HTLV (n=40) e HAM/TSP (n=40). Os resultados estão expressos em mediana e variação e o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns, utilizado para comparação entre os grupos. (C) sICAM-1 e (D) sVCAM-1, no líquido de indivíduos BH-HTLV (n=17) e HAM/TSP (n=17). VR MAX= Valor de referência máximo; VR MIN= Valor de referência mínimo. Os resultados foram expressos em mediana e variação e o teste de Mann-Whitney utilizado para análise estatística.

5.4 Correlação entre moléculas de adesão e quimiocinas pró-inflamatórias no soro dos indivíduos infectados pelo HTLV-1.

Análises de correlação foram feitas para verificar associação entre a produção das quimiocinas e as moléculas de adesão. Foram realizadas correlações entre sICAM-1 e sVCAM-1 e CXCL9 e CXCL10 produzidas no soro e líquido dos diferentes grupos estudados.

Nenhuma correlação entre as concentrações séricas de CXCL9 e CXCL10 com sICAM-1 foi observada. Os grupos foram analisados separadamente e também juntos, como um grupo único de indivíduos infectados pelo vírus (dados não mostrados).

Analisando a correlação entre CXCL9 e CXCL10 com sVCAM-1, verificamos que quando os grupos foram analisados separadamente, não foram encontradas correlações. Entretanto, uma correlação positiva, porém fraca, entre sVCAM-1 e CXCL9 séricos ($R=0,244$; $p=0,012$) e sVCAM-1 e CXCL10 séricos ($R=0,212$; $p=0,03$) foi observada quando os grupos foram analisados conjuntamente, Figura 10 (A e B).

Também foram analisadas as correlações entre as moléculas de adesão solúveis produzidas no líquido dos BH-HTLV e HAM/TSP e as quimiocinas séricas dos indivíduos infectados pelo HTLV-1. sICAM-1 ($R=0.48$, $p=0,04$) e sVCAM-1 ($R=0.4$, $p=0,01$) no líquido correlacionaram-se positivamente somente com CXCL9 sérico, Figura 10 (C e D). Não foram observadas correlações entre sICAM-1 e sVCAM-1 no líquido com CXCL-10 sérico (dados não mostrados).

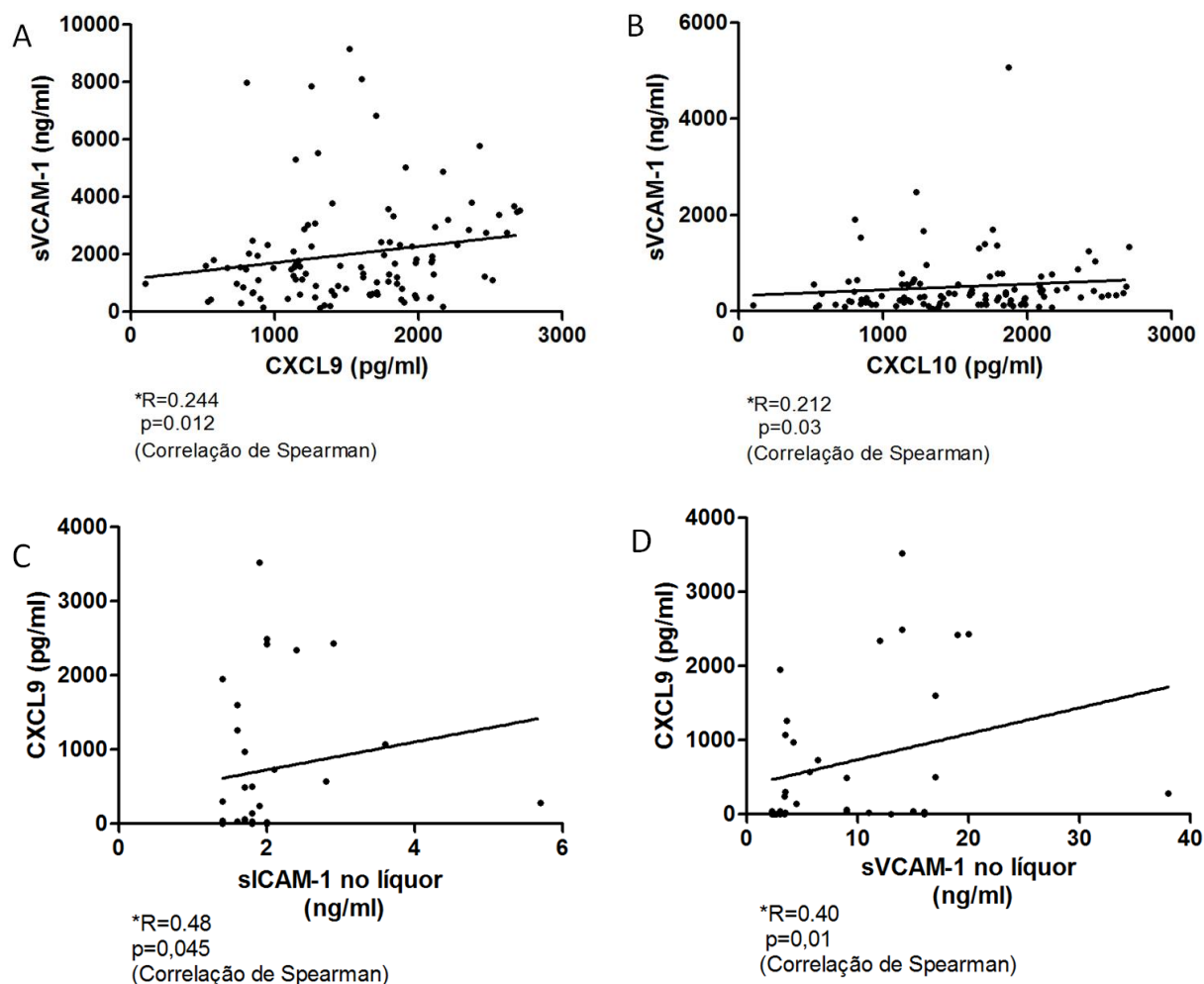


Figura 10. Correlação entre moléculas de adesão solúveis no soro e líquido e quimiocinas séricas de indivíduos infectados pelo HTLV-1. (A) correlação entre sVCAM-1 e CXCL9 e (B) sVCAM-1 e CXCL10 , no soro dos indivíduos infectados pelo HTLV-1, analisados conjuntamente. (C) correlação entre sICAM-1 no líquido e CXCL9 e (D) sVCAM-1 no líquido e CXCL9 de todos os indivíduos infectados pelo HTLV-1. O teste correlação de Spearman foi utilizado para análise estatística.

5.5 Frequência de células T CD4⁺ e CD8⁺ e monócitos CD14⁺ nos diferentes grupos de indivíduos infectados pelo HTLV-1.

A frequência de células CD4⁺, CD8⁺ e CD14⁺ de controles e dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 (portador assintomático, BH-HTLV e HAM/TSP) foi realizada após marcação *ex vivo* das CMSP e análise por citometria de fluxo (Tabela 2).

Tabela 2. Frequência de células T (CD4⁺ e CD8⁺) e monócitos (CD14⁺) em CMSP de indivíduos infectados pelo HTLV-1.

CMSP (%)	Controle (n=10)	Portador assintomático (n=12)	BH-HTLV (n=10)	HAM/TSP (n=11)	Valor de p*
^a CD4 ⁺	40 (14-58)	51 (28-73)	54 (27-67)	50 (5-68)	0,48
^a CD8 ⁺	24 (7-30)	17 (4-23)	15 (4-66)	18 (1-23)	0,36
^a CD14 ⁺	71 (20-84)	73 (25-92)	73 (28-94)	71 (29-98)	0,88

*Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns.

^a Mediana e variação (p>0,05)

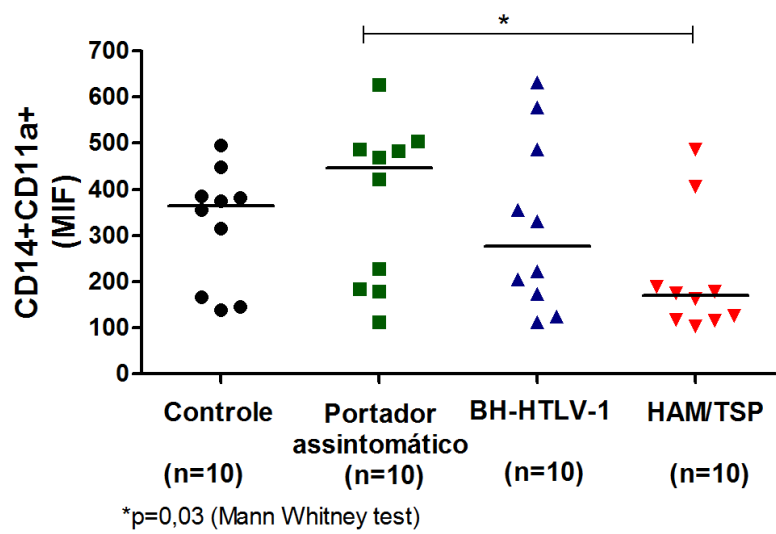
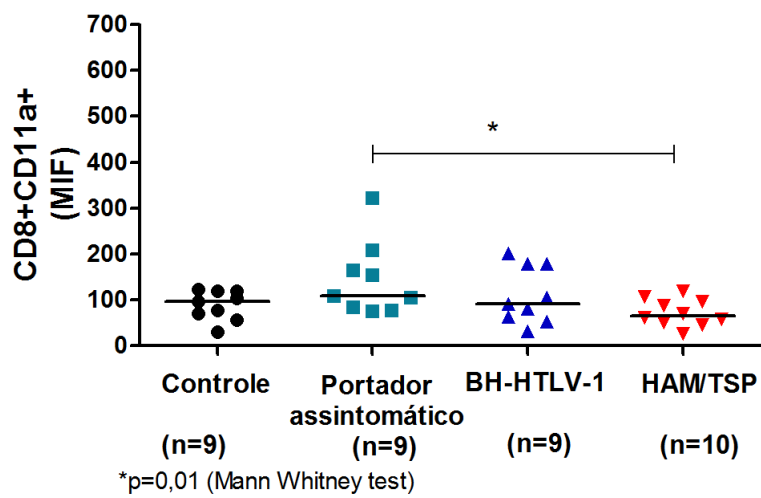
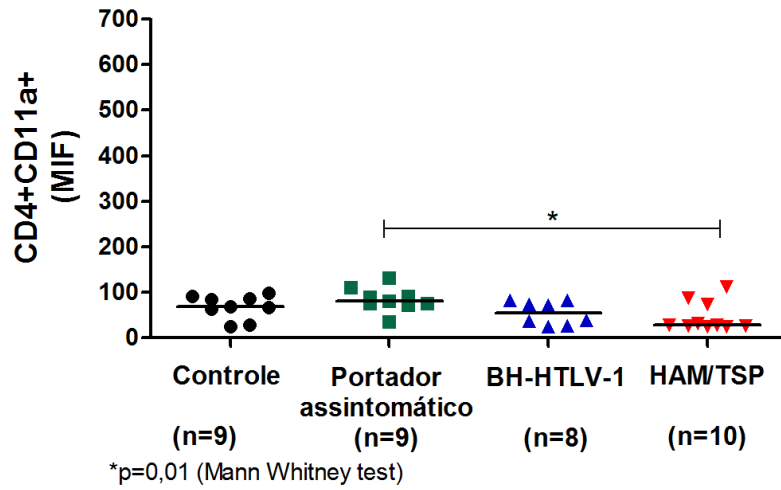
A frequência de células T (CD4⁺ e CD8⁺) e monócitos (CD14⁺) foi obtida de CMSP marcadas com anticorpos para as linhagens celulares (anti-CD4⁺, anti-CD8⁺ e anti-CD14⁺) nos diferentes grupos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 (portador assintomático, BH-HTLV e HAM/TSP) e nos controles. A frequência das populações celulares foi determinada por citometria de fluxo e analisada em FloJow.

A frequência de linfócitos, avaliada de acordo com os parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), foi de 40% nos controles, 51% nos portadores assintomáticos, 54% nos BH-HTLV e 50% nos HAM/TSP para as células CD4⁺. Para as células CD8⁺ foi observada uma frequência de 24% nos controles, 17% nos portadores assintomáticos, 15% nos BH-HTLV e 18% nos HAM/TSP. A frequência das células CD14⁺, avaliada de acordo com parâmetros FSC e SSC para monócitos, foi de 73% nos portadores assintomáticos e BH-HTLV e de 71% nos controles e HAM/TSP. Não foram observadas diferenças na frequência destas populações de células quando os grupos foram comparados (p>0,05, teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns).

1.6 Mediana de intensidade de fluorescência (MIF) de células T CD4⁺, CD8⁺ e monócitos CD14⁺, expressando ligantes das moléculas de adesão (CD11a e CD49d)

Para avaliar a expressão de ligantes das moléculas de adesão em diferentes tipos celulares, foi determinada a frequência e a MIF das integrinas CD11a e CD49d sobre os linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e sobre monócitos CD14⁺. Os resultados foram analisados por citometria de fluxo e comparados entre os diferentes grupos (controles e indivíduos infectados pelo HTLV-1), Figura 11.

A alta frequência de CD11a e CD49d nas células CD4⁺, CD8⁺ e CD14⁺ confirmam que estas moléculas são constitutivas. Quase 100% destas células expressaram CD11a e CD49d (dados não mostrados). A MIF da integrina CD11a expressa nas células CD4⁺ (80, variando de 36-131 MIF) e CD8⁺ (108, variando de 75-322 MIF) foi maior nos portadores assintomáticos quando comparados ao HAM/TSP (29, variando de 24-113 e 65, variando de 27-120, respectivamente), $p=0,01$ (Figura 11A, B). A expressão de CD11a em monócitos dos portadores assintomáticos (446, variando de 112-625 MIF) foi maior do que a expressão dessa molécula em monócitos dos BH-HTLV (274, variando de 112-632 MIF) e HAM/TSP (169, variando de 104-487 MIF), $p=0,03$, Figura 11C. A MIF de CD49d sobre as células CD4⁺ e CD8⁺ não diferiu entre os grupos (Figura 11D, E). Também foram observadas variações na expressão de CD49d nos monócitos CD14⁺ dos diferentes grupos avaliados. Entretanto, apesar da tendência de uma menor expressão de CD49d nos monócitos CD14⁺ dos pacientes com HAM/TSP (322, variando de 154-973 MIF), não foi observada diferença estatística entre os grupos: portador assintomático (562, variando de 150-1762) e BH-HTLV (724, variando de 34-1928), $p>0,05$ (Figura 11F).



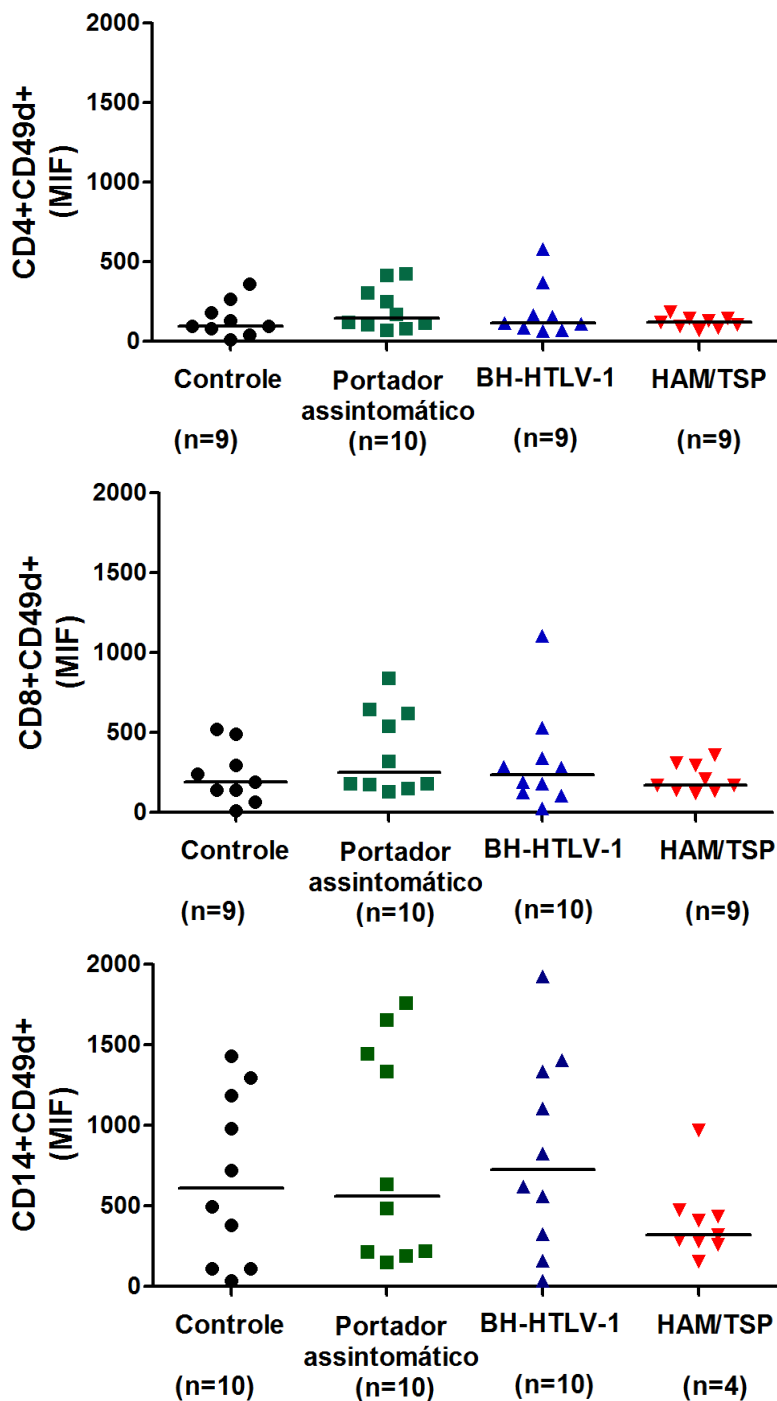
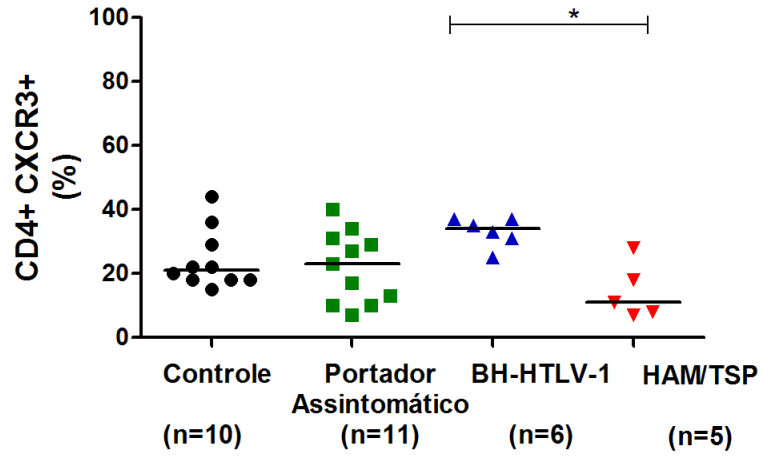


Figura 11. Mediana de intensidade de fluorescência (MIF) das células $CD4^+$, $CD8^+$ e $CD14^+$ expressando $CD11a$ e $CD49d$. (A e D) Células $CD4^+$, (B e E) células $CD8^+$ e (C e F) monócitos $CD14^+$, em CMSP de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e controles. Os resultados foram expressos em mediana e variação. O teste de Mann-Whitney com pós-teste de Dunns foi utilizado para comparação entre os grupos.

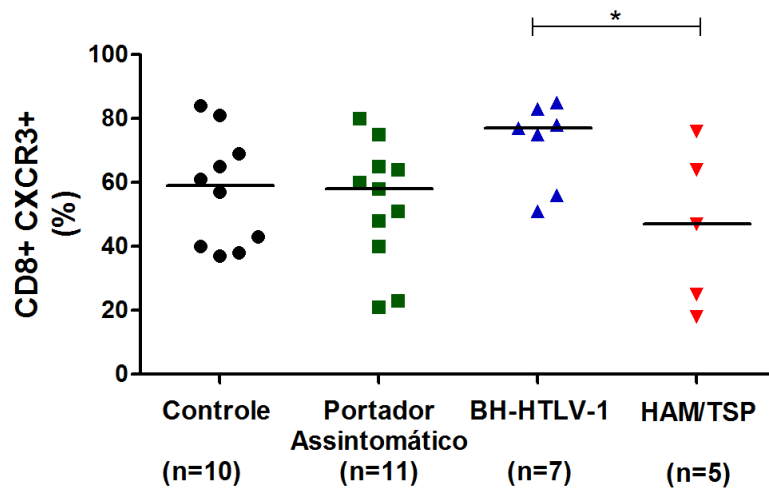
5.7 Frequência e mediana de intensidade de fluorescência (MIF) de células T CD4⁺, CD8⁺ e monócitos CD14⁺, expressando o receptor de quimiocinas (CXCR3).

A expressão de CXCR3 nas células CD4⁺, CD8⁺ e CD14⁺ foi analisada (Figura 12). Células T CD4⁺ e CD8⁺ dos pacientes com HAM/TSP apresentaram uma menor expressão de CXCR3 quando comparado com os outros grupos. A frequência de CXCR3 nas células CD4⁺ diferiu apenas entre os BH-HTLV (34%, variando de 25% a 37%) e HAM/TSP (11%, variando de 7% a 28%), $p=0,02$ (Figura 12A). A expressão de CXCR3 nas células CD8⁺ também foi menor nos pacientes com HAM/TSP (47%, variando de 18% a 76%) quando comparado com os BH-HTLV (77%, variando de 51% a 85%, Figura 12B), $p=0,05$. Embora sem diferença estatística, observamos uma tendência de aumento da frequência de expressão de CXCR3 nos monócitos CD14⁺ dos pacientes com HAM/TSP, quando comparado com os outros grupos (Figura 12C).

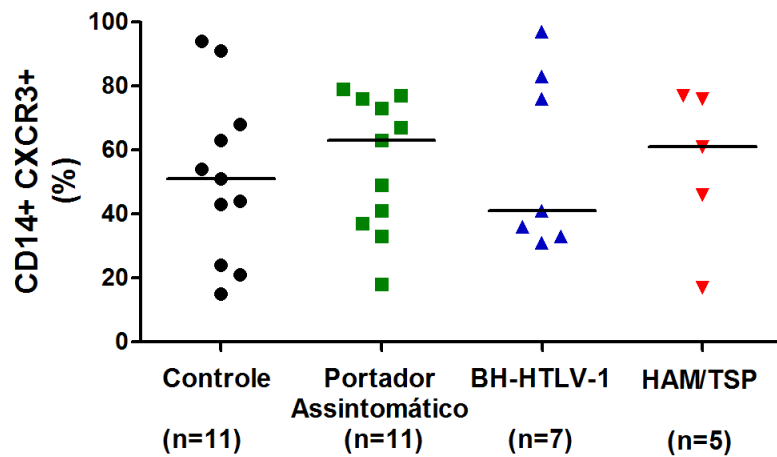
A análise dos dados utilizando a MIF demonstrou que a expressão de CXCR3 nas células CD4⁺ não diferiu entre os grupos, apesar da menor expressão desta molécula nos HAM/TSP (21, variando de 7-29 MIF) quando comparado ao portador (31, variando de 4-58 MIF) e aos BH-HTLV (26, variando de 6-76 MIF), $p>0,05$ (Figura 12D). Também não foram observadas diferenças estatísticas na expressão desta molécula sobre as células CD8⁺, apesar da tendência de menor expressão nos HAM/TSP (39, variando de 20-72 MIF) quando comparado ao portador (74, variando de 11-129 MIF) e ao BH-HTLV (76, variando de 11-157 MIF), $p>0,05$ (Figura 12E). Embora sem diferença estatística, observamos também uma menor expressão de CXCR3 sobre os monócitos CD14⁺ dos HAM/TSP (74, variando de 26-158 MIF) quando comparado ao portador (125, variando de 9-211 MIF) e ao BH-HTLV (104, variando de 12 a 276 MIF), $p>0,05$.



* $p=0,02$ (Kruskal-Wallis test)



* $p=0,05$ (Mann Whitney test)



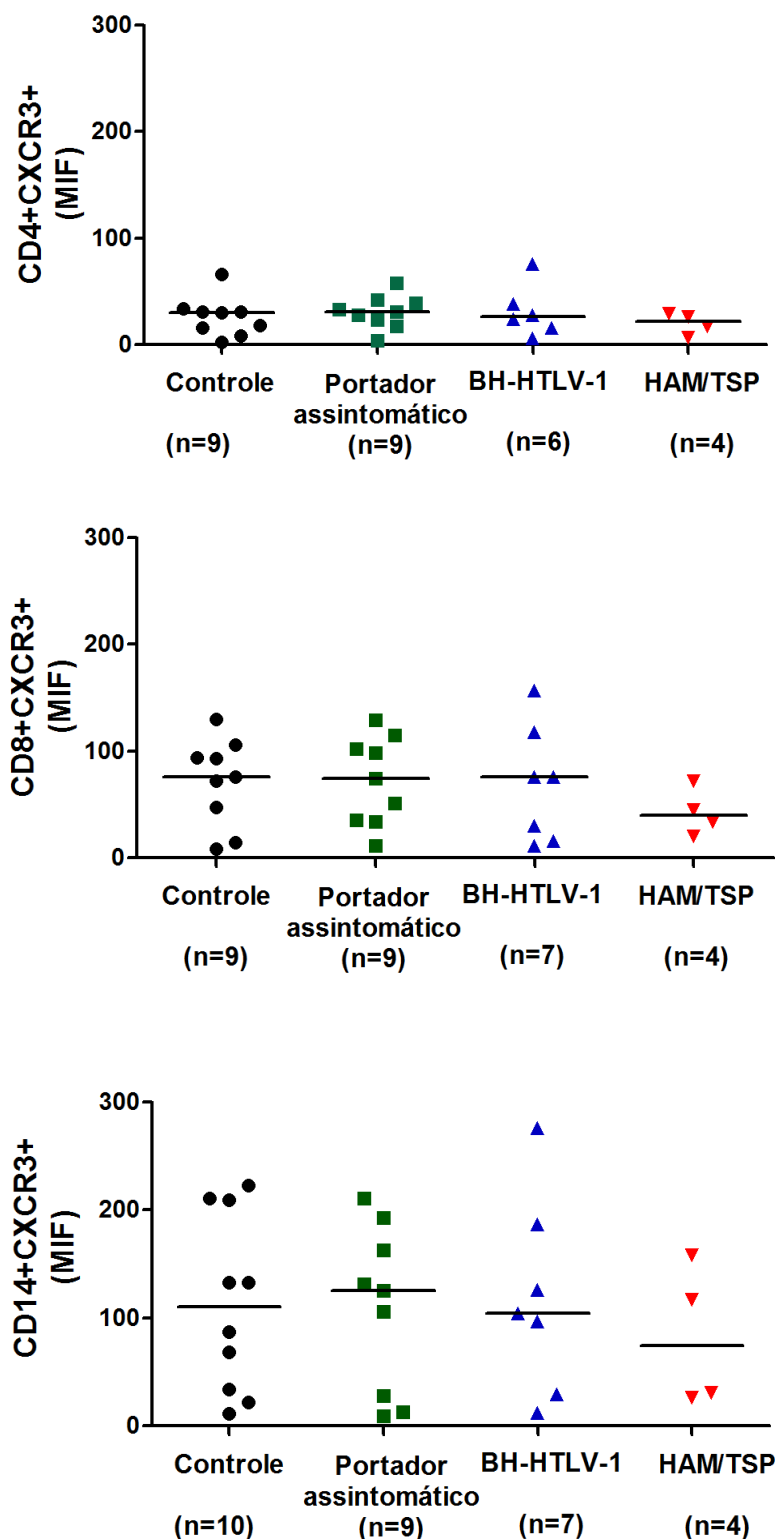


Figura 12. Frequência e mediana de intensidade de fluorescência (MIF) de células CD4⁺, CD8⁺ e CD14⁺ expressando CXCR3. (A, D) Frequência e MIF de células CD4⁺ (B, E) Células CD8⁺ e (C, F) monócitos CD14⁺ expressando CXCR3 em CMSP de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e controles. Os resultados foram expressos em mediana e variação. O teste de Kruskal Wallis com pós-teste de Dunns foi utilizado para comparação entre os grupos.

6 DISCUSSÃO

Ainda se desconhece os mecanismos pelos quais células infectadas pelo HTLV-1 invadem o SNC causando dano tecidual, caracterizando a patogênese da HAM/TSP. Além de outros fatores, a resposta imune com proliferação de células com perfil Th1 e produção exagerada de citocinas pró-inflamatórias como TNF, IFN- γ e IL-1 α participam da patogênese da HAM/TSP (FURUKAWA *et. al*, 2003; SANTOS *et. al*, 2004). Adicionalmente, quimiocinas e outras moléculas podem estar envolvidas e serem responsáveis por aumentar a permeabilidade da barreira hematoencefálica e atrair células infectadas para o SNC (GUERREIRO *et. al*, 2006; AFONSO *et. al*, 2007). Avaliando o papel de quimiocinas pró-inflamatórias e de moléculas de adesão solúveis na patogênese da infecção pelo HTLV-1, verificamos o envolvimento destas moléculas na patogênese da HAM/TSP.

A HAM/TSP é uma doença neurodegenerativa, caracterizada por lesões teciduais resultantes da produção espontânea de citocinas pró-inflamatórias (ARAUJO *et. al*, 1998). Vários estudos dão suporte à participação de citocinas com perfil Th1 na patogênese da HAM/TSP (BANGHAN & OSAME, 2005; NAKAMURA *et. al*, 2009). Mesmo as células dos indivíduos considerados como portadores assintomáticos apresentam alta produção espontânea de citocinas, quando comparados com controles não infectados (CARVALHO *et. al*, 2001). A produção espontânea e exacerbada de IFN- γ e TNF pelas CMSP dos pacientes com HAM/TSP dão suporte a participação destas moléculas na patogênese da HAM/TSP (SANTOS e col, 2004). Células de indivíduos infectados pelo HTLV-1, com manifestação de bexiga hiperativa, além de apresentarem uma alta carga proviral, também produzem concentrações elevadas de citocinas pró-inflamatórias, similar ao observado com os pacientes com HAM/TSP, sugerindo que o comprometimento das funções urinárias pode ser um estágio que antecede a mielopatia (SANTOS *et al*, 2012).

Citocinas como IFN- γ e TNF são reconhecidas por aumentar a produção de quimiocinas pró-inflamatórias (GUERREIRO *et. al*, 2011). No nosso grupo foi demonstrado em estudos que mostraram que estas citocinas correlacionavam-se positivamente com a produção de CXCL9 e CXCL10 no soro de indivíduos infectados pelo HTLV-1 (GUERREIRO *et. al*, 2006) e que estas moléculas também estavam aumentadas no soro dos pacientes com HAM/TSP quando comparados com portadores assintomáticos e indivíduos infectados com bexiga hiperativa - BH-HTLV (SANTOS *et. al*, 2012).

Assim como demonstrado nos estudos de Guerreiro *et. al* (2006) e Santos *et. al* (2012), confirmamos que as quimiocinas CXCL9 e CXCL10 estavam aumentadas no soro de HAM/TSP, mas não diferiam entre os portadores assintomáticos e os BH-HTLV (Figura 8A, B). É possível que mecanismos de modulação da resposta imune, ainda presentes nos portadores assintomáticos e nos BH-HTLV controlem a produção destas moléculas e dificultem a entrada de linfócitos ativados para o SNC, retardando o aparecimento da mielopatia (SANTOS *et. al*, 2006). Para verificar a participação das quimiocinas na migração das células infectadas para o SNC, Ando *et. al* (2013) quantificaram células no líquido de pacientes com HAM/TSP e constataram que a presença de CMSP correlacionava-se positivamente com a produção de CXCL9 e principalmente CXCL10, encontrado em altas concentrações tanto no soro quanto no líquido dos pacientes com HAM/TSP. Estes autores demonstram que os astrócitos eram as principais fontes produtoras de CXCL10 e que produziam esta quimiocina em resposta, principalmente, à produção espontânea de IFN- γ (ANDO *et. al*, 2013). É sabido que em resposta às infecções virais o aumento da produção de IFN- γ e CXCL10 são considerados eventos normais, entretanto na infecção pelo HTLV-1, a amplificação desta alça pode aumentar o recrutamento de células infectadas para os locais de inflamação e levar a destruição tecidual, contribuindo assim para a patogênese da HAM/TSP.

Citocinas pró-inflamatórias também são importantes para aumentar a expressão de moléculas de adesão e permitir que estas moléculas participem do recrutamento de células infectadas para os locais da inflamação (WITKOWSKA & BORAWSKA, 2004; SELLER, 2001). Durante as doenças inflamatórias do SNC a liberação de citocinas como IFN- γ , TNF e IL-1 α ativam as células do endotélio cerebral e aumentam a expressão de moléculas de adesão que facilitam o contato com linfócitos, permitindo que linfócitos ativados entrem no SNC (CANNELA *et. al*, 1995). Moléculas de adesão podem ser facilmente liberadas das membranas das células endoteliais e serem detectadas tanto no soro quanto no líquido. A detecção de moléculas de adesão solúveis sempre levanta a questão se a concentração destas moléculas circulante reflete na quantidade de molécula que está ligada a membrana da superfície celular (SHARIEF *et. al*. 1993). Entretanto vários estudos tem mostrado concentrações elevadas de sICAM-1 e sVCAM-1 no soro e líquido de várias condições inflamatórias (RIECKMANN *et. al*, 1997; UZAWA *et. al*, 2011; SEKI *et. al*, 2000).

Soros de pacientes com esclerose múltipla ativa apresentaram altas concentrações de sICAM-1 quando comparado com esclerose múltipla estável. A produção desta molécula de adesão correlacionou-se também com a concentração de TNF e com o grau de

comprometimento da BHE (**SHARIEF et. al. 1993**). Produção aumentada de sVCAM-1 no soro de pacientes com esclerose múltipla e HAM/TSP também foi demonstrada, quando comparados com indivíduos saudáveis (**MATSUDA et. al.1995**). No nosso estudo não encontramos diferenças na produção de sICAM-1 e sVCAM-1 tanto no soro quanto no líquido dos diferentes grupos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 (Figura 9). Observamos uma tendência de maior concentração destas moléculas no soro e líquido dos pacientes com HAM/TSP quando comparados aos outros grupos, porém sem diferença estatística. Interessante foi o encontro de concentrações séricas de sICAM-1, significativamente menores do que os valores de referência, fornecidos pelo kit, embora a maioria dos portadores de HTLV-1 apresentem valores de sICAM-1 entre os valores de referência máximo e mínimo (Figura 9A) . Por outro lado, e apesar da ausência de diferença estatística entre os grupos, os valores de sVCAM-1 no soro dos mesmos pacientes foram bem superiores ao valor de referência, fornecido pelo kit (Figura 9B). Estes resultados estão em concordância com os achados de Seki *et. al* (2000) que ao comparar a produção de sVCAM-1 no soro de portadores assintomáticos do HTLV-1 com controles saudáveis observou uma concentração significativamente maior desta molécula no soro dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 quando comparados com controles sadios (**SEKI et. al, 2000**).

Uma limitação do nosso estudo foi a quantificação destas moléculas no líquido de um pequeno número de indivíduos infectados pelo HTLV-1. A concentração de sICAM-1 e sVCAM-1 no líquido dos BH-HTLV e HAM/TSP não diferiu entre estes grupos, apesar dos pacientes com HAM/TSP apresentarem uma discreta tendência de maior produção destas moléculas solúveis. Poucos estudos demonstraram a presença de moléculas de adesão solúveis no líquido de pacientes com desordens neurológicas como encefalite viral, esclerose múltipla e neurite óptica (**HARTUNG et. al, 1993; SHARIEF et. al, 1993; RIECKMANN et. al, 1997; UZAWA et. al, 2011**). Nosso estudo é um dos primeiros a verificar a presença destas moléculas no líquido de indivíduos infectados pelo HTLV-1 (Figura 9C,D).

Ao recrutar células para o local da infecção, as quimiocinas estimulam a produção de citocinas que são capazes de ativar a expressão de moléculas de adesão (**ESCHE et. al, 2005, OLIVEIRA et. al, 2007**). Constatamos que houve correlação entre sVCAM-1 e as quimiocinas CXCL9 e CXCL10 detectadas no soro dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 (Figura 10 A,B). Adicionalmente quando analisamos a correlação das moléculas de adesão presentes no líquido dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 verificamos que sICAM-1 e sVCAM-1 correlacionava-se positivamente somente com a produção de CXCL9 (Figura 10 C,D). Embora

não conclusivos estes dados podem indicar a participação destas moléculas na patogênese da HAM/TSP.

Estudos têm demonstrado que células infectadas pelo HTLV-1, atraídas para o SNC pela ligação das quimiocinas com os seus respectivos receptores e auxiliadas pelo contato das integrinas, com suas respectivas moléculas de adesão, ultrapassam a barreira hematoencefálica causando intensa inflamação e destruição tecidual (**OSAME *et. al*, 2002; NAGAI *et. al*, 2003; ESCHE *et. al* 2005; AFONSO *et. al*, 2008**). Assim, para verificar a frequência com que as células dos diferentes grupos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 expressavam ligantes das moléculas de adesão (CD11a e CD49d) e o receptor das quimiocinas CXCL9 e CXCL10 (CXCR3), analisamos a frequência dos linfócitos e monócitos no sangue periférico dos grupos controle e de indivíduos infectados pelo HTLV-1.

As populações celulares analisadas não diferiram entre os indivíduos infectados pelo HTLV-1 e os controles de forma que a expressão destas moléculas pode ser comparada (Tabela 2). Verificamos que a frequência das células CD4⁺, CD8⁺ e CD14⁺ co-expressando CD11a e CD49d foi similar entre os controles e os indivíduos infectados pelo HTLV-1, sugerindo que a expressão destas moléculas é constitutiva nestas populações celulares. Quando analisamos a mediana de intensidade de fluorescência (MIF) de CD11a nas células CD4⁺, CD8⁺ e CD14⁺ encontramos uma menor expressão desta molécula nas células dos pacientes com HAM/TSP quando comparados aos outros grupos (Figura 11A,B,C). Não observamos diferenças na expressão de CD49d nos linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ dos diferentes grupos avaliados (Figura 11D,E), entretanto monócitos e linfócitos T CD8⁺ dos pacientes com HAM/TSP apresentaram uma menor expressão desta molécula (Figura 11F). Estes dados discordam dos achados de AL-FAHIM *et. al* (1999) que descreve uma menor frequência de células CD4⁺ e CD8⁺ co-expressando CD49d em controles do que em portadores assintomáticos e pacientes com HAM/TSP (**AL-FAHIM *et. al*, 1999**). Embora interessante, os dados do nosso estudo, analisando a expressão destas moléculas na superfície de diferentes populações celulares, não foram realizados utilizando todos os marcadores necessários para diferenciar as populações celulares, de forma que não é possível chegar a uma conclusão sobre a participação destas moléculas de adesão na patogênese da infecção pelo HTLV-1.

Quimiocinas pró-inflamatórias estão elevadas no soro e líquido de indivíduos infectados pelo HTLV-1, principalmente na HAM/TSP (**GUERREIRO *et. al*, 2006; ANDO *et. al*, 2013**). Para ratificar a participação destas moléculas na patogênese da infecção pelo HTLV-1, analisamos a expressão do receptor de quimiocinas pró-inflamatórias (CXCL9 e CXCL10) na superfície de células CD4⁺, CD8⁺ e CD14⁺ de diferentes grupos de indivíduos infectados pelo

HTLV-1. No nosso estudo observamos uma flutuação na expressão de CXCR3 sobre as células CD4⁺, CD8⁺ e CD14⁺. A MIF das células CD4⁺, CD8⁺ e CD14⁺ expressando este receptor mostram uma tendência de menor expressão desta molécula nas células dos pacientes com HAM/TSP, quando comparados com controles, portadores assintomáticos e BH-HTLV (Figura 12).

Ando *et. al* (2013) investigaram o recrutamento de linfócitos infectados pelo HTLV-1 para o SNC pela expressão de CXCR3 na superfície de células do líquido e células do sangue periférico de indivíduos infectados pelo HTLV-1. Os autores encontraram que linfócitos no líquido dos pacientes com HAM/TSP apresentam uma frequência mais elevada de CXCR3 (92,4%) do que linfócitos do sangue periférico de pacientes com HAM/TSP (9,9%) (ANDO *et. al*, 2013). No nosso estudo observamos uma flutuação na expressão de CXCR3 nas células CD4⁺, CD8⁺ e CD14⁺ e uma menor expressão de CXCR3 nas células do sangue periférico dos pacientes com HAM/TSP, quando comparados com os controles, portadores assintomáticos e BH-HTLV. O encontro de uma menor frequência de células expressando este receptor no sangue periférico pode refletir uma maior migração destas células para o sítio inflamatório. Apesar do pequeno número de pacientes avaliados e da ausência de avaliação da expressão deste receptor nas células do líquido de indivíduos infectados pelo HTLV-1, os dados apresentados, obtidos com as células do sangue periférico, confirmam os achados de Ando *et. al* (2013).

Os resultados apresentados em nosso estudo mostram que quimiocinas pró-inflamatórias e possivelmente a molécula de adesão VCAM-1 estão aumentadas tanto no soro quanto no líquido de pacientes com HAM/TSP. O aumento na produção destas moléculas, associado à diminuição da expressão de ligantes de moléculas de adesão e receptor de quimiocinas na célula do sangue periférico, dá suporte a hipótese de que migração de células infectadas para o SNC resulta em um processo inflamatório crônico que está envolvido na patogênese da infecção pelo HTLV-1.

7 SUMÁRIO DOS RESULTADOS

- Pacientes com HAM/TSP apresentaram produção espontânea elevada de citocinas pró-inflamatórias (TNF e IFN- γ) e maior carga proviral, quando comparados com os outros grupos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 (portador assintomático e BH-HTLV).
- A maior produção de quimiocinas pró-inflamatórias (CXCL9 e CXCL10) foi encontrada tanto no soro quanto no liquor dos pacientes com HAM/TSP.
- A produção de sICAM-1 no soro dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 ficou abaixo dos valores de referência e não diferenciou os grupos de indivíduos infectados.
- A produção de sVCAM-1 no soro dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 ficou acima dos valores de referência. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos, porém, observou-se uma tendência de maior produção desta molécula no soro dos pacientes com HAM/TSP.
- A produção de sICAM-1 e sVCAM-1 no líquido não diferiu entre os BH-HTLV e os HAM/TSP porém, observou-se uma tendência de maior produção destas moléculas nos pacientes com HAM/TSP.
- Foi encontrada uma correlação positiva entre sVCAM-1 e as quimiocinas séricas (CXCL9 e CXCL10) quando os grupos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 foram analisados em conjunto.
- Foi observado uma correlação positiva entre as moléculas de adesão (sICAM-1 e sVCAM-1) no líquido e CXCL9 quando os indivíduos infectados pelo HTLV-1 foram analisados em conjunto.
- A mediana de intensidade de fluorescência (MIF) das células CD4⁺, CD8⁺ e CD14⁺ expressando CD11a foi menor nos pacientes com HAM/TSP.
- Não foi observada diferença na expressão de CD49d nas células dos diferentes grupos de indivíduos infectados.
- Uma menor frequência de células CD4⁺ e CD8⁺ expressando CXCR3 e tendência de menor expressão deste receptor nos três tipos celulares estudados foi observado na HAM/TSP.

8 CONCLUSÃO GERAL

Os dados apresentados neste estudo dão suporte à participação das quimiocinas na patogênese da HAM/TSP, mas não são suficientes para confirmar participação das moléculas de adesão neste processo, apesar do aumento destas moléculas no líquido. A menor expressão de CD11a e CXCR3 pelas células CD4⁺, CD8⁺ e CD14⁺ no sangue periférico podem estar relacionados à quimioatração destas células para o SNC e consequente processo inflamatório crônico.

9 REFERÊNCIAS

ABBAS & LICHTMAN *Imunologia Básica* – 2ª edição – Ed Elsevier. Rio de Janeiro. 2007. 247 p

ADAMS & SHAW . Leucocyte-endothelial interactions and regulation of leucocyte migration. *Lancet*. 1994;343(8901):831-6

AFONSO et al. Alteration of blood-brain barrier integrity by retroviral infection. *PLoS pathogens*. 2008;4(11):e1000205

AFONSO et al. Human blood-brain barrier disruption by retroviral-infected lymphocytes: role of myosin light chain kinase in endothelial tight-junction disorganization. *Journal of immunology*. 2007;179(4):2576-83

AL-FAHIM et al.. Blood mononuclear cells in patients with HTLV-I-associated myelopathy: lymphocytes are highly activated and adhesion to endothelial cells is increased. *Cellular immunology*. 1999;198(1):1-10.

ANDO et al. Positive feedback loop via astrocytes causes chronic inflammation in virus-associated myelopathy. *Brain : a journal of neurology*. 2013;136(Pt 9):2876-87.

ARAUJO et al. HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in Brazil: a nationwide survey. HAM/TSP Brazilian Study Group. *Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology : official publication of the International Retrovirology Association*. 1998;19(5):536-41

ARAUJO HTLV-1 neurological complex. *The Lancet Neurology*. 2006;5(12):1068-76.

AZIMI et al.. How does interleukin 15 contribute to the pathogenesis of HTLV type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis? *AIDS research and human retroviruses*. 2000;16(16):1717-22.

BANGHAM . HTLV-1 infection: role of CTL efficiency. *Blood*. 2008;112(6):2176-7.

BANGHAM. CTL quality and the control of human retroviral infections. *Eur J Immunol*. 2009;39(7):1700-12.

BANGHAM & OSAME. Cellular immune response to HTLV-1. *Oncogene*. 2005;24(39):6035-46.

BAUMGARTH & ROEDERER M. A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. *Journal of immunological methods*. 2000;243(1-2):77-97.

BRITES et al. Severe and Norwegian scabies are strongly associated with retroviral (HIV-1/HTLV-1) infection in Bahia, Brazil. *Aids*. 2002;16(9):1292-3.

BRITES et al. HIV/human T-cell lymphotropic virus coinfection revisited: impact on AIDS progression. *AIDS reviews*. 2009;11(1):8-16.

CANNELLA The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. *Annals of neurology*. 1995;37(4):424-35.

CARNEIRO-PROIETTI, et al. HTLV in the Americas: challenges and perspectives. *Revista panamericana de salud publica = Pan American journal of public health*. 2006;19(1):44-53.

CARNEIRO-PROIETTI, et al. [Infection and disease caused by the human T cell lymphotropic viruses type I and II in Brazil]. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2002;35(5):499-508.

CARVALHO et al.. Cytokine profile and immunomodulation in asymptomatic human T-lymphotropic virus type 1-infected blood donors. *Journal of acquired immune deficiency syndromes*. 2001;27(1):1-6.

CASKEY et al. Clinical manifestations associated with HTLV type I infection: a cross-sectional study. *AIDS research and human retroviruses*. 2007;23(3):365-71.

CASTRO et al.. HTLV-I associated myelopathy in Brazil: a preliminary report. *Arquivos de neuro-psiquiatria*. 1989;47(4):501-2.

CASTRO et al.. Urodynamic features of the voiding dysfunction in HTLV-1 infected individuals. *International braz j urol : official journal of the Brazilian Society of Urology*. 2007;33(2):238-44; discussion 44-5.

CATALAN-SOARES 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. *Cadernos de saude publica*. 2005;21(3):926-31.

CATALAN-SOARES e PROIETTI. HTLV-1 e 2: Aspectos epidemiológicos. In: Carneiro Proietti. *Cadernos Hemominas* ;4. ed Minas Gerais v. XIII. 2006 p69-85

DE CASTRO-COSTA et al. Proposal for diagnostic criteria of tropical spastic paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy (TSP/HAM). *AIDS research and human retroviruses*. 2006;22(10):931-5.

DOURADO et al. HTLV-I in the general population of Salvador, Brazil: a city with African ethnic and sociodemographic characteristics. *Journal of acquired immune deficiency syndromes*. 2003;34(5):527-31.

EDLICH et al.. Global epidemic of human T-cell lymphotropic virus type-I (HTLV-I). *The Journal of emergency medicine*. 2000;18(1):109-19.

ESCHE et al.. Chemokines: key players in innate and adaptive immunity. *The Journal of investigative dermatology*. 2005;125(4):615-28.

FIFE et al. CXCL10 (IFN-gamma-inducible protein-10) control of encephalitogenic CD4+ T cell accumulation in the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology*. 2001;166(12):7617-24.

FURUKAWA, et al. Different cytokine production in tax-expressing cells between patients with human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis and asymptomatic HTLV-I carriers. *The Journal of infectious diseases*. 2003;187(7):1116-25.

FURUKAWA et al.. Phylogenetic subgroups of human T cell lymphotropic virus (HTLV) type I in the tax gene and their association with different risks for HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *The Journal of infectious diseases*. 2000;182(5):1343-9.

GALVAO-CASTRO et al. Distribution of human T-lymphotropic virus type I among blood donors: a nationwide Brazilian study. *Transfusion*. 1997;37(2):242-3.

GESSAIN et al. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet*. 1985;2(8452):407-10.

GESSAIN & CASSAR Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. *Frontiers in microbiology*. 2012;3:388.

GOLIAS et al.. Review. Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules in inflammation focusing on inflammatory heart disease. *In vivo*. 2007;21(5):757-69.

GOON et al. High frequencies of Th1-type CD4(+) T cells specific to HTLV-1 Env and Tax proteins in patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Blood*. 2002;99(9):3335-41.

GOON 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. *Journal of virology*. 2003;77(17):9716-22.

GRASSI et al. Human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) proviral load of HTLV-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) patients according to new diagnostic criteria of HAM/TSP. *Journal of medical virology*. 2011;83(7):1269-74.

GUERREIRO 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. *Clinical and experimental immunology*. 2006;145(2):296-301.

GUERREIRO et al.. [The chemokines and their receptors: characteristics and physiological functions]. *Acta medica portuguesa*. 2011;24 Suppl 4:967-76.

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

HARTUNG et al.. Soluble ICAM-1 serum levels in multiple sclerosis and viral encephalitis. *Neurology*. 1993;43(11):2331-5.

HILDRETH et al.. Human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-induced syncytium formation mediated by vascular cell adhesion molecule-1: evidence for involvement of cell adhesion molecules in HTLV-1 biology. *Journal of virology*. 1997;71(2):1173-80.

JACOBSON. Immunopathogenesis of human T cell lymphotropic virus type I-associated neurologic disease. *The Journal of infectious diseases*. 2002;186 Suppl 2:S187-92.

JACOBSON et al. HTLV-I-specific cytotoxic T lymphocytes in the cerebrospinal fluid of patients with HTLV-I-associated neurological disease. *Annals of neurology*. 1992;32(5):651-7.

JEFFERY et al. HLA alleles determine human T-lymphotropic virus-I (HTLV-I) proviral load and the risk of HTLV-I-associated myelopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(7):3848-53.

KASHIMA et al. Distribution of human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) subtypes in Brazil: genetic characterization of LTR and tax region. *AIDS research and human retroviruses*. 2006;22(10):953-9.

KRAMER et al. Spontaneous lymphocyte proliferation in symptom-free HTLV-I positive Jamaicans. *Lancet*. 1989;2(8668):923-4.

KROON e PROIETTI. Vírus Linfotrópicos de Células T Humanas Tipos 1 e 2 (HTLV-1/2) – Histórico, Estrutura e Ciclo de Multiplicação Viral. In: Carneiro Proietti. *Cadernos Hemominas* ;4. ed Minas Gerais v. XIII. 2006 p11-20

LAGRENADE et al. Infective dermatitis of Jamaican children: a marker for HTLV-I infection. *Lancet*. 1990;336(8727):1345-7.

LEWCZUK et al.. Intercellular adhesion molecule-1 in cerebrospinal fluid--the evaluation of blood-derived and brain-derived fractions in neurological diseases. *Journal of neuroimmunology*. 1998;87(1-2):156-61.

LUSTER & RAVETCH . Biochemical characterization of a gamma interferon-inducible cytokine (IP-10). *The Journal of experimental medicine*. 1987;166(4):1084-97.

MACHADO et al. The role of human T cell lymphotropic virus type 1, hepatitis B virus and hepatitis C virus coinfections in leprosy. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2012;107 Suppl 1:43-8.

MARTINS e BRITO-MELO, Resposta imune na infecção pelo HTLV: ênfase em mecanismos pró e antiinflamatórios da HAM/TSP In: Carneiro Proietti. *Cadernos Hemominas* ;4. ed Minas Gerais v. XIII. 2006 p46-60

MARTINS-CASTRO et al. HTLV-I associated myelopathy in Brazil; a preliminary report. *Arq Neuropsiquiatr* 1989; 47: 501-502.

MARTINS e STANCIOLI, 2006 Patogênese da Infecção pelo HTLV In: Carneiro Proietti. *Cadernos Hemominas* ;4. ed Minas Gerais v. XIII. 2006 p21-60

MATSUDA et al. Increased levels of soluble vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in the cerebrospinal fluid and sera of patients with multiple sclerosis and human T lymphotropic virus type-1-associated myelopathy. *Journal of neuroimmunology*. 1995;59(1-2):35-40

MONTANHEIRO et al. High production of RANTES and MIP-1alpha in the tropical spastic paraparesis/HTLV-1-associated myelopathy (TSP/HAM). *Journal of neuroimmunology*. 2007;188(1-2):138-42.

MULLER et al. Review: The chemokine receptor CXCR3 and its ligands CXCL9, CXCL10 and CXCL11 in neuroimmunity--a tale of conflict and conundrum. *Neuropathology and applied neurobiology*. 2010;36(5):368-87.

NAGAI & OSAME M. Human T-cell lymphotropic virus type I and neurological diseases. *Journal of neurovirology*. 2003;9(2):228-35.

NAGAI et al.. CD8(+) T cells are an in vivo reservoir for human T-cell lymphotropic virus type I. *Blood*. 2001;98(6):1858-61.

NAGAI et al. 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. *Journal of neurovirology*. 1998;4(6):586-93.

NAKAMURA. HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP): the role of HTLV-I-infected Th1 cells in the pathogenesis, and therapeutic strategy. *Folia Neuropathol*. 2009;47(2):182-94.

NARIKAWA et al. CSF-chemokines in HTLV-I-associated myelopathy: CXCL10 up-regulation and therapeutic effect of interferon-alpha. *Journal of neuroimmunology*. 2005;159(1-2):177-82.

NISHIURA et al. Increased production of inflammatory cytokines in cultured CD4+ cells from patients with HTLV-I-associated myelopathy. *Tohoku J Exp Med*. 1996;179(4):227-33.

OLINDO et al. HTLV-1 proviral load in peripheral blood mononuclear cells quantified in 100 HAM/TSP patients: a marker of disease progression. *Journal of the neurological sciences*. 2005;237(1-2):53-9.

OLIVEIRA et al.. Infective dermatitis associated with the human T cell lymphotropic virus type I in Salvador, Bahia, Brazil. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2005;40(11):e90-6.

OLIVEIRA et al. Prevalence of erectile dysfunction in HTLV-1-infected patients and its association with overactive bladder. *Urology*. 2010;75(5):1100-3.

OLIVEIRA et al Involvement of chemokines and its receptors in the pathogenesis of infectious and inflammatory diseases *Biosaúde, Londrina*, v.9, n.1/2, p.41-64 2007

OSAME [HTLV-I-associated myelopathy (HAM)]. *Tanpakushitsu kakusan koso Protein, nucleic acid, enzyme*. 1990;35(7 Suppl):1320-6.

OSAME Pathological mechanisms of human T-cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy (HAM/TSP). *Journal of neurovirology*. 2002;8(5):359-64

OSAME et al. Blood transfusion and HTLV-I associated myelopathy. *Lancet*. 1986;2(8498):104-5.

PAIVA & CASSEB. Origin and prevalence of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and type 2 (HTLV-2) among indigenous populations in the Americas. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 2015;57(1):1-13.

POETKER, et al. Clinical manifestations in individuals with recent diagnosis of HTLV type I infection. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2011;51(1):54-8.

POIESZ et al.. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1980;77(12):7415-9.

PORTO et al. [Clinical and immunological consequences of the association between HTLV-1 and strongyloidiasis]. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2002;35(6):641-9.

PUCCIONI-SOHLER [Cerebrospinal fluid analysis and the pathogenesis of central nervous system infection by HTLV-I]. *Arquivos de neuro-psiquiatria*. 1997;55(1):144-8.

RAMANAN et al. Donor-transmitted HTLV-1-associated myelopathy in a kidney transplant recipient--case report and literature review. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2014;14(10):2417-21.

RIECKMANN et al. Soluble adhesion molecules (sVCAM-1 and sICAM-1) in cerebrospinal fluid and serum correlate with MRI activity in multiple sclerosis. *Annals of neurology*. 1997;41(3):326-33.

RODGERS-JOHNSON et al.. HTLV-I and HTLV-III antibodies and tropical spastic paraparesis. *Lancet*. 1985;2(8466):1247-8.

SAITO. Immunogenetics and the Pathological Mechanisms of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1- (HTLV-1-)Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP). *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*. 2010;2010:478461.

SANTOS et al. Immunological and viral features in patients with overactive bladder associated with human T-cell lymphotropic virus type 1 infection. *Journal of medical virology*. 2012;84(11):1809-17.

SANTOS et al. Exacerbated inflammatory cellular immune response characteristics of HAM/TSP is observed in a large proportion of HTLV-I asymptomatic carriers. *BMC infectious diseases*. 2004;4:7.

SANTOS et al. Modulation of T cell responses in HTLV-1 carriers and in patients with myelopathy associated with HTLV-1. *Neuroimmunomodulation*. 2006;13(3):145-51.

SANTOS & MENDONÇA LIMA. Epidemiology, physiopathogenesis and laboratorial diagnosis of the HTLV-I infectin. *Bras Patol Med Lab* v. 41 n. 2 p. 105-16 abril 2005

SATO et al. CSF CXCL10, CXCL9, and neopterin as candidate prognostic biomarkers for HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *PLoS neglected tropical diseases*. 2013;7(10):e2479.

SEKI et al. Elevated levels of soluble adhesion molecules in sera and BAL fluid of individuals infected with human T-cell lymphotropic virus type 1. *Chest*. 2000;118(6):1754-61.

SELLER, Cellular Adhesion and Adhesion Molecules *Turk J Biol* 25 (2001) 1-15

SHARIEF et al. Increased levels of circulating ICAM-1 in serum and cerebrospinal fluid of patients with active multiple sclerosis. Correlation with TNF-alpha and blood-brain barrier damage. *Journal of neuroimmunology*. 1993;43(1-2):15-21.

SHIMIZU et al.. Lymphocyte interactions with endothelial cells. *Immunology today*. 1992;13(3):106-12.

SOUZA-MACHADO *et. al*, *Immunopathogenesis of HTLV-1 infection: influence upon type 2 immune response* *Rev. bras. alerg. imunopatol.* – Vol. 26, Nº 4, 2003

TANAJURA et al. Neurological Manifestations in Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1)-Infected Individuals Without HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis: A Longitudinal Cohort Study. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2015;61(1):49-56.

TANAKA et al. Distinct CSF cytokine/chemokine profiles in atopic myelitis and other causes of myelitis. *Neurology*. 2008;71(13):974-81.

TEIXEIRA et al. Increased serum concentrations of monokine induced by interferon-gamma/CXCL9 and interferon-gamma-inducible protein 10/CXCL-10 in Sydenham's chorea patients. *Journal of neuroimmunology*. 2004;150(1-2):157-62.

TSUKADA et al.. Increased levels of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and tumor necrosis factor receptor in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Neurology*. 1993;43(12):2679-82.

UCHIYAMA Human T cell leukemia virus type I (HTLV-I) and human diseases. *Annual review of immunology*. 1997;15:15-37.

UMEHARA et al.. Expression of adhesion molecules and monocyte chemoattractant protein -1 (MCP-1) in the spinal cord lesions in HTLV-I-associated myelopathy. *Acta neuropathologica*. 1996;91(4):343-50.

UZAWA et al.. Markedly elevated soluble intercellular adhesion molecule 1, soluble vascular cell adhesion molecule 1 levels, and blood-brain barrier breakdown in neuromyelitis optica. *Archives of neurology*. 2011;68(7):913-7.

VALENTIN et al. Vascular cell adhesion molecule-1 induced by human T-cell leukaemia virus type 1 Tax protein in T-cells stimulates proliferation of human T-lymphocytes. *The Journal of general virology*. 2001;82(Pt 4):831-5.

VALOIS C. Estudo da expressão de moléculas de adesão celular durante a migração transendotelial dos leucócitos no pulmão de camundongos tratados com nanopartículas magnéticas recobertas com DMSA. Brasília 2006 Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) Coordenadoria de Pós-Graduação, Universidade de Brasília

VERDONCK et al. HTLV-1 infection is frequent among out-patients with pulmonary tuberculosis in northern Lima, Peru. *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*. 2007;11(10):1066-72.

VICENTE *et. al.* Epidemiologia Molecular do HTLV no Brasil. In: Carneiro Proietti. *Cadernos Hemominas* ;4. ed Minas Gerais v. XIII. 2006 p86-92

WEISS et al. The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochimica et biophysica acta*. 2009;1788(4):842-57.

WITKOWSKA & BORAWSKA. Soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1): an overview. *European cytokine network*. 2004;15(2):91-8.

YOSHIDA. Multiple viral strategies of HTLV-1 for dysregulation of cell growth control. *Annual review of immunology*. 2001;19:475-96.

ANEXO I

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Bahia - Plataforma Brasil

Saúde
Ministério da Saúde


Plataforma
Brasil


Pública Pesquisador Alterar Meus Dados

Silvane Maria Braga Santos - Pesquisador | V3.0
Sua sessão expira em: 32min 55

DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Identificação de marcadores biológicos associados com proteção e progressão de doenças associadas ao HTLV-1.
Pesquisador Responsável: Silvane Maria Braga Santos
Área Temática:
Versão: 2
CAAE: 46953414.4.0000.5577
Submetido em: 06/09/2015
Instituição Proponente: FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
Situação da Versão do Projeto: Aprovado
Localização atual da Versão do Projeto: Pesquisador Responsável
Patrocinador Principal: CONS NAC DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLÓGICO



Comprovante de Receção:  PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_367928

ANEXO II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de pesquisa: Identificação de marcadores biológicos associados com proteção e progressão de doenças associadas ao HTLV-1.

Investigador Principal: Silvane Maria Braga Santos.

Nº do Projeto: CAAE: 46953414.4.0000.5577

Convite e objetivo: Você é convidado a participar de um estudo que tem o objetivo de avaliar se células de indivíduos infectados pelo HTLV-1 produzem quantidades diferentes de proteínas inflamatórias. Estas proteínas são naturalmente produzidas pelo homem, mas na presença do vírus podem aumentar e estar associada, ou não, ao aparecimento de doenças. Em uma proporção muito pequena de pacientes (<5%), a infecção pelo HTLV-1 pode causar doenças graves como uma leucemia e uma mielopatia. Estas doenças ainda não tem cura e ainda é desconhecido por que somente alguns indivíduos desenvolvem estas doenças.

Participação Voluntária: Sua participação é totalmente voluntária, ou seja, você só participa se quiser. Você não terá despesas adicionais e nem será remunerado. A não participação no estudo não mudará seu acompanhamento médico. É importante esclarecer que, caso você decida não participar ou queira se retirar do estudo, seu atendimento clínico e laboratorial não será modificado.

Procedimentos: Para a realização deste estudo será necessário uma coleta de aproximadamente 20 mL de sangue. A coleta do sangue será feita com material estéril e descartável e realizada por profissional treinado.

Riscos: É possível que ocorra algum desconforto, como uma ligeira dor no local da picada, podendo ficar o braço com um pequeno hematoma (manha roxa) que desaparece em 1 ou 2 dias. Após a realização da coleta, a área de punção será pressionada por alguns minutos e uma bandagem será aplicada. Raramente é observado um processo inflamatório no local onde a coleta é feita, no entanto, todo cuidado será tomado para minimizar estes riscos. Apesar dos riscos serem mínimos, após coleta você ficará em observação por um pequeno período (5-10 minutos) e caso apresente algum desconforto (tonturas, palpitações, suor frio, palidez, pressão baixa, pulsação lenta, escurecimento de vista, etc.) será colocado em posição adequada até recuperação. Estamos confiantes que estes riscos são raros, mas caso ocorram poderemos intervir prontamente e tratar estas complicações de forma adequada.

Benefícios: Não existem benefícios diretos de sua participação neste estudo. Os resultados obtidos nesta pesquisa poderão auxiliar com informações que ajudarão a compreender melhor o envolvimento das células e das proteínas inflamatórias no desenvolvimento das doenças associadas ao HTLV-1. Como ainda não existe um tratamento específico para eliminar o vírus, a identificação destas células e moléculas possibilitará que, no futuro, novas estratégias terapêuticas sejam utilizadas para diminuir os danos causados pelo vírus. Como este é um estudo experimental, somente no final poderemos observar os benefícios.

Duração do estudo: A duração deste estudo é de 2 anos e durante este período você será solicitado a fazer apenas uma coleta de sangue.

Esclarecimentos: Durante seu acompanhamento no Ambulatório de HTLV uma equipe multidisciplinar composta por médicos de diversas especialidades (infecologia, neurologia, clínica, pneumologia, urologia e reumatologia), enfermeiros, fisioterapeutas, psicólogos e farmacêuticos, realizará as avaliações clínicas e laboratoriais. Você tem direito de tirar qualquer dúvida ou pedir qualquer outro esclarecimento sobre a natureza desta pesquisa. Para isso poderá entrar em contato comigo, com outro pesquisador do Serviço de Imunologia (SIM) ou com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Bahia (CEP-FMB - Praça XV de novembro, s/nº, Largo do Terreiro de Jesus, 40025-010. Salvador, Bahia, Brasil. Tel.: 71 - 3283-5564).

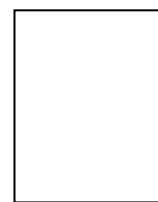
Confidencialidade: As informações obtidas neste estudo serão confidenciais e divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo. É assegurado o sigilo sobre sua participação.

Consentimento: Após ser utilizado nesta pesquisa, o material coletado (soro/plasma e células) ficará armazenado em um dos Biorrepositórios do Biobanco do SIM (em construção e na espera da aprovação pelo CEP). Não existe um prazo definido para armazenamento dessas amostras. Este material ficará sob minha responsabilidade e só será utilizado novamente após seu consentimento e aprovação do CEP-FMB. Caso haja perda ou destruição e suas amostras precisem ser descartadas, você também será informado. Você é livre para retirar seu consentimento e solicitar a devolução de suas amostras a qualquer momento, sem prejuízo ou penalização alguma ao seu acompanhamento.

Se você leu este consentimento informado ou este lhe foi explicado e você aceitar participar do estudo, favor assinar o nome abaixo. Você também receberá uma cópia deste termo para guardar.

Pesquisador responsável: Profa. Dra. Silvane Maria Braga Santos. Serviço de Imunologia (SIM), Complexo Hospitalar Professor Edgard Santos (COM-HUPES), Rua João das Botas S/N, 5º. Andar - Canela, 40110-160. Salvador, Bahia, Brasil. Tel.: (71) 3237-7353

Contato: Em qualquer etapa do estudo você poderá fazer o contato para esclarecimento de eventuais dúvidas nos seguintes telefones: 71 3237-7353, 71 3283-8392 (SIM-COM-HUPES) ou 3283-5564 (CEP-FMB).



Impressão digital

Assinatura do participante:

Data: __/__/__