



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



CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE CÉLULAS NK E NKT NA INFECÇÃO PELO HTLV-1

Camila Farias Amorim

Tese de Doutorado

Salvador (Bahia), 2017



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



CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE CÉLULAS NK E NKT NA INFECÇÃO PELO HTLV-1

Camila Farias Amorim

Professor-orientador: Professor Dr. Edgar M. Carvalho

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

Salvador (Bahia), 2017

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas da UFBA,
SIBI - UFBA

Amorim, Camila Farias
Caracterização fenotípica de células NK e NKT na
infecção pelo HTLV-1 / Camila Farias Amorim. --
Salvador, 2017.
79 f. : il

Orientador: Edgar M. Carvalho.
Tese (Doutorado - Programa de Pós-graduação em
Ciências da Saúde) -- Universidade Federal da
Bahia, Faculdade de Medicina da Bahia, 2017.

1. HTLV-1. 2. Células NK. 3. Células NKT. 4.
Citotoxicidade celular. 5. Resposta imune inata. I.
M. Carvalho, Edgar. II. Título.

COMISSÃO EXAMINADORA

Membros Titulares:

- Prof. Dra. Camila Indiani de Oliveira
Pesquisadora no Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/FIOCRUZ.

Professora no curso de pós-graduação em Patologia da FIOCRUZ, no curso de pós-graduação em Ciências da Saúde da UFBA, e na Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública da Fundação Bahiana para o Desenvolvimento das Ciências.

- Prof. Dra. Silvane Maria Braga Santos
Pesquisadora Associada do Serviço de Imunologia do Com-HUPES-UFBA no Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos da Universidade Federal da Bahia (Com-HUPES-UFBA).

Professora Adjunta da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS).

- Prof. Dr. Davi Tanajura Costa
Membro Titular da Academia Brasileira de Neurologia.

Professor auxiliar da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB).

- Prof. Dr. Olindo Assis Martins Filho
Pesquisador Titular da Fundação Oswaldo Cruz e Chefe do Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ-Minas.

Membro Suplente:

- Prof. Dr. Néviton Matos de Castro
Doutor em Medicina e Saúde pela Universidade Federal da Bahia.

Médico urologista no Hospital São Rafael e Hospital da Bahia.

Orientador:

- Prof. Dr. Edgar Marcelino de Carvalho Filho
Professor Titular da Universidade Federal da Bahia.
Pesquisador no Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/FIOCRUZ.

“O conhecimento é a única coisa que não podem tirar de você.”

Zália Maria Farias Amorim e Aurélio Farias

*Dedico este trabalho a minha família e amigos
por todo companheirismo e apoio durante o
processo.*

INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES

Instituições

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

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

EQUIPE

- M.e. Mariele Guerra Lemos da Silva, mestre pelo Programa de Pós-graduação em Imunologia e estudante de doutorado no Serviço de Imunologia.
- Maria de la Glória Orge, psicóloga do Ambulatório Multidisciplinar de HTLV-1.
- Dra. Natália Barbosa Carvalho, doutora em Imunologia pela Universidade Federal de Minas Gerais e estudante de Pós-doutorado no Serviço de Imunologia.
- Dra. Silvane Maria Braga Santos, doutora em Imunologia pela Universidade Federal da Bahia.

FONTES DE FINANCIAMENTO

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Doenças Tropicais (INCT-DT)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer ao meu orientador Professor Edgar Carvalho por me apresentar ao mundo da pesquisa científica, mundo este que pretendo continuar por toda minha carreira profissional. E simplesmente por me ensinar a PESQUISAR.

Ao Professor Lucas P. Carvalho, que me guiou com atenção nas questões metodológicas e análises de resultados.

À Professora Dra. Silvane Braga por ter me acompanhado desde o início e me orientado durante todo desenvolvimento do projeto. Obrigada pelas manhãs e tardes de companheirismo em que trabalhamos e nos divertimos.

À Natália Carvalho, Mariele Guerra e Pedro Paulo Carneiro por me ensinarem, me acompanharem em toda técnica desenvolvida neste trabalho desde os experimentos até as estatísticas com muita paciência e dedicação. Obrigada por serem excelentes companheiros de laboratório, e ótimas companhias nos momentos de estresse.

À minha amiga e conselheira Sara Passos que sempre esteve por perto quando precisei, para tirar dúvidas inesperadas, dar apoio, ensinar ou incentivar.

À meus pais Paulo e Zália, por me incentivarem desde criança a estudar, sempre garantindo para eu nunca esquecer que “conhecimento é a única coisa que nunca vão tirar de você”.

Aos meus amigos dos tempos da faculdade Danielle Pessôa e Pedro Costa por sempre estarem comigo, mesmo após a EBMSP e me apoiarem nos caminhos que escolhi.

À Hauana Pedrão por ser minha melhor amiga.

To my prince charming Nelson Glennie, who became this year the best friend/partner that I could never imagine.

ÍNDICE

Índice de tabelas	3
Índice de figuras	4
Lista de abreviaturas	5
Resumo	6
Objetivos	7
Hipótese	8
Introdução	9
Revisão da literatura	11
1. Aspectos gerais e epidemiológicos	11
2. Resposta imune associada ao HTLV-1	13
3. Resposta imune de linfócitos T CD8+ (LTC) na infecção pelo HTLV-1	15
4. Resposta imune de células NK e NKT na infecção pelo HTLV-1	17
5. Imunopatogênese da HAM/TSP	25
Casuística, material e métodos	30
1. População estudada	30
2. Obtenção de células mononucleares do sangue periférico	30
3. Dosagem de citocinas no sobrenadante de cultura de CMSP	31
4. Avaliação da frequência e do fenótipo de células NK e NKT por citometria de fluxo	31
5. Extração de DNA e carga proviral do HTLV-1	32
6. Desenho experimental	33
7. Análise estatística	34
Resultados gerais	35
1. Casuística	35
2. Caracterização das células NK e NKT na infecção pelo HTLV-1	37
3. Análise da frequência de células NK e NKT na infecção pelo HTLV-1	39
4. Análise da frequência de células NK expressando CD16 em indivíduos infectados pelo HTLV-1	41
5. Expressão de CD107a em células NK de indivíduos infectados pelo HTLV-	43

6. Expressão de NKG2D em células NK e linfócitos T CD8 de indivíduos infectados pelo HTLV-1	45
7. Correlação entre a expressão de NKG2D e CD107a em células linfóides de Células NK de indivíduos infectados pelo HTLV-1	48
Discussão	50
Sumário de resultados	54
Conclusão	55
Abstract	56
Referências bibliográficas	57
Anexos	68
ANEXO 1. Artigos publicados durante o período do mestrado e doutorado PPgCS	69
ANEXO 2. Manuscritos submetidos no ano de 2017	71
ANEXO 3. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	75
ANEXO 4. Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa	78

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Receptores de células NK humanas.	22
Tabela 2. Fatores genéticos do hospedeiro e do vírus que estão associados com risco para desenvolvimento da HAM/TSP.	26
Tabela 3. Dados demográficos, carga proviral e produção espontânea de IFN- γ e TNF em indivíduos infectados pelo HTLV-1 e controles saudáveis.	35
Tabela 4. Frequência de células NK e NKT em indivíduos infectados pelo HTLV-1 e controles saudáveis.	39
Tabela 5. Frequência de células NK e NKT expressando CD107 e MFI da expressão de CD107a por células NK de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e controles saudáveis.	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição geográfica dos principais focos da infecção pelo HTLV-1	12
Figura 2. Funções das células NK em Indivíduos Saudáveis.	18
Figura 3. Diferenças fenotípicas e funcionais entre células CD56bright e CD56dim.	20
Figura 4. Via de sinalização do NKG2D.	23
Figura 5. Hipótese da patogênese da HAM/TSP.	29
Figura 6. Esquema dos gates representativos para caracterização de células NK por citometria de fluxo.	37
Figura 7. Esquema dos gates representativos para caracterização de células NKT por citometria de fluxo.	38
Figura 8. Correlação entre a carga proviral e a frequência de células NK em indivíduos infectados pelo HTLV-1.	40
Figura 9. Frequência de células linfóides e células NK (CD56+ e CD56dim) expressando CD16 em indivíduos infectados pelo HTLV-1.	41
Figura 10. Estratégia de seleção para expressão de CD107a.	43
Figura 11. Frequência e MFI de células CD56+ e CD3+CD8+ expressando NKG2D em indivíduos infectados pelo HTLV-1 e controles sadios.	46
Figura 12. Correlação entre a frequência de células e MFI da expressão NKG2D e CD107a em indivíduos infectados pelo HTLV-1.	48

LISTA DE ABREVIATURAS

ADCC - Citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity.

APC – antigen-presenting cell (Célula apresentadora de antígeno)

ATL – Adult T-cell leukemia (Leucemia/linfoma de células T do adulto)

CMSP – Células mononucleares do sangue periférico

CSF – Líquido cefalorraquidiano, líquor

LTC – Linfócitos T CD8+ citotóxicos

DNA – Ácido desoxirribonucleico

GM-CSF - Granulocyte-macrophage colony-stimulating fator (Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos e Granulócitos)

HAM/TSP – HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (Mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical)

HBZ – HTLV-1 bZIP fator, HTLV-1 basic leucine zipper fator (fator básico em leucina do HTLV-1)

HTLV – Human T lymphotropic virus (Vírus linfotrópico de células T humanas)

IFN- γ – Interferon γ

MHC classe I e II – Major histocompatibility complex class I and II (Complexo de histocompatibilidade principal classe I e II)

MIF – Média de intensidade de fluorescência

RNA – Ácido ribonucleico

SNC – Sistema Nervoso Central

RESUMO

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE CÉLULAS NK E NKT NA INFECÇÃO PELO HTLV-1. Objetivos: A citotoxicidade desenvolvida por células T CD8⁺ é considerada o principal mecanismo de defesa contra o vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1 (HTLV-1). Assim como as células T CD8⁺, as células NK e NKT também são capazes de desgranular com a liberação de mediadores citotóxicos, tais como perforinas e granzimas. As células NK também medeiam a citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) contra as células infectadas, mas poucos estudos procuram compreender o papel das células NK e NKT na infecção pelo HTLV-1. O objetivo deste estudo foi avaliar a frequência de células NK, expressão de CD16, CD107a, NKG2D nessas células em portadores do HTLV-1, pacientes com mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP) e controles sadios e correlacionar os achados com a carga proviral e desenvolvimento para a HAM/TSP. **Métodos:** A caracterização fenotípica de células NK foi avaliada por citometria de fluxo. **Resultados:** As frequências de células CD56⁺, CD56⁺CD3⁻, CD56⁺CD16⁺ e CD56^{dim} estão diminuídas nos pacientes com HAM/TSP. Especificamente, a frequência de células NK foi inversamente correlacionada com a carga proviral em portadores do HTLV-1 mas não em pacientes com HAM/TSP. A frequência das células CD56⁺ e CD56^{dim} expressando CD16 também está diminuída em pacientes com HAM/TSP. Frequência de células NK expressando CD107a e a intensidade da expressão desta molécula foi maior em indivíduos infectados com HTLV-1 em comparação aos controles sadios, mas não foram observadas diferenças entre os grupos de portadores do HTLV-1 e pacientes com HAM/TSP. A expressão do receptor NKG2D não é alterada em células NK de pacientes HAM/TSP, mas sim em células T CD8⁺. A expressão de NKG2D está diretamente correlacionada com a expressão de CD107a. **Conclusões:** Os dados neste estudo indicam que a desgranulação de células NK e NKT, assim como expressão de receptores CD16 e NKG2D estão preservados. Contudo, a diminuição da frequência destas células desempenhando funções citotóxicas no sangue periférico de pacientes com HAM/TSP em combate ao vírus podem estar associadas com o aumento da carga proviral e progressão para a doença.

Palavras-chave: 1. HTLV-1; 2. Células NK; 3. Citotoxicidade celular; 4. Resposta imune inata

OBJETIVOS

Geral

Caracterizar fenotipicamente células NK e NKT na infecção pelo HTLV-1.

Específicos

- Avaliar a frequência de células NK e NKT em indivíduos infectados pelo HTLV-1 (portadores do HTLV-1 e pacientes com mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical - HAM/TSP) e controles saudáveis.
- Avaliar a expressão de CD16, CD107a e NKG2D em células NK e NKT de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e controles saudáveis.
- Correlacionar os achados imunológicos com a carga proviral e desenvolvimento da HAM/TSP.

HIPÓTESE

As células NK participam dos mecanismos de defesa na infecção pelo HTLV-1 e alterações na frequência e função destas células podem contribuir para o aumento da carga proviral e desenvolvimento da HAM/TSP.

INTRODUÇÃO

O vírus linfotrópico de células T humanas 1 (HTLV-1) infecta aproximadamente 5-10 milhões de indivíduos em todo mundo. Apesar da maioria destes indivíduos permanecerem assintomáticos durante toda a vida, uma pequena porcentagem (cerca de 5%) pode desenvolver uma doença degenerativa neurológica grave ou uma doença linfoproliferativa. Uma importante doença associada ao HTLV-1 é a mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP). A HAM/TSP é caracterizada pela destruição do tecido nervoso na medula espinhal, levando ao desenvolvimento de uma paraparesia espástica e incapacidade de deambulação dos pacientes. A HAM/TSP é bem descrita na literatura, contudo os eventos imunológicos que levam ao desenvolvimento desta patologia ainda não foram completamente elucidados.

O HTLV-1 infecta principalmente linfócitos T CD4+ e T CD8+. Apesar de outros tipos celulares também serem infectados pelo vírus, já se sabe que estas são as principais células participantes do controle da infecção. Desempenhando papéis importantes na resposta imune adaptativa, os linfócitos T CD4+ auxiliares produzem citocinas que estimulam a diferenciação de linfócitos T CD8+ em linfócitos T CD8+ citotóxicos efetores (LTC). Os linfócitos T CD4+ também estimulam através de moléculas coestimuladoras a ativação das células apresentadoras de antígenos (APCs). Entretanto, são as LTC as principais células consideradas responsáveis pela defesa do hospedeiro contra o HTLV-1. Ao reconhecerem os peptídeos virais, expressos pela molécula MHC classe I nas APCs (principalmente células dendríticas e monócitos/macrófagos), os LTC produzem mediadores citotóxicos capazes de desencadear sinalização que resultarão na apoptose das células infectadas.

O papel dos LTC no desenvolvimento da HAM/TSP ainda não foi completamente esclarecido. Alguns estudos defendem a hipótese de que a eficiência dos LTC controla a carga proviral e a expressão de proteínas virais nas células infectadas, reduzindo a chance de desenvolvimento da HAM/TSP. Outros estudos mostram que frequências elevadas de LTC específicos para o HTLV-1 observados no sangue periférico e líquido cefalorraquidiano (CSF) de pacientes com HAM/TSP são importantes fontes produtoras de concentrações exacerbadas de mediadores pró inflamatórios que são os responsáveis pelo dano neurológico tecidual observado no sistema nervoso central (SNC) dos pacientes com HAM/TSP. Segundo estes estudos, a função protetora dessas células depende de fatores específicos do hospedeiro

como a eficiência lítica, a qualidade e grau de avidéz de ligação entre os LTC e a célula infectada, assim como dos mecanismos de escape desenvolvidos pelo vírus.

Além dos LTC, as células *Natural Killers* (NK) também são células citotóxicas. Estas células participam da resposta imune inata e apresentam funções importantes no controle da replicação viral. Células NK assim como os LTC podem produzir mediadores inflamatórios e citotóxicos, além de serem células efetoras da citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC). Apesar disso, poucos estudos têm avaliado o papel destas células na infecção pelo HTLV-1.

No presente estudo, foi observado que a frequência de células NK está diminuída na HAM/TSP e que esta diminuição correlacionou-se inversamente com a carga proviral em portadores do HTLV-1 mas não em pacientes com HAM/TSP. A frequência de células NK CD56+ e CD56dim expressando CD16 também estava diminuída na HAM/TSP. Células NK e NKT de indivíduos infectados pelo HTLV-1 (portadores do HTLV-1 e pacientes com HAM/TSP) apresentaram uma maior intensidade de desgranulação quando comparados aos controles sadios, porém não foram observadas diferenças entre os grupos de indivíduos infectados pelo HTLV-1. A expressão de NKG2D estava preservada nas células NK de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e correlacionou-se diretamente com a desgranulação em células linfóides em geral e células NK.

A diminuição da frequência de células NK em pacientes com HAM/TSP e a documentação de uma correlação inversa entre a frequência dessas células e a carga proviral em portadores do HTLV-1 indicam que a citotoxicidade mediada por células NK pode ser um mecanismo importante no controle da carga proviral e da progressão do status de portador do vírus para HAM/TSP.

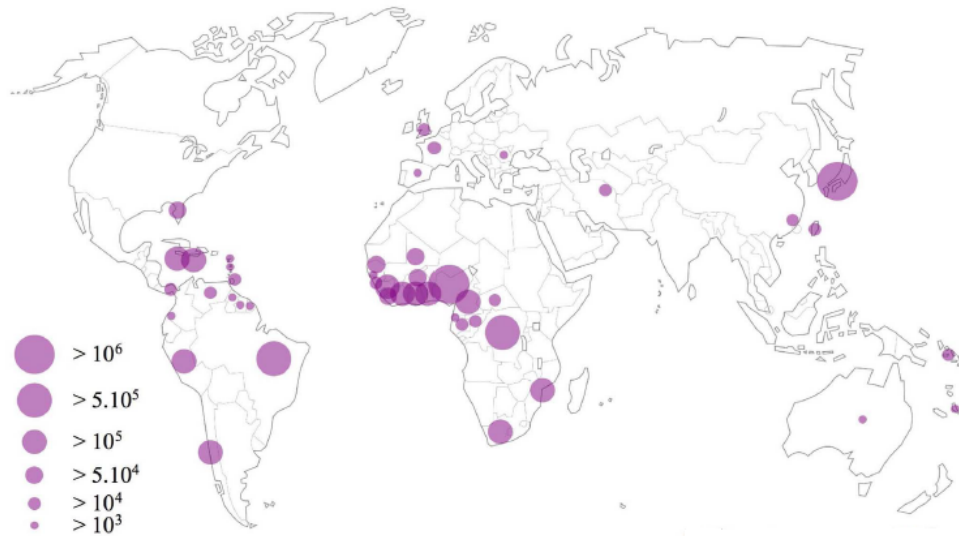
REVISÃO DA LITERATURA

1. ASPECTOS GERAIS E EPIDEMIOLÓGICOS

O vírus linfotrópico de células T humanas 1 (HTLV-1) foi o primeiro retrovírus humano descrito na literatura. Pertence à família *Retroviridae*, à subfamília *Orthoretrovirinae* e ao gênero *Deltaretrovirus* (Poiesz, Ruscetti et al. 1980, Hinuma, Nagata et al. 1981). O HTLV-1 foi primariamente isolado de um paciente com linfoma cutâneo de células T do adulto no Japão e após seu isolamento, passou a ser associado a manifestações clínicas, inicialmente no Japão, e poucos anos depois em outros países do mundo, como por exemplo, na Jamaica e Índia. A leucemia de células T do adulto (ATL), a mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP) e a dermatite infecciosa foram as primeiras doenças a serem associadas a este retrovírus (Uchiyama, Yodoi et al. 1977, LaGrenade, Hanchard et al. 1990, Nagai and Osame 2002). Polimiosite, síndrome seca, disfunção erétil e/ou bexiga hiperativa, artropatia associada ao HTLV-1 e outras manifestações neurológicas também estão associadas as HTLV-1 (Nagai and Osame 2003, Castro, Oliveira et al. 2005, Caskey, Morgan et al. 2007, Giozza, Santos et al. 2008, Castro-Lima Vargens, Grassi et al. 2011, Costa, Santos et al. 2012, Souza, Tanajura et al. 2012).

O HTLV-1 infecta aproximadamente de 10 milhões de pessoas em todo mundo (Gessain and Cassar 2012), sendo endêmico principalmente na África do Sul, Namíbia, Nigéria, Argentina, Brasil, Chile, Colômbia, Peru, Venezuela, regiões caribenhas, Japão e Oriente Médio (Proietti, Carneiro-Proietti et al. 2005). A Figura 1 mostra a prevalência da infecção pelo HTLV-1 no mundo.

Figura 1. Distribuição geográfica dos principais focos da infecção pelo HTLV-1.



(Gessain and Cassar 2012)

Estudo epidemiológico amplo realizado por Gessain & Cassar em 2012 considerando a população total de aproximadamente 200 milhões, estimou-se de que 300 a 800 mil indivíduos estariam infectados pelo HTLV-1 no Brasil (Gessain and Cassar 2012). Em Salvador, 1,8% da população geral é soropositiva para o HTLV-1, e a incidência da infecção é maior em mulheres, com razão de 2% contra 1,2% para homens. A prevalência da infecção aumenta em indivíduos com idades acima de 51 anos (8,4%) e também é maior entre indivíduos com baixa renda familiar, com menor grau de escolaridade e que convivem em piores condições de moradia. Desta forma estima-se que 40.000 indivíduos estejam infectados pelo HTLV-1 em Salvador (Dourado, Alcantara et al. 2003). O vírus é transmitido de três maneiras: a) sexual, sendo mais eficiente do homem para a mulher (Kaplan, Khabbaz et al. 1996); b) sanguínea, pela transmissão de células infectadas de indivíduo ao outro, como exemplo por transfusão de sangue ou uso de agulhas e/ou seringas contaminadas (Tedder, Shanson et al. 1984, Paiva and Casseb 2014); e c) vertical, onde o vírus é transmitido da mãe para o filho principalmente pelo aleitamento materno. Já se sabe que o leite materno de mães infectadas pelo HTLV-1 possui tanto antígenos virais quanto anticorpos específicos contra o vírus (Kinoshita, Hino et al. 1984, Matsubara, Haraguchi et al. 2012), e que a carga proviral no leite materno é correlacionada com o aumento da probabilidade de transmissão para a criança (Li, Biggar et al. 2004).

2. RESPOSTA IMUNE ASSOCIADA AO HTLV-1

A resposta imune contra o HTLV-1 é semelhante à observada contra outros retrovírus. Tanto a resposta humoral como a resposta celular (inata e adaptativa) estão envolvidas no processo de defesa contra esta infecção crônica.

No período de infecção inicial, linfócitos B ativados (plasmócitos) reconhecem proteínas antigênicas virais circulantes e conseqüentemente passam a produzir anticorpos específicos capazes de neutralizar estes antígenos. Nos primeiros dois meses de infecção, os anticorpos são específicos contra proteínas codificadas pelo gene *gag*, que compõem o capsídeo, nucleocapsídeo e matriz membranar do vírus (Chen, Gomez-Lucia et al. 1990, Dekaban, King et al. 1994). A seguir, os anticorpos passam a ser mais específicos contra proteínas codificadas pelo gene *env*, que formam o envelope viral e só após vários meses de infecção, os anticorpos passam a ser específicos para genes codificados na região pX que dá origem as proteínas responsáveis por modificar a resposta imune do hospedeiro e pelas doenças associadas ao HTLV-1, como por exemplo a proteína Tax, HBZ, Rex e p12 (Chen, Gomez-Lucia et al. 1990, Dekaban, King et al. 1994). A presença constante de LTC contra o HTLV-1 e anticorpos IgM anti-HTLV no sangue sustentam a ideia de que o vírus expressa e produz consistentemente proteínas por toda vida dos indivíduos infectados, caracterizando uma infecção crônica (Jacobson, Shida et al. 1990, Nagasato, Nakamura et al. 1991).

O HTLV-1 infecta principalmente linfócitos T CD4+, porém outras células também podem ser infectadas tanto *in vivo* quanto *in vitro* como, por exemplo, linfócitos T CD8+, linfócitos B, células dendríticas, monócitos e macrófagos e células NK (Koralnik, Lemp et al. 1992, Macatonia, Cruickshank et al. 1992, de Revel, Mabondzo et al. 1993, Koyanagi, Itoyama et al. 1993, Manel, Battini et al. 2005). Em relação à resposta imune inata, células apresentadoras de antígenos (APC), como células dendríticas e monócitos/macrófagos, capturam antígenos virais circulantes e apresentam, via MHC classe II do gene HLA, principalmente aos linfócitos T CD8+, dando início à resposta imune adaptativa. Linfócitos T CD4+ após reconhecerem os antígenos apresentados pelas APCs tornam-se ativadas e passam a produzir em altas concentrações citocinas e quimiocinas próinflamatórias, como TNF, IFN- γ , IL-2, IL-12, IL-6, CXCL9, CXCL10 que acabam por estimular praticamente todas as outras células do sistema imune tornando-as superativadas e com perfil inflamatório. Em geral, uma das principais características observadas nos indivíduos infectados pelo HTLV-1 é a ativação

de células do sistema imune, principalmente células T, com exagerada produção e secreção de mediadores inflamatórios relacionados com a resposta Th1, principalmente entre os pacientes com HAM/TSP (Itoyama, Minato et al. 1988, Santos, Porto et al. 2004). Na realidade, de maneira interessante em estudo recente utilizando-se ferramentas de bioestatística para avaliar biomarcadores sorológicos na comparação entre grupos de pacientes, mostrou-se que portadores assintomáticos apresentaram uma rede pró-inflamatória/reguladora fortemente associada com IL-4/IL-10 desempenhando papel central, enquanto os pacientes com HAM/TSP exibiram resposta imune global em direção a um perfil pró-inflamatório predominante (Starling, Coelho-Dos-Reis et al. 2015). Apoiando este dado, também foi observado que altas frequências de células T CD4+ e CD8+ produtoras de IL-10 estavam correlacionadas positivamente com a frequência de monócitos produtores de TNF apenas no grupo de portadores com HTLV-1, mas não entre pacientes com HAM/TSP. Isto indica que os portadores assintomáticos do HTLV-1 possuem ferramentas imunológicas regulatórias no controle à infecção pelo HTLV-1 que podem estar impedindo a progressão para a HAM/TSP (Brito-Melo, Peruhype-Magalhaes et al. 2007).

3. RESPOSTA IMUNE DE LINFÓCITOS T CD8+ (LTC) NA INFECÇÃO PELO HTLV-1

As principais células que irão desenvolver atividade direta contra as células infectadas são os linfócitos T CD8+ ativados, dos quais a maioria passa a adquirir perfil citotóxico (LTC) (Elovaara, Koenig et al. 1993, Daenke, Kermode et al. 1996). A citotoxicidade desenvolvida por estas células é feita predominantemente contra células expressando a proteína viral Tax, uma proteína codificada pelo gene Tax do HTLV-1 (Jacobson, Shida et al. 1990, Kannagi, Harada et al. 1991, Parker, Daenke et al. 1992, Hanon, Hall et al. 2000). As LTC contribuem para eliminação do vírus fundamentalmente por dois mecanismos: a) *produção de IFN- γ* e b) *produção de grânulos citotóxicos*. O IFN- γ produzido por LTC ativa principalmente APCs e induzem uma maior atividade inflamatória contra o vírus. Além do IFN- γ , os grânulos citotóxicos perforinas e granzimas são liberados das células citotóxicas envolvidos inicialmente por uma bicamada lipídica contendo glicoproteínas de membrana lisossomal (principalmente CD107a/LAMP-1), que se integram transitoriamente à membrana plasmática durante o processo de desgranulação. A fusão desta membrana com a membrana plasmática da célula-alvo libera esses grânulos na região da sinapse (Aktas, Kucuksezer et al. 2009). As granzimas induzem morte celular programada (apoptose) após invadirem o citoplasma das células-alvo através dos poros formados nas membranas celulares pelas perforinas. Sabe-se que camundongos knockout para perforinas são exageradamente imunodeficientes, pois não são capazes de eliminar e controlar vários tipos de infecções virais (Thiery, Keefe et al. 2011).

A resposta imune gerada por células citotóxicas contra o HTLV-1 é essencial no controle da carga proviral em indivíduos infectados pelo vírus, e a ausência ou insuficiência desta resposta pode ser determinante no desenvolvimento da HAM/TSP. Atualmente o papel protetor/prejudicial funcional das células citotóxicas na infecção pelo HTLV-1 ainda não está completamente estabelecido. Alguns grupos de pesquisa defendem a hipótese de que a eficiência de LTC controlaria a carga proviral e a expressão de Tax em células infectadas, reduzindo a chance de desenvolvimento da HAM/TSP (Jeffery, Usuku et al. 1999, Jeffery, Siddiqui et al. 2000, Bangham 2003, Vine, Heaps et al. 2004, Bangham and Osame 2005). Hanon E e cols. mostraram que a presença destas células em culturas de células mononucleares do sangue periférico diminui a frequência de células expressando Tax e que

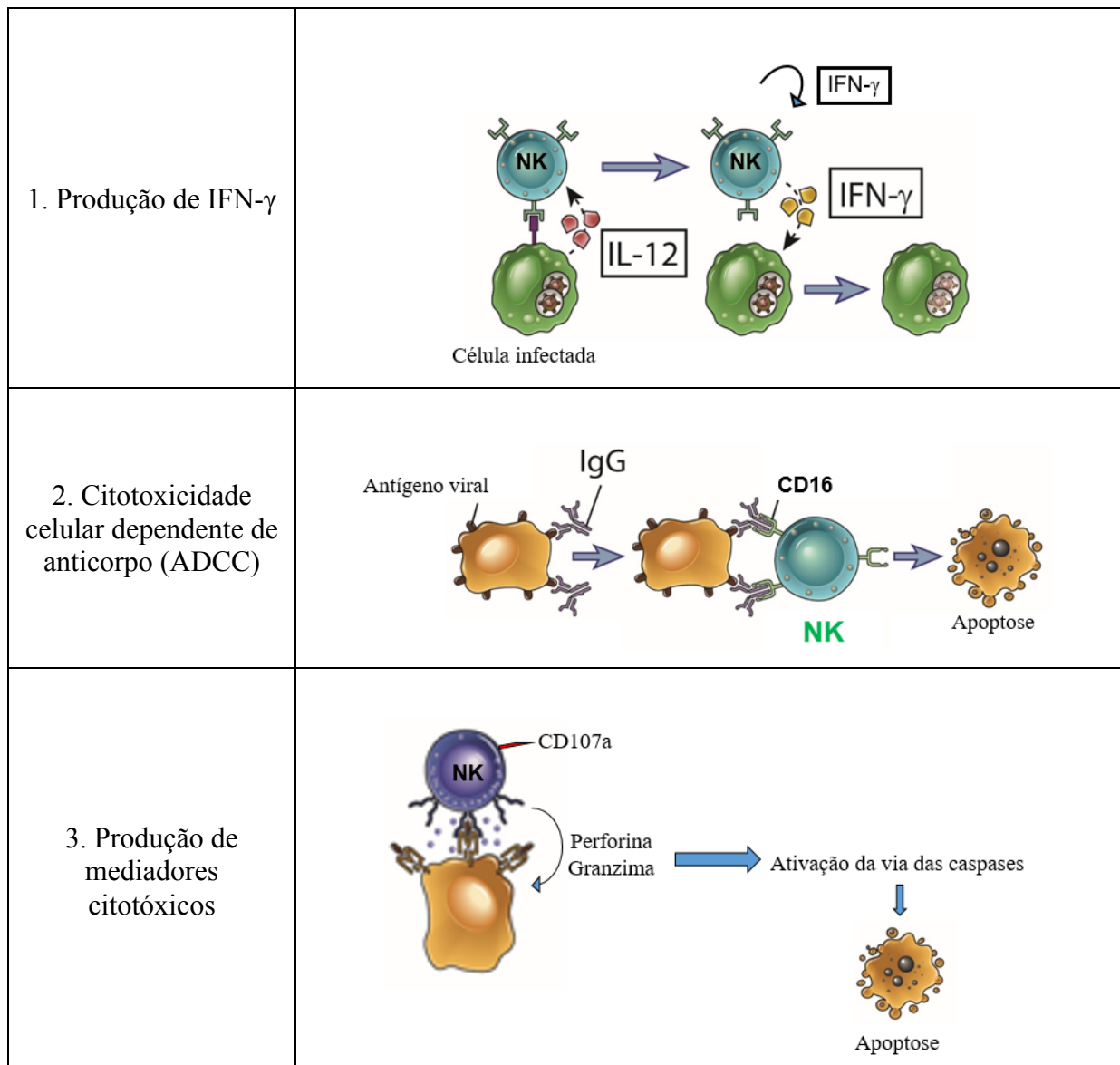
LTC matam células T CD4+ principalmente por mecanismos dependentes de perforina (Hanon, Hall et al. 2000). Outros grupos de pesquisa demonstraram que frequências elevadas de LTC específicas para Tax são observadas no sangue periférico e CSF de pacientes com HAM/TSP e que os linfócitos T CD8+ são importantes fontes produtoras de concentrações exacerbadas de citocinas e quimiocinas pró inflamatórias e MMP-9 nos pacientes HAM/TSP e podem ser as responsáveis pelo dano tecidual observado no SNC (Jacobson, Shida et al. 1990, Biddison, Kubota et al. 1997, Greten, Slansky et al. 1998, Kubota, Kawanishi et al. 1998, Nagai, Brennan et al. 2001, Jacobson 2002).

Além dessas duas vertentes de estudos indicando o papel protetor ou prejudicial dos linfócitos T CD8+, ainda há estudos que mostraram que a função destas células perante a infecção pelo HTLV-1 também inclui fatores como a eficiência lítica, qualidade e grau de avidéz de ligação entre a LTC e a célula infectada, dentre outros. Kattan T e cols. mostraram que a eficiência lítica da resposta de LTC (caracterizada pela fração de células autólogas expressando HTLV-1 eliminada por linfócitos T CD8+/por dia) é inversamente correlacionada com a carga proviral e com a razão da expressão espontânea do provírus. Adicionalmente, o grau de avidéz destas células estava correlacionado com a eficiência lítica (Kattan, MacNamara et al. 2009). A diminuição da eficiência da citotoxicidade também tem sido atribuída ao aumento da expressão de HBZ e diminuição da expressão de Tax (Macnamara, Rowan et al. 2010). Como a avidéz de ligação das células T CD8+ com o HBZ é inferior à observada com Tax, a expressão de HBZ faz com que o vírus escape da resposta imune protetora. Todavia, o HBZ induz também ativação e proliferação celular, gerando nos pacientes com HAM/TSP uma elevada atividade inflamatória de células T CD8+, a despeito de sua menor capacidade citotóxica contra as células infectadas pelo vírus (Ma, Yasunaga et al. 2016).

4. RESPOSTA IMUNE DE CÉLULAS NK e NKT NA INFECÇÃO PELO HTLV-1

As células NK, descobertas em 1975 (Kiessling, Klein et al. 1975, Kiessling, Klein et al. 1975), também são linfócitos citotóxicos com papel essencial na resposta imune inata contra vírus enquanto a resposta imune adaptativa ainda não foi completamente montada. As células NK apresentam basicamente três funções efetoras principais: 1) *Produção de IFN- γ* , células infectadas por vírus produzem IL-12 que irão estimular a proliferação e ativação citotóxica de células NK, além de induzir a produção autóloga de IFN- γ . O IFN- γ produzido por células NK estimula: ativação clássica de macrófagos e aumento da capacidade microbicida; direciona linfócitos T a se diferenciarem ao perfil Th1; promove a mudança de isótopos para classes opsonizantes e de IgG de fixação de complemento por linfócitos B; estimula o aumento da expressão de MHC classe I e classe II; aumento do processamento de antígenos e apresentação às células T por diversos tipos celulares. 2) *Citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos (ADCC)*, a molécula Fc γ RIII (CD16) presente em células NK liga-se à região Fc de anticorpos IgG que opsonizam células infectadas e geram sinais que desencadeiam a apoptose e destruição do vírus. 3) *Citotoxicidade direta por produção de mediadores citotóxicos*, células NK ativadas têm a capacidade de liberar grânulos citotóxicos (perforinas e granzimas) de maneira semelhante às LTC, perfurando e lisando as células infectadas, gerando também sinais de apoptose e destruição do vírus (Figura 2).

Figura 2. Funções das Células NK em Indivíduos Saudáveis.



Desenho esquemático das três principais funções de células NK no sangue periférico de indivíduos saudáveis quando desafiados contra uma infecção viral.

As células NK clássicas que desempenham funções na resposta imune inata expressam em sua superfície membrana a molécula NCAM-1 (CD56) em alta ou baixa intensidade, podendo ou não expressar a molécula CD16 e apresentam ausência de expressão de CD3 (Caligiuri 2008).

Nos últimos 15 anos têm sido descrita uma “nova” população de células que expressam ambas as moléculas CD56 e CD3, denominadas NKT por possuírem papel tanto da resposta imune inata quanto da resposta imune adaptativa. Estas células podem ou não expressar CD16, molécula responsável pela ADCC de células NK e expressam também clássicos

receptores de células T (TCRs). Células NKT, diferentemente das células NK também podem reconhecer moléculas lipídicas e glicolipídios de patógenos, e são reconhecidas pelo seu grande potencial citotóxico (Godfrey, Pellicci et al. 2004, Bendelac, Savage et al. 2007, Pellicci, Clarke et al. 2011).

Na literatura, as células NK e NKT são subdivididas em subpopulações e tem sido descrito funções e papéis diferente em diversas condições clínicas. A marcação de moléculas de superfície com anticorpos monoclonais por citometria de fluxo, tem denominado as células NK principalmente de **CD56+**, **CD56+CD3-**, **CD56+CD16+**, **CD56dim**, **CD56bright** e **CD56+CD16bright**, enquanto as células NKT são principalmente caracterizadas por serem **CD56+CD3+**. Sendo assim, são consideradas:

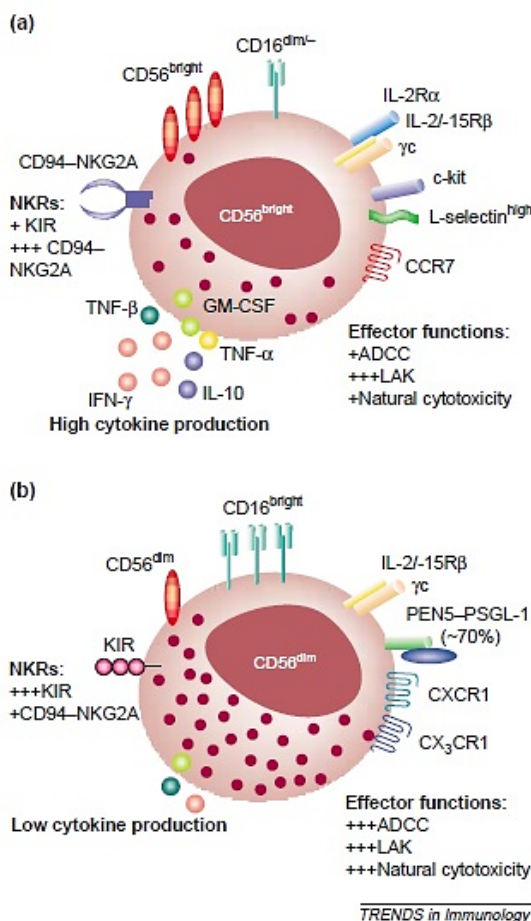
- **CD56+**: Células NK e NKT em geral.
- **CD56+CD3-**: Células NK, excluindo células NKT pela ausência de CD3; podem ou não expressar CD16.
- **CD56+CD16+**: Células NK e NKT, considerando a presença absoluta de CD16.
- **CD56dim** e **CD56bright**: Células NK e NKT, considerando a expressão baixa ou alta de CD56; podem expressar ou não CD16.
- **CD56+CD16bright**: Células NK, excluindo células NKT pela ausência da expressão de CD3; e presença absoluta de CD16.
- **CD56+CD3+**: Células NKT com presença absoluta da expressão de CD3+; considerando a presença ou ausência da molécula CD16.

Ver Figura 6.

Dentre as diversas formas de caracterizar as células NK e NKT nos seres humanos, a classificação celular baseada apenas na intensidade de expressão de CD56 é uma das mais utilizadas. As células **CD56dim** e as células **CD56bright** estão presentes no sangue periférico dos indivíduos saudáveis na frequência de 90% e 10%, respectivamente, representando o total das células NK. Quando comparadas, essas duas populações celulares apresentam algumas diferenças fenotípicas e funcionais (Cooper, Fehniger et al. 2001, Cooper, Fehniger et al. 2001). Células **CD56dim** são conhecidas por possuírem maior potencial citotóxico, por apresentarem maior frequência de células expressando CD16 e com maior capacidade para desempenhar ADCC, além de produzir maiores concentrações de grânulos citotóxicos (Nagler, Lanier et al. 1989). Já as células **CD56bright** são responsáveis por produzir citocinas

como IFN- γ , TNF- β , IL-10, IL-13 e GM-CSF (Cooper, Fehniger et al. 2001). A Figura 3 mostra o desenho esquemático das diferenças fenotípicas e funcionais observadas entre as células **CD56^{dim}** e **CD56^{bright}**.

Figura 3. Diferenças fenotípicas e funcionais entre células CD56^{bright} e CD56^{dim}.



Desenho esquemático representando a diferença da expressão de receptores e produção de citocinas e quimiocinas entre as células (A) CD56^{bright} e (B) CD56^{dim} (Cooper, Fehniger et al. 2001).

Poucos estudos têm avaliado o papel das células NK na infecção causada pelo HTLV-1. Estudos nos anos 90 mostraram que células NK de pacientes com HAM/TSP matam menos células infectadas pelo HTLV-1, quando comparadas às células NK de controles saudáveis. Além disto, pacientes com HAM/TSP apresentaram frequências diminuídas de células CD16⁺, CD11b, CD56⁺, CD16⁺CD56⁻, CD16⁻CD56⁺, CD16⁺CD8⁻ e CD16⁺CD3⁺ (Yu, Itoyama et al. 1991, Azakami, Sato et al. 2009). Entretanto, Norris e cols. apresentaram um dado controverso mostrando que células NK apresentavam proliferação espontânea nos indivíduos

infectados pelo HTLV-1 e que esta proliferação estava correlacionada com a alta carga proviral destes indivíduos (Norris, Hirschorn et al. 2010).

Estudos sobre as células NKT, utilizando uma marcação de anticorpos monoclonais alternativa (V α 24, V β 11 e CD1d), mostraram que estas células estavam em frequências diminuídas na HAM/TSP e que havia uma correlação inversa com a carga proviral (Azakami, Sato et al. 2009, Ndhlovu, Snyder-Cappione et al. 2009).

Na infecção pelo HTLV-1, Tax estimula a expressão de uma grande quantidade de genes envolvidos com o controle do ciclo celular e transcrição, assim como a produção das citocinas IL-15 e IL-2 e seus receptores (Azimi, Mariner et al. 2000, Fung, Chu et al. 2005). A IL-15 e a IL-2, por partilhar subunidades dos mesmos receptores, têm um número de funções redundantes, tais como indução de proliferação de células T e a co-estimulação para síntese de anticorpos por células B. No entanto, a IL-15 (principalmente produzida por monócitos/macrófagos) também desempenha um papel fundamental na diferenciação de células NK a partir de todos os seus progenitores, na manutenção da sobrevivência de tais células e na sua ativação. A produção elevada de IL-15 por células de indivíduos infectados pelo HTLV-1 promove a persistência de células NK e células T CD8+ específicas para Tax (Azimi, Mariner et al. 2000).

Lo e cols. mostraram que há uma maior dependência das células NK infectadas pelo HTLV-1 receberem estímulo de IL-2 para proliferação do que células NK de controles sadios. Adicionalmente, a presença de anti-CD16 em co-culturas de células NK e células infectadas pelo HTLV-1 resultou na infecção efetiva de células NK, contudo, estas células não geravam vírus viáveis (Lo, Vivier et al. 1992). Células NK de indivíduos infectados pelo HTLV-1 possuem habilidade diminuída de eliminar células T CD4+ e o estímulo com IL-2 apenas aumenta minimamente a capacidade citotóxica destas células. Outro achado foi observado na relação entre proteínas virais e expressão de moléculas em células do hospedeiro, onde a p12 viral modula negativamente a expressão de MHC classe I, ICAM-1 e ICAM-2 em células NK, diminuindo a aderência celular (Banerjee, Feuer et al. 2007).

As células NK possuem a capacidade de reconhecer o complexo de histocompatibilidade classe I (MHC-I), através de receptores de membrana que podem tanto inibir quanto ativar as funções destas células. De modo geral, os receptores de ativação irão reconhecer ligantes em células infectadas, enquanto os receptores de inibição irão reconhecer ligantes que são expressos nas células saudáveis não infectadas. Alguns desses receptores são

classicamente conhecidos na literatura, como por exemplo, os receptores da família KIR e das lectinas de tipo C, NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46 e CD16 (Moretta, Biassoni et al. 2002, Farag and Caligiuri 2006, Moretta, Bottino et al. 2006) (Tabela 1).

Tabela 1. Receptores de células NK humanas.

Receptor		Ligand
<i>Killer Ig-like receptors (KIR)</i>		
Inhibitory	Activating ^a	
KIR2DL1	KIR2DS1	Group 2 HLA-C Asn77Lys80 alleles
KIR2DL2	KIR2DS2	Group 1 HLA-C Ser77Asn80 alleles
KIR2DL3		
	KIR2DL4 ^b	HLA-G
	KIR2DS4	Unknown
KIR2DL5	KIR2DS5	Unknown
	KIR3DS1	Unknown
KIR3DL1		HLA-Bw4
KIR3DL2		HLA-A3, -A11
KIR3DL7		Unknown
<i>Heterodimeric C-type Lectin receptors</i>		
Inhibitory	Activating	
CD94/NKG2A/B ^c	CD94/NKG2C	HLA-E
	CD94/NKG2E/H ^c	Unknown
NKG2D		MICA, MICB, ULBP-1, -2, -3
<i>Natural cytotoxicity receptors (NCR)</i>		
NKp30		Unknown
NKp46		Unknown
NKp44		Unknown
<i>Immunoglobulin-like transcripts (ILT)</i>		
ILT-1 (LIR-1)		Unknown
<i>Activating co-receptors</i>		
Fc γ RIII (CD16)		Fc of IgG
CD2		CD58 (LFA-3)
LFA-1		ICAM-1
2B4		CD48
NKp80		Unknown
CD69		Unknown
CD40 ligand		CD40

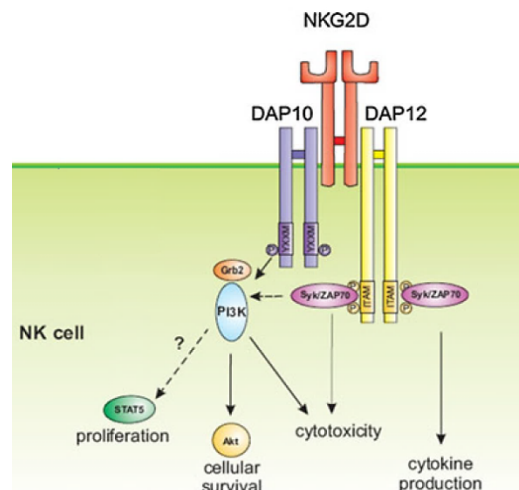
Modificado de (Farag and Caligiuri 2006).

O NKG2D é um receptor de inibição do grupo de lectinas do tipo-C, grupo de receptores de células NK tipo 2D. Seu gene codificador KLRK1 está presente no complexo de genes NK (NKC) situado no cromossomo 12 em humanos (Glienke, Sobanov et al. 1998). O NKG2D desempenha um importante papel na resposta imune contra infecções virais, pois é responsável por detectar as células com sinais alterados no DNA do hospedeiro (Marcenaro, Carlomagno et al. 2011, Zafirova, Wensveen et al. 2011). Nos seres humanos, NKG2D liga-se ao MHC de classe I MICA e MICB (MHC cadeia relacionada com a classe I de proteínas A e B), presentes em todas as células humanas (Raulet 2003). O NKG2D também reconhece

glicoproteínas de superfície que se ligam à proteína do citomegalovírus humano (HCMV) UL-16 (ULBPs) (Raulet 2003).

O NKG2D consiste em duas proteínas transmembranares que traduzem o sinal de ligação com seus ligantes através de duas proteínas adaptadoras, DAP10 e DAP12 (Gilfillan, Ho et al. 2002). O DAP10 possui uma região YINM na sua cauda citoplasmática que, após a fosforilação, recruta a subunidade p85 de PI3K e Grb2-Vav1. Este sinal estimula a sobrevivência e a citotoxicidade das células NK e fornece co-estimulação de células T ativadas. DAP12 possui uma ativação à base de ITAM que, depois de fosforilação, recruta Src cinases da família ZAP70 e Syk, responsável pela liberação de citocinas e reforço da citotoxicidade em células NK. Em resumo, a via de sinalização do NKG2D traz como consequência o estímulo ao aumento da proliferação de células NK, aumento da sobrevivência celular, aumento da capacidade citotóxica e produção de citocinas (Zafirova, Wensveen et al. 2011) (Figura 4)

Figura 4. Via de sinalização do NKG2D



Modificado de (Zafirova, Wensveen et al. 2011).

O NKG2D é um receptor expresso tanto em células NK e NKT quanto em LTC e diferentes vírus são capazes de induzir a expressão dos ligantes de NKG2D (MIC-A e MIC-B) nas células infectadas. O controle da infecção mediado por este receptor é um mecanismo eficiente, pois gera ativação de células NK assim como o aumento das funções efetoras antivirais das LTC (Zafirova, Wensveen et al. 2011).

Os vírus são capazes de induzir a expressão de ligantes do NKG2D em células infectadas (Chen, Wei et al. 2007, Draghi, Pashine et al. 2007, Fang, Lanier et al. 2008, Walsh, Lodoen et al. 2008). Eles causam forte ativação de células NK, bem como o reforço de funções antivirais efetoras de células T CD8+ ativadas que podem ser evitadas por anticorpos monoclonais específicos para NKG2D. Desta maneira, o controle da expressão do NKG2D tem papel importante nas infecções virais. Alguns vírus podem desenvolver mecanismos para evadir da ativação mediada por NKG2D no sistema imune (Jonjic, Babic et al. 2008). Por exemplo, o citomegalovírus consegue reter os ligantes ULBP1, ULBP2, e MICB no complexo de golgi das células infectadas (Cosman, Mullberg et al. 2001, Dunn, Chalupny et al. 2003), ou então reprimir a expressão destes ligantes, evitando assim a sua expressão na superfície da célula e ligação com o NKG2D (Stern-Ginossar, Gur et al. 2008). O controle da expressão do NKG2D é um mecanismo importante na vigilância imunológica de infecções virais.

Poucos estudos têm procurado entender a participação dos receptores de células NK na infecção causada pelo HTLV-1. Foi observado que a expressão de NKG2A é diminuída em células CD3+ de pacientes com HAM/TSP (Saito, Braud et al. 2003). A expressão de NKG2D, MICA e MICB são elevadas em células CD8+ de pacientes com HAM/TSP (Azimi, Jacobson et al. 2006). Basatena e cols. mostraram que indivíduos infectados pelo HTLV-1 que possuíam fenótipo de MHC classe I HLA-C*08 e HLA-B*54, ambos ligantes do receptor de células NK KIR2DL2, estavam associados com proteção ou susceptibilidade para a HAM/TSP, respectivamente. Adicionalmente, o fenótipo HLA-C*08 estava correlacionado com baixa carga proviral e o HLA-B*54 com alta carga proviral nos indivíduos infectados (Seich Al Basatena, Macnamara et al. 2011). Nielsen e cols. mostraram que o bloqueio de NKG2D e NKp46 diminui a frequência de células NK expressando CD107a, marcador de desgranulação celular e ativação (Nielsen, Odum et al. 2012). Talledo e cols. mostraram que NFkB1A e o NKG2D estavam mais expressos no sangue total de indivíduos com HAM/TSP, com metodologia realizada por PCR (Talledo, Lopez et al. 2012).

5. IMUNOPATOGENESE DA HAM/TSP

Um dos principais focos de estudo de diversos grupos de pesquisa é a identificação dos fatores de risco que propiciam a mudança de status clínico do portador do HTLV-1 para paciente com HAM/TSP. A razão pelo qual alguns indivíduos desenvolvem a mielopatia e outros não, poderia auxiliar pesquisadores e médicos no acompanhamento do desenvolvimento da patologia.

O principal fator de risco associado com o desenvolvimento da HAM/TSP é a carga proviral, que é mais elevada na HAM/TSP quando comparada à carga proviral dos portadores do vírus (Nagai, Yamano et al. 2001, Olindo, Lezin et al. 2005). Tem também sido sugerido que fatores genéticos, como por exemplo, o genótipo do HLA, que codifica para as moléculas de MHC, podem estar relacionados com o aumento da alta carga proviral em pacientes com HAM/TSP. Um estudo realizado no Japão mostrou que indivíduos com fenótipo HLA-classe I de genes HLA-A*02 e Cw*08 apresentaram carga proviral menor e menor risco de desenvolver HAM/TSP, enquanto indivíduos da mesma população com fenótipo HLA-classe I de genes HLA-B*5401 e HLA-classe II de genes HLA-DRB1*0101 eram mais predispostos à mielopatia (Jeffery, Usuku et al. 1999, Jeffery, Siddiqui et al. 2000). Desde quando a função das moléculas de MHC é apresentar antígenos virais às LTC, estes achados indicam que os indivíduos de fenótipo HLA-classe I de genes HLA-A*02 e Cw*08 montam uma resposta imune eficiente contra células infectadas pelo HTLV-1, que pode ser importante no controle da carga proviral e desenvolvimento da HAM/TSP. Hanon e cols. e Vine e cols. reforçaram este dado mostrando que LTC eliminam espontaneamente células infectadas pelo HTLV-1 e expressam mais mais eficientemente granzimas e perforinas em indivíduos com baixa carga proviral (Hanon, Hall et al. 2000, Vine, Heaps et al. 2004). Além disso, MacNamara e cols. mostraram que LTC específicas para HBZ de indivíduos HLA-classe I de genes HLA-A*02 e Cw*08 também estão associados com a proteção contra a HAM/TSP (Macnamara, Rowan et al. 2010).

Além da participação de fatores genéticos do hospedeiro no desenvolvimento da HAM/TSP, outros grupos de pesquisa mostram que variantes do vírus também podem contribuir para o aumento do risco para a mielopatia. A infecção pelo HTLV-1 de subtipo *cosmopolitan A*, apresenta maior expressão da proteína Tax subgrupo A, aumentando o risco para desenvolver HAM/TSP e este fato é independente do indivíduo apresentar fenótipo

HLA-classe I de genes HLA-A*02. Indivíduos com fenótipo HLA-classe I de genes HLA-A*02 parecem ter uma resposta imune eficiente apenas contra o HTLV-1 *cosmopolitan B* que codifica e expressa a proteína Tax subgrupo B (Furukawa, Yamashita et al. 2000, Sabouri, Saito et al. 2005). A Tabela 2 mostra alguns fatores genéticos do hospedeiro e do vírus que estão associados com risco para desenvolvimento da HAM/TSP.

Tabela 2. Fatores genéticos do hospedeiro e do vírus que estão associados com risco para desenvolvimento da HAM/TSP.

Fator	Condição	Efeito	Referência
Viral			
	Tax subgrupo A	Susceptível	(Furukawa, Yamashita et al. 2000)
	Carga proviral	Susceptível	(Nagai, Usuku et al. 1998)
Hospedeiro			
HLA	A*02	Protetor	(Jeffery, Usuku et al. 1999, Jeffery, Siddiqui et al. 2000)
	Cw*08	Protetor	(Jeffery, Siddiqui et al. 2000)
	B*5401	Susceptível	(Jeffery, Siddiqui et al. 2000)
	DRB1*0101	Susceptível	(Jeffery, Usuku et al. 1999)
Não-HLA	Promotor TNF- α (alelo -863 A)	Susceptível	(Vine, Witkover et al. 2002)
	Alelos longos CA repetidos de promotor de MMP-9	Susceptível	(Kodama, Saito et al. 2004)
	Promotor de IL-10 (Alelo -592 A)	Protetor	(Sabouri, Saito et al. 2005)
	Promotor SDF-1 (Alelo +801 A)	Protetor	(Vine, Witkover et al. 2002)
	Alelo IL-15 +191 C	Protetor	(Vine, Witkover et al. 2002)

Modificado de (Saito and Bangham 2012)

A patogênese da HAM/TSP é desencadeada principalmente pela proteína viral Tax, que é responsável transativar genes associados com a tradução de mediadores inflamatórios,

como por exemplo, aumentar a expressão de receptores para IL-2 resultando principalmente na intensa ativação de células T CD8⁺ e TCD4⁺, caracterizada pela proliferação persistente e produção espontânea de citocinas (IFN- γ e TNF) e receptores envolvidos no crescimento (TGF-beta 1) (Itoyama, Minato et al. 1988, Kim, Kehrl et al. 1990, Tschachler, Bohnlein et al. 1993, Yoshida 2001). A principal hipótese que explica o desencadeamento do processo patológico da HAM/TSP indica que ocorre uma passagem das células infectadas para o sistema nervoso central (SNC), seguido do desencadeamento de uma resposta inflamatória local crônica e lesão tecidual (Figura 5).

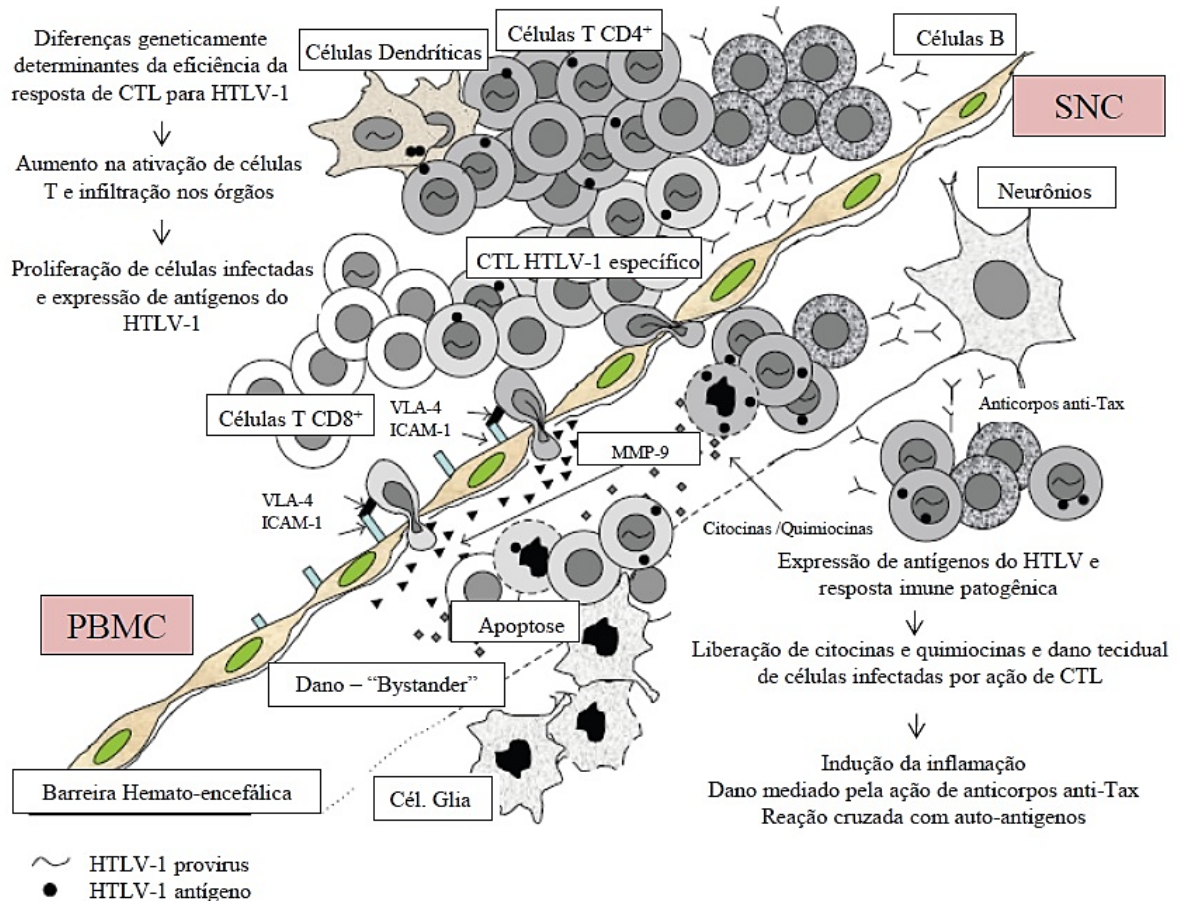
A infecção crônica pelo HTLV-1 induz a ativação persistente de moléculas de ativação em linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, a expressão de moléculas de adesão ICAM-1 e receptores na superfície de linfócitos e monócitos VLA-4, além de estimular a produção de fatores solúveis como citocinas e quimiocinas. Estes mecanismos têm como consequência a migração direcionada de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ ativados, LTC específicas para o HTLV-1 e linfócitos B para o SNC (Bhigjee, Bill et al. 1993, Uchiyama, Ishikawa et al. 1996, Al-Fahim, Cabre et al. 1999).

O papel das quimiocinas no recrutamento de células para o SNC através da barreira hematoencefálica também tem sido descrito na literatura. Ando e cols. observaram que pacientes com HAM/TSP apresentam altas concentrações de CXCL10 e maior frequência de células expressando CXCR3 (receptor para CXCL10) no líquido. Neste mesmo estudo, foi demonstrado que os astrócitos eram as principais células produtoras de CXCL10. Também foi observado que no líquido, as principais células que migraram foram os linfócitos T CD3⁺, seguido em menor frequência por células CD14⁺ e células CD19⁺ (Ando, Sato et al. 2013). Estudo realizado por nosso grupo demonstrou que pacientes com HAM/TSP apresentaram concentrações elevadas de CXCL9 e CXCL10 no líquido. Adicionalmente, foi observado que no sangue periférico destes pacientes há uma baixa expressão de CD11a (integrina) e CXCR3 por células CD4⁺, CD8⁺ e CD14⁺, sugerindo que estas células estariam migrando para o SNC (Guerra et al., 2016, dado não publicado).

No SNC, as células provenientes do sangue periférico continuam produzindo mediadores inflamatórios que estimulam a resposta antiviral contra células infectadas presentes no foco da lesão medular, levando a apoptose de algumas células. Devido à expressão de proteínas virais com capacidade de atuar em sistemas moleculares associados ao ciclo celular, algumas células infectadas são imortalizadas, o que aumenta sua permanência

no local e amplifica ainda mais os mecanismos efetores da resposta imune. Neste contexto, Tax interage com a via de sinalização do NF- κ B no hospedeiro, que é responsável por diversas funções, como sobrevivência celular e indução de citocinas próinflamatórias. A indução destas citocinas, tais como IL-6, IL-9, IL-15 e a indução do IL-2R α , NF- κ B-dependentes, por células infectadas com HTLV-1 sugere papel crítico do fator NF- κ B na infecção por HTLV-1 (Jacobson 2002). A inibição da ativação do NF- κ B leva a redução da expressão de marcadores de ativação de linfócitos e produção de citocinas por células mononucleares do sangue periférico em pacientes HAM/TSP (Jacobson 2002). Tax também estimula a ativação constitutiva de Akt, resultando na ativação de β -catenin e AP-1, levando ao aumento da regulação de genes antiapoptóticos adicionais. Todas estas funções contribuem para o estabelecimento de um processo inflamatório que agride o SNC, caracterizado por uma elevada produção de citocinas do tipo 1. A produção de IFN- γ por linfócitos T CD4⁺ ativa a produção de TNF por células da linhagem monocítica/macrofágica tais como micróglia sendo o efeito neurotóxico dessa citocina um dos principais mecanismos desmilenizantes existentes (Bhigjee, Bill et al. 1993, Aye, Matsuoka et al. 2000, Kiwaki, Umehara et al. 2003). É também possível que anticorpos IgG específicos para proteínas virais como a proteína Tax do HTLV-1, que reage cruzadamente com autoantígenos celulares, estejam associados com inflamação subsequente ao dano tecidual inicial (Figura 5).

Figura 5. Hipótese da patogênese da HAM/TSP.



(Saito and Bangham 2012)

CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

1. POPULAÇÃO ESTUDADA

Participaram do estudo 39 indivíduos infectados pelo HTLV-1, sendo 20 indivíduos portadores do HTLV-1 e 19 pacientes diagnosticados com HAM/TSP, acompanhados no ambulatório multidisciplinar de HTLV-1 do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos, da Universidade Federal da Bahia, Brasil. Não participaram do estudo indivíduos co-infectados com outros agentes patogênicos, indivíduos com doenças neurológicas não associadas ao HTLV-1, mulheres grávidas e indivíduos em uso de drogas imunomoduladoras. O diagnóstico da infecção pelo HTLV-1 foi realizado pela documentação de anticorpos anti-HTLV-1 pelo método imunoenzimático ELISA (Murex HTLV-I+II, Abbot, Dartford, UK) e a confirmação feita pelo método Western Blot (HTLV inf 2.4, Genelabs, Singapore). A disfunção motora e o grau de comprometimento neurológico foram analisados pelo Osame's motor disability score (OMDS) (Izumo, Goto et al. 1996). Pacientes com OMDS = 0 foram considerados portadores do HTLV-1. A classificação de Castro-Costa (De Castro-Costa, Araujo et al. 2006) e apresentação de OMDS ≥ 1 foram utilizados como critérios para diagnóstico de HAM/TSP. Não participaram do estudo possíveis ou prováveis pacientes com HAM/TSP. Dez indivíduos sadios não infectados pelo HTLV-1 constituíram o grupo controle. O Comitê de Ética da Maternidade Climério de Oliveira da Universidade Federal da Bahia aprovou este estudo e todos os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Processo Nº 035/2016).

2. OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO

As células mononucleares do sangue periférico (CMSPs) foram obtidas a partir do sangue heparinizado dos controles sadios, portadores do HTLV-1 e pacientes com HAM/TSP,

e separadas por gradiente de densidade, com Ficoll-Hypaque (GE Healty Bio-Sciences, Uppsala, Sweden), numa proporção de 3 mL para cada 10 mL de sangue e centrifugação (400 g) por 30 minutos. O anel de células mononucleares foi aspirado da interface e as células, lavadas 2 vezes em salina e ressuspensas em meio de cultura RPMI 1640 com L-glutamina e 25 mM de HEPES (Gibco BRL, Grand Island, New York, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino e 0,5% de gentamicina 10mg/mL (Gibco Brl, Grand Island, New York, USA). Em seguida as CMSPs foram: a) marcadas com anticorpos monoclonais específicos para experimentos de perfil fenotípico de células NK por citometria de fluxo; b) cultivadas por 72 horas para dosagem de citocinas pró inflamatórias no sobrenadante; c) ou congeladas em uma solução composta por 10% de DMSO, 50% de soro fetal bovino e 40% de RPMI para subsequente extração de DNA e realização de PCR-RT para a determinação da carga proviral.

3. DOSAGEM DE CITOCINAS NO SOBRENADANTE DE CULTURA DE CMSPs

Os sobrenadantes de cultura de CMSP não estimuladas foram coletados após um período de 72 horas de incubação e congelados a -20°C até a utilização para determinação da concentração de citocinas. As concentrações de IFN- γ e TNF foram determinadas por ELISA sanduíche utilizando kits específicos seguindo as instruções dos protocolos padrões (DuoSet R&D Systems, Minneapolis, MN, USA ou BD Pharmingen, San Diego, CA, USA).

4. AVALIAÇÃO FREQUÊNCIA E DO FENÓTIPO DE CÉLULAS NK e NKT POR CITOMETRIA DE FLUXO

A avaliação *ex vivo* do perfil fenotípico de células NK e suas subpopulações e avaliação da expressão de CD107a e NKG2D nestas células foram realizadas utilizando CMSP de controles sadios, portadores do HTLV-1 e pacientes com HAM/TSP marcadas com anticorpos monoclonais (anti-CD56, anti-CD8, anti-CD16, anti-CD3, anti-CD107a e anti-NKG2D, nas fluorescências FITC, PE, PercyP Cy5 e APC da eBioscience ou R&D Systems) por 20 minutos à 4°C . Em seguida, as células foram lavadas com PBS, fixadas com paraformaldeído

a 2% e então analisadas em citômetro de fluxo (FacsCanto II, BD Biosciences, San Jose, CA) sendo a análise feita no software FlowJo versão X (TreeStar, Ashland, OR).

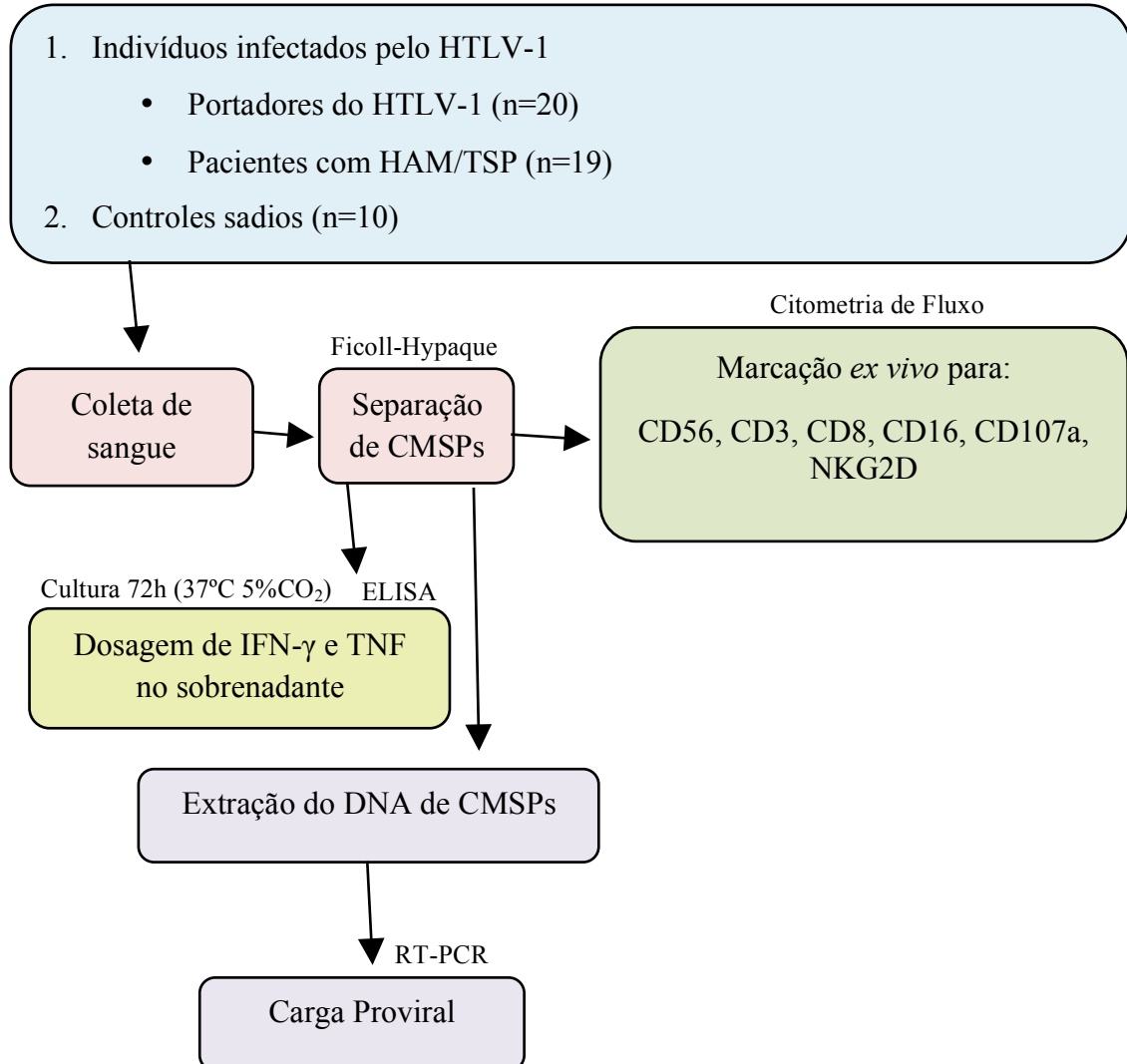
5. EXTRAÇÃO DE DNA E CARGA PROVIRAL DO HTLV-1

A extração do DNA foi realizada pelo método de *salting-out*. As CMSP foram descongeladas, lavadas com salina, e tratadas com uma solução contendo tampão de Proteinase K 5x, Proteinase K, SDS 20% e H₂O destilada no intuito de desestruturar e lisar o conteúdo proteico e lipídico das membranas biológicas e citoplasma. A solução celular foi mantida a 37°C, por 24h para completa lise celular. Após este período, NaCl 6M foi adicionado à solução para que as cargas do grupo fosfato do DNA se neutralizassem e favorecessem o enovelamento. Em seguida, o material foi centrifugado à 13.000g por 10 min para separação do conteúdo genético (sobrenadante) do conteúdo celular já lisado (pellet). Foi adicionado etanol absoluto a 99,5% para desidratação do DNA, promovendo o enovelamento. Em seguida o DNA foi transferido para uma solução de etanol 70% para início da hidratação. As amostras de DNA foram aliquotadas e estocadas em H₂O destilada, mantidas a -20°C até quantificação da carga proviral.

A determinação da carga proviral foi realizada através da de PCR-RT TaqMan (Applied Biosystems) como descrito previamente por Dehée A e cols. (Dehee, Cesaire et al. 2002).

6. DESENHO EXPERIMENTAL

- Estudo de corte transversal.



7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os testes não paramétricos de Mann-Whitney, Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn e Qui-quadrado foram utilizados para verificar diferenças entre dois ou três grupos, respectivamente. O teste de correlação de Spearman foi utilizado nos dados de correlações. Os resultados foram expressos pela mediana. O $P < 0.05$ foi considerado resultado estatisticamente significativo.

RESULTADOS GERAIS

1. CASUÍSTICA

A Tabela 3 apresenta os dados demográficos, a carga proviral e produção espontânea de IFN- γ e TNF por CMSP de controles saudios, portadores do HTLV-1 e pacientes com HAM/TSP.

Tabela 3. Dados demográficos, carga proviral e produção espontânea de IFN- γ e TNF em indivíduos infectados pelo HTLV-1 e controles saudios.

	Controles Saudios (n = 10)	Portadores do HTLV-1 (n = 20)	HAM/TSP (n = 19)	Valor P
Idade (anos)	30 (23-45)	52 (31-69)	63 (36-76)	<0.0001*
Gênero (M/F)	1/9	8/12	9/10	0.12**
Carga Proviral (cópias/10 ⁶ cels)	--	16.190 (110-292.916)	72.438 (20.000-365.075)	<0.0001***
IFN- γ (pg/mL)	0 (0-13)	364 (46-1.429)	921 (9-1.897)	0.03*
TNF (pg/mL)	6 (0-120)	8 (0-192)	284 (34-1.805)	0.0002*

* = Kruskal-Wallis; ** = Qui-quadrado (X^2); *** = Mann-Whitney. Dados de idade, carga proviral, IFN- γ e TNF são representados pela mediana (valores mínimos e máximos).

No grupo de controles saudios a mediana de idade foi de 30 anos, variando entre 23 e 45 anos, enquanto no grupo de portadores do HTLV-1 a mediana de idade foi de 52 anos, variando entre 31 e 69 anos, e no grupo de pacientes com HAM/TSP a mediana foi de 63 anos, variando de 36 a 76 anos. A mediana de idade no grupo de indivíduos com HAM/TSP foi maior do que as observadas nos demais grupos ($P < 0.0001$). Em relação ao gênero dos participantes do estudo, a razão de masculino/feminino no entre os controles saudios foi de 1/9, no grupo de portadores do HTLV-1 de 8/12 e no grupo de pacientes com HAM/TSP foi de 9/10, sem diferença estatisticamente significante entre os grupos.

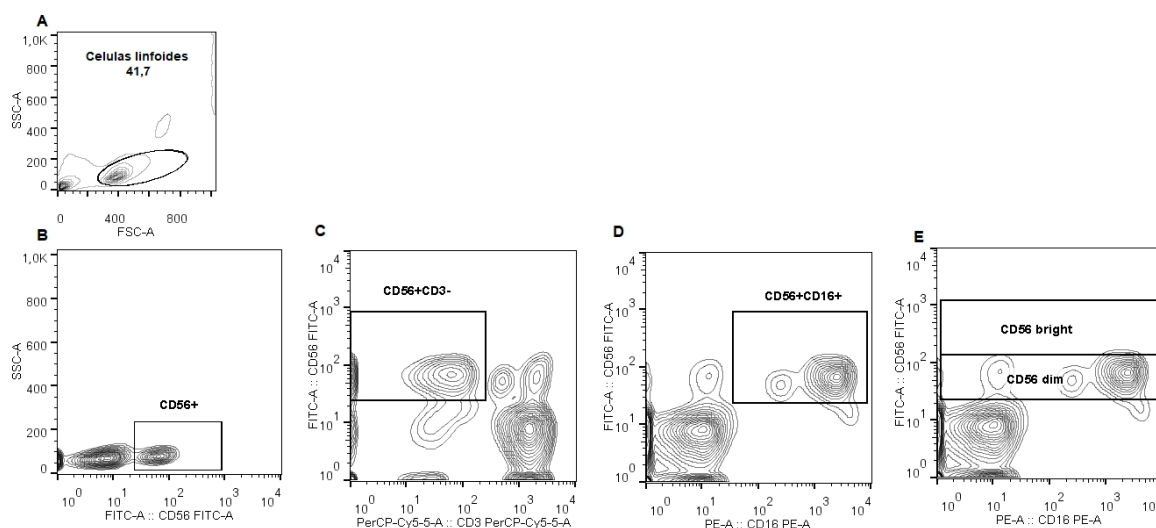
Pacientes com HAM/TSP apresentaram uma maior carga proviral do que portadores do HTLV-1 (72.438 cópias/10⁶ células vs 16.190 cópias/10⁶ células, respectivamente, $P < 0.0001$)

(Tabela 3). A produção espontânea de IFN- γ e TNF por CMSP também foi mais elevada entre os pacientes com HAM/TSP (921 pg/mL e 284 pg/mL, respectivamente) quando comparado aos portadores do HTLV-1 (364 pg/mL e 8 pg/mL, respectivamente) ($P=0.03$ e $P=0.0002$, respectivamente).

2. CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS NK E NKT NA INFEÇÃO PELO HTLV-1

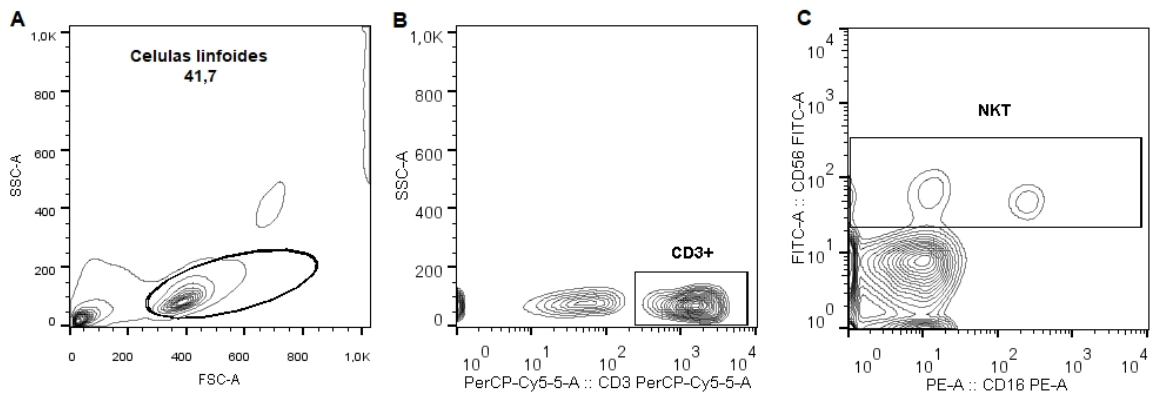
As células NK e NKT de indivíduos infectados pelo HTLV-1 foram caracterizadas por citometria de fluxo e podem ser observadas na Figura 6 e Figura 7 respectivamente. As células NK podem ser classificadas principalmente a partir da expressão de marcadores membranares pela alta/baixa presença de CD56 e CD16 e ausência de CD3. Outra população de células NK têm sido descrita no sangue periférico de humanos e possui funções distintas às observadas pelas células NK clássicas. Estas células são conhecidas como células NKT e podem atuar tanto na resposta imune inata, se assemelhando às funções de células NK, quando na resposta imune adaptativa, desempenhando funções semelhantes aos dos linfócitos T. Adicionalmente, as células NKT expressam CD3 e podem ou não expressar CD16 em sua superfície, diferentemente do que é observado em células NK clássicas. Além disso, células NKT expressam em sua superfície receptores de linfócitos T (TCRs).

Figura 6. Esquema dos *gates* representativos para caracterização de células NK por citometria de fluxo.



Células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram marcadas com anticorpos monoclonares anti-CD56, anti-CD3, anti-CD16 para avaliação das frequências de células NK por citometria de fluxo. As células linfóides foram selecionadas a partir de tamanho (SSC) e granulocidade (FSC) (A), para então células NK serem caracterizadas em células CD56+ (B), CD56+CD3- (C), CD56+CD16+ (D) e CD56dim e CD56bright (E).

Figura 7. Esquema dos *gates* representativos para caracterização de células NKT por citometria de fluxo.



Células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram marcadas com anticorpos monoclonares anti-CD56, anti-CD3, anti-CD16 para avaliação das frequências de células NKT por citometria de fluxo. As células linfóides foram selecionadas a partir de tamanho (SSC) e granulosidade (FSC) (A), para as células CD3+ serem selecionadas+ (B), e então as células NKT (C).

3. ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DE CÉLULAS NK E NKT NA INFECÇÃO PELO HTLV-1

As frequências de células NK e NKT foram determinadas através da marcação de superfície membranar por anticorpos monoclonais específicos (anti-CD56, CD3 e CD16) por citometria de fluxo e são mostradas na Tabela 4.

Tabela 4. Frequência de células NK e NKT em indivíduos infectados pelo HTLV-1 e controles sadios.

Frequência de células (%)	Controles Sadios (n = 10)	Portadores do HTLV-1 (n = 20)	HAM/TSP (n = 19)
CD56+	16,4 (11,6-23,8)	13,3 (6,4-26,4)	11,2 (4,6-19,4) ^{a,b}
CD56+CD3-	7,9 (4,5-15,3)	8,9 (2,8-15)	5,8 (1,9-11,7) ^{a,b}
CD56+CD16+	10,1 (5,3-16,2)	10,7 (3,2-22,9)	7,2 (1,8-15,8) ^{a,b}
CD56dim	12,9 (9-21,3)	12,2 (5-27,4)	9,5 (3,4-19,4) ^{a,b}
CD56bright	0,9 (0,5-3,4)	0,8 (0,07-1,5)	0,7 (0,2-1,3)
NKT	6,4 (3,5-11,5)	4,8 (2,2-14,7)	4,1 (1,9-9,7)

O teste não-paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado nas análises estatísticas. Dados estão representados pela mediana (e valores mínimos e máximos).

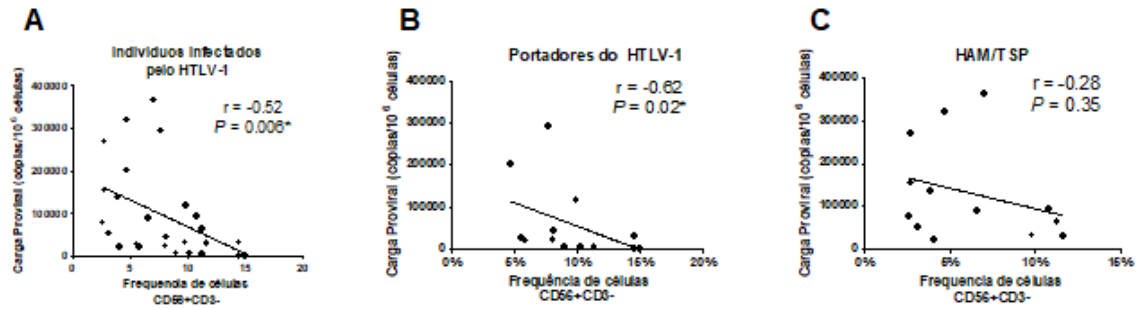
^acontroles sadios x HAM/TSP ($P < 0.05$)

^bportadores do HTLV-1 x HAM/TSP ($P < 0.05$)

Pacientes com HAM/TSP apresentaram frequências diminuídas de células CD56+, CD56+CD3-, CD56CD16+ e CD56dim quando foram comparados aos controles sadios e aos portadores do HTLV-1. Não foram observadas diferenças nas frequências de células CD56bright e células NKT entre os grupos estudados (Tabela 4).

A Figura 8 representa a correlação inversa entre a carga proviral e a frequência das células CD56+CD3- no grupo de indivíduos infectados pelo HTLV-1 (portadores do HTLV-1 e pacientes com HAM/TSP).

Figura 8. Correlação entre a carga proviral e a frequência de células NK em indivíduos infectados pelo HTLV-1.



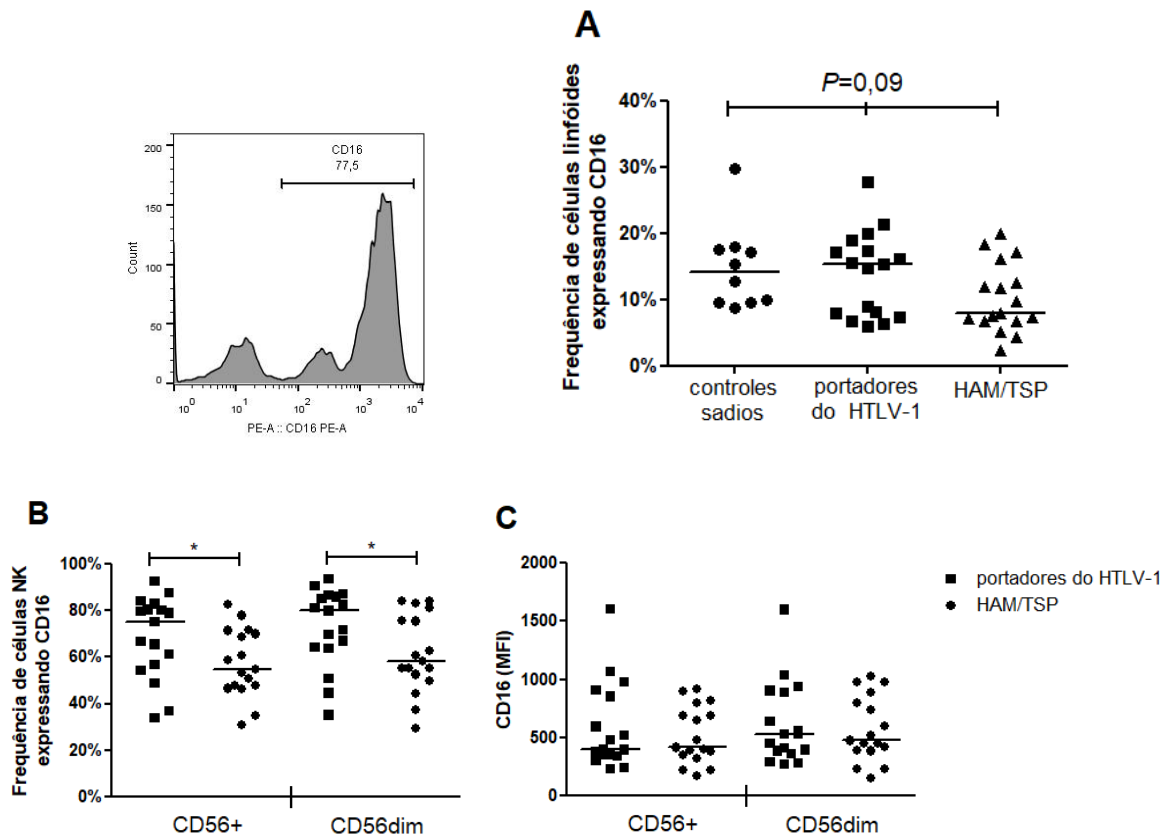
Correlação entre a carga proviral e a frequência de células CD56+CD3- em (A) indivíduos infectados pelo HTLV-1, e separadamente em (B) portadores do HTLV-1 e (C) pacientes com HAM/TSP. O teste não paramétrico r de Spearman foi utilizado nas análises estatísticas. $*P < 0.05$.

Além da diminuição da frequência das células NK em pacientes com HAM/TSP, também foi observado que a frequência de células NK (CD56+CD3-), foi inversamente correlacionada com a carga proviral em portadores do HTLV-1 mas não em pacientes com HAM/TSP (Figura 8).

4. ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DE CÉLULAS NK EXPRESSANDO CD16 EM INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HTLV-1

A frequência de células linfóides em geral e células NK expressando a molécula CD16 em portadores do HTLV-1 e pacientes com HAM/TSP foi avaliada por citometria de fluxo e pode ser observada na Figura 9.

Figura 9. Frequência de células linfóides e células NK (CD56+ e CD56dim) expressando CD16 em indivíduos infectados pelo HTLV-1.



(A) Frequência de células linfóides e células (B) CD56+ (C) CD56dim expressando CD16 em controles sadios, portadores do HTLV-1 e pacientes com HAM/TSP. O teste Mann-Whitney foi utilizado na análise estatística, $*P<0.05$. Na parte esquerda/acima do gráfico está representada a estratégia de seleção da expressão de CD16 por Fluorescência Menos Um/Fluorescence minus one” (FMO), utilizada para controle interno do experimento.

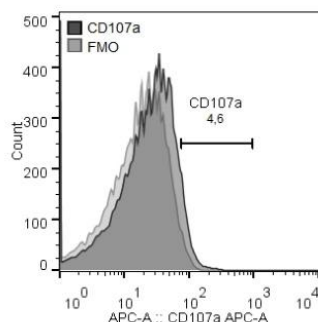
Foi observado que a expressão de CD16 em células linfóides foi diminuída em pacientes com HAM/TSP, contudo não observamos diferença estatisticamente significativa. Adicionalmente, em se tratando especificamente de células NK, a frequência de células CD56+ e células CD56dim expressando CD16 (mas não o MFI da expressão deste receptor) estava diminuída em pacientes com HAM/TSP comparando aos portadores do HTLV-1. CD56+: 53,1% vs 75,3%, respectivamente, $P=0.03$; e CD56dim: 58,2% vs 79,8%, respectivamente, $P=0.03$ (Figura 9).

5. EXPRESSÃO DE CD107a EM CÉLULAS NK DE INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HTLV-1

CD107a é um marcador clássico para desgranulação de mediadores citotóxicos produzidos por células citotóxicas. Quando a células está ativada, grânulos contendo granzimas e perforinas são liberados através de vacúolos expressando CD107a.

A frequência de células NK expressando CD107a e a média de intensidade de fluorescência (MFI) desta expressão em controles sadios, portadores do HTLV-1 e pacientes com HAM/TSP são representados na Tabela 5. A Figura 10 apresenta a estratégia de seleção para expressão de CD107a.

Figura 10. Estratégia de seleção para expressão de CD107a.



Estratégia de seleção da expressão de CD107a por Fluorescência Menos Um/“*Fluorescence minus one*” (FMO), utilizada para controle interno do experimento.

Tabela 5. Frequência de células NK e NKT expressando CD107 e MFI da expressão de CD107a por células NK de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e controles sadios.

	Controles Sadios (n = 10)	Portadores do HTLV-1 (n = 15)	HAM/TSP (n = 16)
Frequência de células expressando CD107a (valores mínimos-máximos)			
CD56+	4.6 (2.6-12.4)	8 (2.2-39.2) ^a	11.1 (4.4-61.9) ^b
CD56+CD3-	2.3 (0.8-12)	6.7 (1.4-41.9) ^a	6.9 (1.8-57.6) ^b
CD56+CD16+	2.8 (1.5-14)	6.5 (1.7-40) ^a	7.7 (3.4-70.8) ^b
CD56dim	5.1 (3.2-12.9)	8.3 (2.4-40.1) ^a	11.8 (4.4-62) ^b
CD56bright	0.9 (0-11.7)	4.9 (0.7-30.8) ^a	5.4 (0-66.7) ^b
NKT	8.4 (6.6-11.6)	11.8 (6-52.7) ^a	15.8 (6.1-50) ^b
MFI (valores mínimos-máximos)			
CD56+	17.6 (11.1-52)	27.1 (18.7-76) ^a	27 (21-47) ^b
CD56+CD3-	13.1 (9.6-49.2)	22.6 (15.3-48.2) ^a	18.7 (16.3-37.2) ^b
CD56+CD16+	15.1 (10.2-19.7)	23.5 (1.7-92.1) ^a	23.8 (18.1-48.1) ^b
CD56dim	18 (10.9-53.9)	28.9 (2.4-77.2) ^a	26.7 (2.4-50.1) ^b
CD56bright	15.5 (9.5-43.3)	24.4 (0.9-79.9) ^a	26.7 (17.1-38.3) ^b
NKT	25.9 (13.9-52.4)	34.4 (6-85) ^a	29.8 (16.7-75.7)

O teste não-paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado nas análises estatísticas. Dados estão representados pela mediana (e valores mínimos e máximos).

^acontroles sadios x portadores do HTLV-1 ($P < 0.05$)

^bcontroles sadios x HAM/TSP ($P < 0.05$)

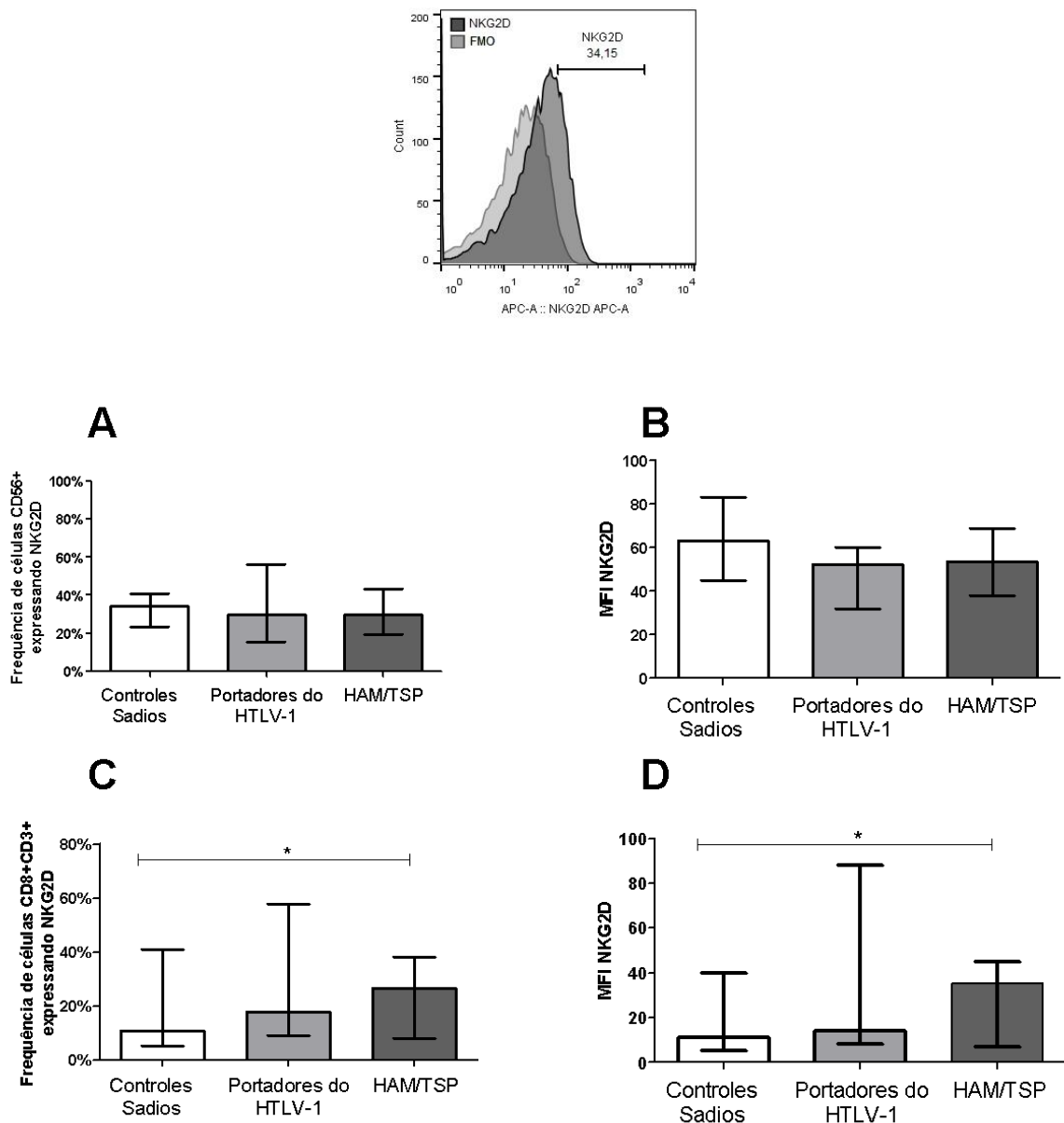
A frequência de células NK expressando CD107a, assim como o MFI da expressão desta molécula em portadores do HTLV-1 e pacientes com HAM/TSP foram maiores do que em controles sadios, contudo, não foi observada diferenças estatísticas entre os grupos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 (Tabela 5).

6. EXPRESSÃO DE NKG2D EM CÉLULAS NK e LINFÓCITOS T CD8 DE INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HTLV-1

NKG2D é um dos receptores de membrana presentes na superfície das células NK. Trata-se de uma lectina com capacidade de estimular as funções citotóxicas das células NK através da ligação com ligantes específicos expressos em células não infectadas (Bauer, Groh et al. 1999).

A frequência de células CD56+ e linfócitos CD3+CD8+ (para análise comparativa) expressando NKG2D e a média de intensidade de fluorescência (MFI) desta expressão em controles sadios e indivíduos infectados pelo HTLV-1 (portadores do HTLV-1 e pacientes com HAM/TSP) estão apresentadas na Figura 11.

Figura 11. Frequência e MFI de células CD56+ e CD3+CD8+ expressando NKG2D em indivíduos infectados pelo HTLV-1 e controles sadios.



Frequência (A) e MFI (B) de células CD56+ expressando NKG2D. Frequência (C) e MFI da expressão de NKG2D (D) de células CD3+CD8+ expressando NKG2D em controles sadios e indivíduos infectados pelo HTLV-1 (portadores do HTLV-1 e pacientes com HAM/TSP). Análise estatística realizada pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis. * $P < 0.05$. Acima dos gráficos está representada a estratégia de seleção da expressão de NKG2D por Fluorescência Menos Um/*Fluorescence minus one* (FMO), utilizada para controle interno do experimento.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes na frequência de células NK (em todos os tipos de classificação fenotípica) expressando NKG2D entre os grupos controles sadios, portadores do HTLV-1 e pacientes com HAM/TSP. A MFI da expressão de

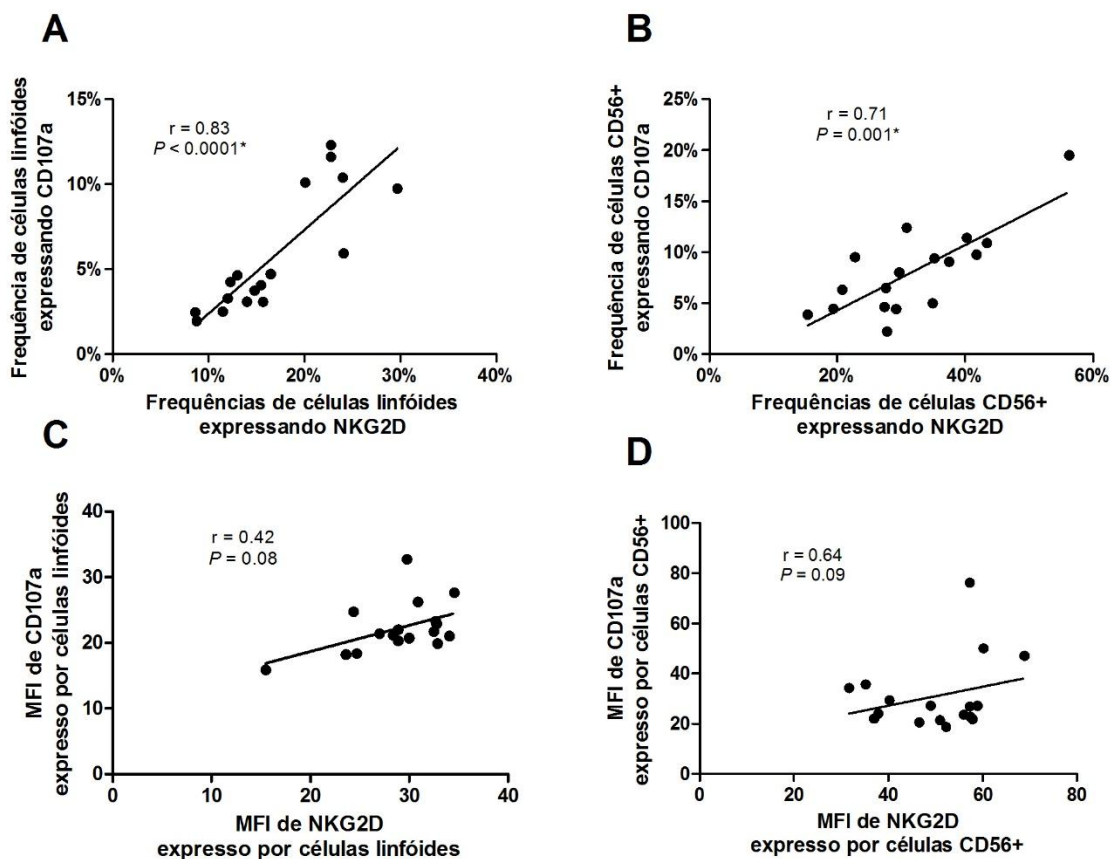
NKG2D nas células NK também não diferiu entre os grupos. Como exemplo representativo, observamos que a frequência de células NK CD56+ expressando NKG2D no grupo de controles sadios foi de 34,1%, no grupo de portadores do HTLV-1 foi de 29,7% e no grupo de pacientes com HAM/TSP foi de 30%, $P=0.13$. Adicionalmente, a MFI da expressão de NKG2D em células NK CD56+ foi de 62.9 no grupo de controles sadios, 52.3 no grupo portadores do HTLV-1 e 53.5 no grupo de pacientes com HAM/TSP, $P = 0.85$ (Figura 11A e 11B).

Apesar da ausência de diferenças significantes na expressão deste receptor nas células NK entre os grupos estudados, a frequência de células CD3+CD8+ expressando NKG2D e a MFI desta expressão foram mais elevadas entre os pacientes com HAM/TSP quando comparado aos controles sadios. Não foram observadas diferenças quando a frequência e a MFI deste receptor foi comparada entre os grupos de indivíduos infectados pelo HTLV-1. A frequência de células CD3+CD8+ expressando NKG2D no grupo de controles sadios foi de 11%, no grupo de portadores do HTLV-1 foi de 18% e no grupo de pacientes com HAM/TSP foi de 26%, $P=0.04$. Adicionalmente, o MFI da expressão de NKG2D em células CD3+CD8+ foi de 11 no grupo de controles sadios, 15 no grupo de portadores do HTLV-1 e 35 no grupo de pacientes com HAM/TSP, $P=0.04$ (Figura 11C e 11D).

7. CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE NKG2D e CD107a EM CÉLULAS LINFÓIDES E CÉLULAS NK DE INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HTLV-1

A correlação entre a frequência de células linfóides e células NK CD56+ expressando NKG2D e CD107a em indivíduos infectados pelo HTLV-1 (portadores do HTLV-1 e pacientes com HAM/TSP) podem ser observadas na Figura 12.

Figura 12. Correlação entre a frequência de células e MFI da expressão NKG2D e CD107a em indivíduos infectados pelo HTLV-1.



Correlação entre a frequência e MFI de células linfóides (A e C) e células NK CD56+ (B e D) expressando NKG2D e CD107a em indivíduos infectados pelo HTLV-1 (portadores do HTLV-1 e pacientes com HAM/TSP). O teste não paramétrico r de Spearman foi utilizado nas análises estatísticas. $*P < 0.05$.

Foi observado uma correlação direta e significativa entre a frequência de células linfóides ($r = 0.83$ e $P < 0.0001$) e células NK CD56+ ($r = 0.71$ e $P = 0.001$) expressando NKG2D e CD107a. Adicionalmente, apesar de não significativa, houve uma correlação direta e proporcional entre a MFI da expressão de NKG2D *versus* a expressão de CD107a em células linfóides ($r = 0.42$ e $P = 0.08$) e em células CD56+ ($r = 0.64$ e $P = 0.09$) (Figura 12).

DISCUSSÃO

As células NK e NKT de humanos são caracterizadas na literatura pela presença de CD56 em suas diferentes intensidades de expressão, assim como pela presença ou ausência de CD16 e CD3. Os estudos direcionados ao entendimento do papel das células NK nos seres vivos e em suas patologias/infecções específicas escolhem o tipo de caracterização celular que vão abordar de acordo com o objetivo do trabalho.

Até o presente momento, somente quatro estudos avaliaram a frequência de células NK na infecção pelo HTLV-1. Yu, F. e colaboradores em 1991 demonstraram que as frequências de células CD16+, CD11b+, CD56+, CD16+, CD56-, CD16-CD56+, CD16+CD8- e CD16+CD3+ estavam diminuídas na HAM/TSP. Esta última população celular representaria as NKT, que naquela época não eram conhecidas por esta caracterização fenotípica. O autor também observou que a frequência diminuída destas células CD16+CD3+ correlacionava-se inversamente com a proliferação crescente de CMSP. A proliferação espontânea de CMSP é característica em indivíduos infectados pelo HTLV-1, principalmente em pacientes com HAM/TSP. Este estudo avaliou as células NK e NKT de maneira ampla e indicou que estas células estavam com frequências diminuídas na HAM/TSP (Yu, Itoyama et al. 1991). Adicionalmente, Ndhlovu LC e cols. e Azakami K e cols. em 2009 demonstraram que a frequência de células NKT (utilizando marcação alternativa celular de superfície com V α 24, V β 11 e CD1d), assim como a frequência de células CD56+CD16+ estavam diminuídas na HAM/TSP, (Azakami, Sato et al. 2009, Ndhlovu, Snyder-Cappione et al. 2009). O estudo controverso de Norris PJ e cols. em 2010 demonstrou que células CD56+CD16dim e CD56+CD16- apresentavam proliferação espontânea nos indivíduos infectados pelo HTLV-1 e que esta taxa de proliferação estava correlacionada com a carga proviral (Norris, Hirschhorn et al. 2010).

No presente estudo, nós confirmamos o achado de que células CD56+, CD56+CD3-, CD56+CD16+ e CD56dim apresentam frequências diminuídas na HAM/TSP. Adicionalmente observamos que a frequência de células NK (CD56+CD3-) foi correlacionada inversamente com a carga proviral de indivíduos infectados pelo HTLV-1. Observação importante foi feita quando os grupos de pacientes com HAM/TSP e portadores do HTLV-1 foram analisados separadamente, neste caso apenas observamos diferença estatisticamente significativa neste último grupo.

Sobre as células NKT, não confirmamos observação prévia de que estas também apresentaram frequência alterada nesta infecção viral. Este fato pode ser explicado pela diferença no tipo de marcação de superfície celular que foi utilizada na metodologia. Os demais estudos caracterizaram as células NKT como $V\alpha 24+$, $V\beta 11+$, $CD1d+$, $CD16+CD3+$, $CD56+CD16dim$ ou $CD56+CD16-$, e aqui a caracterização foi feita utilizando $CD56+CD3+$. De fato, as frequências de células NKT nos grupos de controles sadios, portadores do HTLV-1 e pacientes com HAM/TSP foram de 6,4%, 4,8% e 4,1% respectivamente ($P=0.22$), mostrando que com a elevação no número de indivíduos analisados ou alteração do tipo de marcação utilizada, pode-se passar a observar uma diminuição da frequência destas células na infecção pelo HTLV-1.

O receptor CD16 ($Fc\gamma RIII$) pode ser observado tanto em células da linhagem mielóide, presente em monócitos e macrófagos, quanto em células da linhagem linfóide, presente em células NK e em uma percentagem de células NKT. Este receptor é responsável por se ligar à região Fc dos anticorpos que opsonizam as células infectadas e desencadeiam eventos de apoptose nestas células, destruindo o provírus intracelular, caracterizando o evento denominado “citotoxicidade celular dependente de anticorpos” (ADCC).

Nenhum trabalho anterior propôs avaliar a ADCC em células NK de indivíduos infectados pelo HTLV-1. No presente estudo foi observada uma menor frequência de células $CD56+$ e $CD56dim$ expressando CD16 nos pacientes com HAM/TSP, comparados aos portadores do HTLV-1. A ADCC é um dos principais mecanismos desenvolvidos pelas células NK para controle da proliferação viral e de células infectadas, por promover a apoptose destas células. A mais provável hipótese que pode explicar a frequência diminuída de células NK expressando CD16 é a de que este receptor é clivado muito rapidamente após se ligar aos anticorpos opsonizantes e desencadear os eventos apoptóticos (Harrison, Phillips et al. 1991, Wang, Wu et al. 2013, Jing, Ni et al. 2015). É possível que em pacientes com HAM/TSP haja um estímulo grande o suficiente para aumentar a ADCC nas células NK promovendo a maior ativação do receptor CD16 e consequente clivagem. Experimentos futuros estão sendo propostos no intuito de avaliar a concentração de CD16 solúvel em soro e no sobrenadante de CMSP de indivíduos infectados pelo HTLV-1, comparando os grupos portadores do HTLV-1 e pacientes com HAM/TSP.

Na análise da capacidade de desgranulação das células NK, a intensidade da expressão de CD107a é uma indicação de que células estão promovendo citotoxicidade. Observamos que as células NK e NKT de indivíduos infectados com HTLV-1 expressam mais CD107a do que controles sadios, mas não houve diferenças entre pacientes com HAM/TSP e portadores

do HTLV-1. Contudo, como pacientes com HAM/TSP apresentaram frequências reduzidas de células NK circulantes no sangue periférico, a citotoxicidade mediada por essas células pode ser comprometida nesses pacientes.

Algumas observações adicionais podem ser consideradas a partir destes dados. Por exemplo, células NKT foram a subpopulação de células que mais desgranularam (maior frequência de células expressando CD107a assim como MFI) comparado às outras subpopulações celulares nos três grupos de indivíduos estudados. Células NKT possuem propriedades semelhantes aos linfócitos T CD8+ e já se sabe da importância destas células em desenvolver atividade citotóxica para controle do vírus durante a infecção pelo HTLV-1 (Jeffery, Usuku et al. 1999, Jeffery, Siddiqui et al. 2000, Vine, Heaps et al. 2004, Bangham and Osame 2005). Células NKT também exibem importante papel no controle de doenças auto-imunes, doenças tumorais e infecções causadas por vírus, bactérias, fungos e helmintos (Kawano, Nakayama et al. 1999, Kronenberg and Gapin 2002, Brigl and Brenner 2004).

A ativação do receptor NKG2D nas células NK após ligação com seus ligantes MHC de classe I MICA e MICB, presente na maioria das células do sangue periférico humano, gera sinais que desencadeiam e auxiliam na proliferação das células NK, aumentando a sobrevivência celular, a capacidade citotóxica e a produção de citocinas (Frag and Caligiuri 2006). No presente trabalho, não foi observada diferença na frequência e MFI de células NK expressando NKG2D entre os grupos estudados, mostrando que o NKG2D nestas células permanece intacto durante a infecção pelo HTLV-1. Talledo, M. e colaboradores mostraram que a expressão de NKG2D por PCR-RT é maior no sangue total de pacientes com HAM/TSP (Talledo, Lopez et al. 2012). O NKG2D não é só expresso por células NK, mas também por linfócitos T CD8+, embora em frequências e MFI reduzidos (Bauer, Groh et al. 1999). De fato, nós observamos que a frequência e MFI de células CD8+CD3+ expressando NKG2D foram maiores em pacientes com HAM/TSP. Adicionalmente, Azimi, M. e colaboradores também demonstraram que a expressão de NKG2D e dos ligantes MICA e MICB é elevada em células CD8+ de pacientes com HAM/TSP (Azimi, Jacobson et al. 2006).

Outro estudo interessante mostrou que o bloqueio de NKG2D reduz significativamente a expressão de CD107a em células CD56dim e CD56bright de indivíduos infectados pelo HTLV-1 (Nielsen, Odum et al. 2012). O presente estudo nós observamos que a expressão de NKG2D está intensa e positivamente correlacionada com a expressão de CD107a, tanto em células linfóides em geral, quanto em células CD56+ de indivíduos infectados pelo HTLV-1. A união desses dados indica que a via de sinalização do NKG2D é um fator importante na indução de desgranulação de células citotóxicas e que se tratando especificamente de células

NK, a expressão deste receptor está preservada. Até o presente momento nenhum estudo avaliou a influência geral da expressão e função dos ligantes MICA e MICB no contexto das células NK na infecção pelo HTLV-1. É importante lembrar que o HTLV-1 tem a capacidade interagir com DNA do hospedeiro, modificando a expressão de MHC classe I em determinados fenótipos, gerando ou não susceptibilidade a HAM/TSP (Jeffery, Usuku et al. 1999, Jeffery, Siddiqui et al. 2000). Estudos que avaliem o papel funcional dos receptores de células NK e NKT ainda são escassos na literatura sobre o HTLV-1. É necessário que experimentos desta natureza sejam realizados para que possa melhor entender a importância destas células citotóxicas no controle viral e na proteção contra o desenvolvimento da patologia.

O papel da frequência de células NK e NKT no controle de carga proviral é reconhecido em outras infecções. Há uma correlação inversa entre a frequência de células NK e os níveis de HIV-RNA no plasma de pacientes com infecção primária por HIV-1 (Gondois-Rey, Cheret et al. 2017). Foi descrito que casos fatais de infecções por Ebola apresentavam frequências mais baixas de células NK em comparação aos casos fatais (Cimini, Viola et al. 2017). Além disso, as células NK do fígado de pacientes infectados com HCV são altamente ativadas em comparação com as células NK do sangue e a terapia visando o aumento da ativação das células NK e função no fígado e no sangue diminuiu a carga viral (Spaan, van Oord et al. 2015).

No presente estudo, observamos que a função de células NK e NKT parece estar preservada na infecção pelo HTLV-1, porém a diminuição da frequência destas células no sangue periférico de pacientes com HAM/TSP pode significar menor citotoxicidade contra células infectadas pelo vírus, contribuindo com aumento da carga proviral e desenvolvimento da neuropatologia.

SUMÁRIO DE RESULTADOS

- Pacientes com HAM/TSP apresentaram menor frequência de células NK do que indivíduos portadores do HTLV-1 e controles sadios.
- A carga proviral dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 foi correlacionada inversamente com a frequência diminuída de células NK em portadores do HTLV-1, mas não em pacientes com HAM/TSP.
- Pacientes com HAM/TSP apresentam frequências diminuídas de células NK expressando CD16, molécula essencial na ADCC contra células infectadas, indicando que este mecanismo está ativado.
- A desgranulação de células NK e NKT foi semelhante entre portadores do HTLV-1 e pacientes com HAM/TSP, mas esta foi maior quando comparada ao grupo de controles sadios.
- A frequência de células NK expressando NKG2D e MFI não está alterada na infecção pelo HTLV-1.
- A expressão de NKG2D está diretamente correlacionada com a expressão de CD107a em indivíduos infectados pelo HTLV-1.

CONCLUSÃO

Os dados neste estudo indicam que a desgranulação de células NK e NKT, assim como expressão de receptores CD16 e NKG2D estão preservados. Contudo, a diminuição da frequência destas células desempenhando funções citotóxicas no sangue periférico de pacientes com HAM/TSP em combate ao vírus podem estar associadas com o aumento da carga proviral e progressão para a doença.

ABSTRACT

PHENOTYPIC CHARACTERIZATION OF NK AND NKT CELLS IN HTLV-1 INFECTION. **Aims:** The cytotoxic activities of CD8+ T cells has been considered the main defender mechanism against the human T lymphotropic virus type I (HTLV-1). Like CD8+ T cells, NK and NKT cells are able to perform a cytotoxic degranulation with production of cytotoxic mediators, such as perforins and granzymes. NK and NKT cells also develop mediate antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) against infected cells, but few studies seek to understand the role of these cells in HTLV-1 infection. The aims of this study were to evaluate the frequency of NK cells, expression of CD16, CD107a and NKG2D in these cells in HTLV-1 carriers, patients with myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) and healthy subjects, and correlate the findings with the proviral load and development of HAM/TSP. **Methods:** Phenotypic characterization of NK cells was evaluated by flow cytometry. **Results:** The frequencies of CD56+, CD56+CD3-, CD56+CD16+ and CD56dim were decreased in HAM/TSP patients. Specifically, the frequency of NK cells was inversely correlated with the proviral load only in the group of HTLV-1 carriers but not in HAM/TSP patients. The frequency of CD56+ and CD56dim cells expressing CD16 was decreased in HAM/TSP patients. The frequency of NK cells expressing CD107a and the intensity of this molecule was increased in HTLV-1 infected subjects compared to healthy controls, but we did not observed differences between the groups of HTLV-1 carriers and HAM/TSP patients. The expression of NKG2D receptor is not altered in NK cells from HAM/TSP patients, but is in T CD8+ lymphocytes. The expression of NKG2D was directly correlated with CD107a expression. **Conclusions:** The data presented in this study indicate that the degranulation of NK and NKT cells as well as the expression of the receptors CD16 and NKG2D are preserved. However, the decreased frequency of these cells performing cytotoxic functions in peripheral blood of HAM/TSP patients against infected cells might be associated with the increased proviral load and progression to disease.

Keywords: 1. HTLV-1; 2. NK cells; 3. Cellular cytotoxicity; 4. Innate immunity response

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aktas, E., U. C. Kucuksezer, S. Bilgic, G. Erten and G. Deniz (2009). "Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity." *Cell Immunol* **254**(2): 149-154.
- Al-Fahim, A., P. Cabre, L. Kastrukoff, K. Dorovini-Zis and J. Oger (1999). "Blood mononuclear cells in patients with HTLV-I-associated myelopathy: lymphocytes are highly activated and adhesion to endothelial cells is increased." *Cell Immunol* **198**(1): 1-10.
- Ando, H., T. Sato, U. Tomaru, M. Yoshida, A. Utsunomiya, J. Yamauchi, N. Araya, N. Yagishita, A. Coler-Reilly, Y. Shimizu, K. Yudoh, Y. Hasegawa, K. Nishioka, T. Nakajima, S. Jacobson and Y. Yamano (2013). "Positive feedback loop via astrocytes causes chronic inflammation in virus-associated myelopathy." *Brain* **136**(Pt 9): 2876-2887.
- Aye, M. M., E. Matsuoka, T. Moritoyo, F. Umehara, M. Suehara, Y. Hokezu, H. Yamanaka, Y. Isashiki, M. Osame and S. Izumo (2000). "Histopathological analysis of four autopsy cases of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: inflammatory changes occur simultaneously in the entire central nervous system." *Acta Neuropathol* **100**(3): 245-252.
- Azakami, K., T. Sato, N. Araya, A. Utsunomiya, R. Kubota, K. Suzuki, D. Hasegawa, T. Izumi, H. Fujita, S. Aratani, R. Fujii, N. Yagishita, H. Kamijuku, T. Kanekura, K. Seino, K. Nishioka, T. Nakajima and Y. Yamano (2009). "Severe loss of invariant NKT cells exhibiting anti-HTLV-1 activity in patients with HTLV-1-associated disorders." *Blood* **114**(15): 3208-3215.
- Azimi, N., S. Jacobson, Y. Tanaka, L. Corey, V. Groh and T. Spies (2006). "Immunostimulation by induced expression of NKG2D and its MIC ligands in HTLV-1-associated neurologic disease." *Immunogenetics* **58**(4): 252-258.
- Azimi, N., J. Mariner, S. Jacobson and T. A. Waldmann (2000). "How does interleukin 15 contribute to the pathogenesis of HTLV type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis?" *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**(16): 1717-1722.
- Banerjee, P., G. Feuer and E. Barker (2007). "Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) p12I down-modulates ICAM-1 and -2 and reduces adherence of natural killer cells, thereby protecting HTLV-1-infected primary CD4+ T cells from autologous natural killer cell-mediated cytotoxicity despite the reduction of major histocompatibility complex class I molecules on infected cells." *J Virol* **81**(18): 9707-9717.
- Bangham, C. R. (2003). "The immune control and cell-to-cell spread of human T-lymphotropic virus type 1." *J Gen Virol* **84**(Pt 12): 3177-3189.
- Bangham, C. R. and M. Osame (2005). "Cellular immune response to HTLV-1." *Oncogene* **24**(39): 6035-6046.

- Bauer, S., V. Groh, J. Wu, A. Steinle, J. H. Phillips, L. L. Lanier and T. Spies (1999). "Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA." Science **285**(5428): 727-729.
- Bendelac, A., P. B. Savage and L. Teyton (2007). "The biology of NKT cells." Annu Rev Immunol **25**: 297-336.
- Bhigjee, A. I., P. L. Bill, C. A. Wiley, I. M. Windsor, D. A. Matthias, T. Amenomori, W. Wachsman and D. Moorhouse (1993). "Peripheral nerve lesions in HTLV-I associated myelopathy (HAM/TSP)." Muscle Nerve **16**(1): 21-26.
- Biddison, W. E., R. Kubota, T. Kawanishi, D. D. Taub, W. W. Cruikshank, D. M. Center, E. W. Connor, U. Utz and S. Jacobson (1997). "Human T cell leukemia virus type I (HTLV-I)-specific CD8+ CTL clones from patients with HTLV-I-associated neurologic disease secrete proinflammatory cytokines, chemokines, and matrix metalloproteinase." J Immunol **159**(4): 2018-2025.
- Brigl, M. and M. B. Brenner (2004). "CD1: antigen presentation and T cell function." Annu Rev Immunol **22**: 817-890.
- Brito-Melo, G. E., V. Peruhype-Magalhaes, A. Teixeira-Carvalho, E. F. Barbosa-Stancioli, A. B. Carneiro-Proietti, B. Catalan-Soares, J. G. Ribas, H. Grupo Interdisciplinar de Pesquisas sobre and O. A. Martins-Filho (2007). "IL-10 produced by CD4+ and CD8+ T cells emerge as a putative immunoregulatory mechanism to counterbalance the monocyte-derived TNF-alpha and guarantee asymptomatic clinical status during chronic HTLV-I infection." Clin Exp Immunol **147**(1): 35-44.
- Caligiuri, M. A. (2008). "Human natural killer cells." Blood **112**(3): 461-469.
- Caskey, M. F., D. J. Morgan, A. F. Porto, S. P. Giozza, A. L. Muniz, G. O. Orge, M. J. Travassos, Y. Barron, E. M. Carvalho and M. J. Glesby (2007). "Clinical manifestations associated with HTLV type I infection: a cross-sectional study." AIDS Res Hum Retroviruses **23**(3): 365-371.
- Castro-Lima Vargens, C., M. F. Grassi, N. Boa-Sorte, R. H. Rathsam-Pinheiro, V. N. Olavarria, R. de Almeida Kruschewsky and B. Galvao-Castro (2011). "Keratoconjunctivitis sicca of human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) infected individuals is associated with high levels of HTLV-1 proviral load." J Clin Virol **52**(3): 177-180.
- Castro, N., P. Oliveira, D. Freitas, W. Rodrigues, A. Muniz and E. Carvalho (2005). "Erectile dysfunction and HTLV-I infection: a silent problem." Int J Impot Res **17**(4): 364-369.
- Chen, Y., H. Wei, R. Sun, Z. Dong, J. Zhang and Z. Tian (2007). "Increased susceptibility to liver injury in hepatitis B virus transgenic mice involves NKG2D-ligand interaction and natural killer cells." Hepatology **46**(3): 706-715.
- Chen, Y. M., E. Gomez-Lucia, A. Okayama, N. Tachibana, T. H. Lee, N. Mueller and M. Essex (1990). "Antibody profile of early HTLV-I infection." Lancet **336**(8725): 1214-1216.

Cimini, E., D. Viola, M. Cabeza-Cabrerizo, A. Romanelli, N. Tumino, A. Sacchi, V. Bordoni, R. Casetti, F. Turchi, F. Martini, J. A. Bore, F. R. Koundouno, S. Duraffour, J. Michel, T. Holm, E. G. Zekeng, L. Cowley, I. Garcia Dorival, J. Doerrbecker, N. Hetzelt, J. H. J. Baum, J. Portmann, R. Wolfel, M. Gabriel, O. Miranda, G. Diaz, J. E. Diaz, Y. A. Fleites, C. A. Pineiro, C. M. Castro, L. Koivogui, N. Magassouba, B. Diallo, P. Ruibal, L. Oestereich, D. M. Wozniak, A. Ludtke, B. Becker-Ziaja, M. R. Capobianchi, G. Ippolito, M. W. Carroll, S. Gunther, A. Di Caro, C. Munoz-Fontela and C. Agrati (2017). "Different features of Vdelta2 T and NK cells in fatal and non-fatal human Ebola infections." *PLoS Negl Trop Dis* **11**(5): e0005645.

Cooper, M. A., T. A. Fehniger and M. A. Caligiuri (2001). "The biology of human natural killer-cell subsets." *Trends Immunol* **22**(11): 633-640.

Cooper, M. A., T. A. Fehniger, S. C. Turner, K. S. Chen, B. A. Ghaheri, T. Ghayur, W. E. Carson and M. A. Caligiuri (2001). "Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset." *Blood* **97**(10): 3146-3151.

Cosman, D., J. Mullberg, C. L. Sutherland, W. Chin, R. Armitage, W. Fanslow, M. Kubin and N. J. Chalupny (2001). "ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor." *Immunity* **14**(2): 123-133.

Costa, D. T., A. L. Santos, N. M. Castro, I. C. Siqueira, E. M. Carvalho Filho and M. J. Glesby (2012). "Neurological symptoms and signs in HTLV-1 patients with overactive bladder syndrome." *Arq Neuropsiquiatr* **70**(4): 252-256.

Daenke, S., A. G. Kermode, S. E. Hall, G. Taylor, J. Weber, S. Nightingale and C. R. Bangham (1996). "High activated and memory cytotoxic T-cell responses to HTLV-1 in healthy carriers and patients with tropical spastic paraparesis." *Virology* **217**(1): 139-146.

De Castro-Costa, C. M., A. Q. Araujo, M. M. Barreto, O. M. Takayanagui, M. P. Sohler, E. L. da Silva, S. M. de Paula, R. Ishak, J. G. Ribas, L. C. Roviroso, H. Carton, E. Gotuzzo, W. W. Hall, S. Montano, E. L. Murphy, J. Oger, C. Remondegui and G. P. Taylor (2006). "Proposal for diagnostic criteria of tropical spastic paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy (TSP/HAM)." *AIDS Res Hum Retroviruses* **22**(10): 931-935.

de Revel, T., A. Mabondzo, G. Gras, B. Delord, P. Roques, F. Boussin, Y. Neveux, M. Bahuaui, H. J. Fleury and D. Dormont (1993). "In vitro infection of human macrophages with human T-cell leukemia virus type 1." *Blood* **81**(6): 1598-1606.

Dehee, A., R. Cesaire, N. Desire, A. Lezin, O. Bourdonne, O. Bera, Y. Plumelle, D. Smadja and J. C. Nicolas (2002). "Quantitation of HTLV-I proviral load by a TaqMan real-time PCR assay." *J Virol Methods* **102**(1-2): 37-51.

Dekaban, G. A., E. E. King, J. Arp, T. J. Palker and G. P. Rice (1994). "Comparative analysis of the antibody response to the HTLV-I gag and env proteins in HTLV-I asymptomatic carriers and HAM/TSP patients: an isotype and subclass analysis." *Scand J Immunol* **40**(2): 171-180.

- Dourado, I., L. C. Alcantara, M. L. Barreto, M. da Gloria Teixeira and B. Galvao-Castro (2003). "HTLV-I in the general population of Salvador, Brazil: a city with African ethnic and sociodemographic characteristics." J Acquir Immune Defic Syndr **34**(5): 527-531.
- Draghi, M., A. Pashine, B. Sanjanwala, K. Gendzekhadze, C. Cantoni, D. Cosman, A. Moretta, N. M. Valiante and P. Parham (2007). "NKp46 and NKG2D recognition of infected dendritic cells is necessary for NK cell activation in the human response to influenza infection." J Immunol **178**(5): 2688-2698.
- Dunn, C., N. J. Chalupny, C. L. Sutherland, S. Dosch, P. V. Sivakumar, D. C. Johnson and D. Cosman (2003). "Human cytomegalovirus glycoprotein UL16 causes intracellular sequestration of NKG2D ligands, protecting against natural killer cell cytotoxicity." J Exp Med **197**(11): 1427-1439.
- Elovaara, I., S. Koenig, A. Y. Brewah, R. M. Woods, T. Lehky and S. Jacobson (1993). "High human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-specific precursor cytotoxic T lymphocyte frequencies in patients with HTLV-1-associated neurological disease." J Exp Med **177**(6): 1567-1573.
- Fang, M., L. L. Lanier and L. J. Sigal (2008). "A role for NKG2D in NK cell-mediated resistance to poxvirus disease." PLoS Pathog **4**(2): e30.
- Farag, S. S. and M. A. Caligiuri (2006). "Human natural killer cell development and biology." Blood Rev **20**(3): 123-137.
- Fung, M. M., Y. L. Chu, J. L. Fink, A. Wallace and K. L. McGuire (2005). "IL-2- and STAT5-regulated cytokine gene expression in cells expressing the Tax protein of HTLV-1." Oncogene **24**(29): 4624-4633.
- Furukawa, Y., M. Yamashita, K. Usuku, S. Izumo, M. Nakagawa and M. Osame (2000). "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." J Infect Dis **182**(5): 1343-1349.
- Gessain, A. and O. Cassar (2012). "Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection." Front Microbiol **3**: 388.
- Gilfillan, S., E. L. Ho, M. Cella, W. M. Yokoyama and M. Colonna (2002). "NKG2D recruits two distinct adapters to trigger NK cell activation and costimulation." Nat Immunol **3**(12): 1150-1155.
- Giozza, S. P., S. B. Santos, M. Martinelli, M. A. Porto, A. L. Muniz and E. M. Carvalho (2008). "[Salivary and lacrymal gland disorders and HTLV-1 infection]." Rev Stomatol Chir Maxillofac **109**(3): 153-157.
- Glienke, J., Y. Sobanov, C. Brostjan, C. Steffens, C. Nguyen, H. Lehrach, E. Hofer and F. Francis (1998). "The genomic organization of NKG2C, E, F, and D receptor genes in the human natural killer gene complex." Immunogenetics **48**(3): 163-173.

Godfrey, D. I., D. G. Pellicci and M. J. Smyth (2004). "Immunology. The elusive NKT cell antigen--is the search over?" *Science* **306**(5702): 1687-1689.

Gondois-Rey, F., A. Cheret, S. Granjeaud, F. Mallet, G. Bidaut, C. Lecuroux, M. Ploquin, M. Muller-Trutwin, C. Rouzioux, V. Avettand-Fenoel, A. Moretta, G. Pialoux, C. Goujard, L. Meyer and D. Olive (2017). "NKG2C+ memory-like NK cells contribute to the control of HIV viremia during primary infection: Optiprim-ANRS 147." *Clin Transl Immunology* **6**(7): e150.

Greten, T. F., J. E. Slansky, R. Kubota, S. S. Soldan, E. M. Jaffee, T. P. Leist, D. M. Pardoll, S. Jacobson and J. P. Schneck (1998). "Direct visualization of antigen-specific T cells: HTLV-1 Tax11-19- specific CD8(+) T cells are activated in peripheral blood and accumulate in cerebrospinal fluid from HAM/TSP patients." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(13): 7568-7573.

Hanon, E., S. Hall, G. P. Taylor, M. Saito, R. Davis, Y. Tanaka, K. Usuku, M. Osame, J. N. Weber and C. R. Bangham (2000). "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* **95**(4): 1386-1392.

Harrison, D., J. H. Phillips and L. L. Lanier (1991). "Involvement of a metalloprotease in spontaneous and phorbol ester-induced release of natural killer cell-associated Fc gamma RIII (CD16-II)." *J Immunol* **147**(10): 3459-3465.

Hinuma, Y., K. Nagata, M. Hanaoka, M. Nakai, T. Matsumoto, K. I. Kinoshita, S. Shirakawa and I. Miyoshi (1981). "Adult T-cell leukemia: antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera." *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(10): 6476-6480.

Itoyama, Y., S. Minato, J. Kira, I. Goto, H. Sato, K. Okochi and N. Yamamoto (1988). "Spontaneous proliferation of peripheral blood lymphocytes increased in patients with HTLV-I-associated myelopathy." *Neurology* **38**(8): 1302-1307.

Izumo, S., I. Goto, Y. Itoyama, T. Okajima, S. Watanabe, Y. Kuroda, S. Araki, M. Mori, S. Nagataki, S. Matsukura, T. Akamine, M. Nakagawa, I. Yamamoto and M. Osame (1996). "Interferon-alpha is effective in HTLV-I-associated myelopathy: a multicenter, randomized, double-blind, controlled trial." *Neurology* **46**(4): 1016-1021.

Jacobson, S. (2002). "Immunopathogenesis of human T cell lymphotropic virus type I-associated neurologic disease." *J Infect Dis* **186 Suppl 2**: S187-192.

Jacobson, S., H. Shida, D. E. McFarlin, A. S. Fauci and S. Koenig (1990). "Circulating CD8+ cytotoxic T lymphocytes specific for HTLV-I pX in patients with HTLV-I associated neurological disease." *Nature* **348**(6298): 245-248.

Jeffery, K. J., A. A. Siddiqui, M. Bunce, A. L. Lloyd, A. M. Vine, A. D. Witkover, S. Izumo, K. Usuku, K. I. Welsh, M. Osame and C. R. Bangham (2000). "The influence of HLA class I alleles and heterozygosity on the outcome of human T cell lymphotropic virus type I infection." *J Immunol* **165**(12): 7278-7284.

Jeffery, K. J., K. Usuku, S. E. Hall, W. Matsumoto, G. P. Taylor, J. Procter, M. Bunce, G. S. Ogg, K. I. Welsh, J. N. Weber, A. L. Lloyd, M. A. Nowak, M. Nagai, D. Kodama, S. Izumo, M. Osame and C. R. Bangham (1999). "HLA alleles determine human T-lymphotropic virus-I (HTLV-I) proviral load and the risk of HTLV-I-associated myelopathy." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(7): 3848-3853.

Jing, Y., Z. Ni, J. Wu, L. Higgins, T. W. Markowski, D. S. Kaufman and B. Walcheck (2015). "Identification of an ADAM17 cleavage region in human CD16 (FcγRIII) and the engineering of a non-cleavable version of the receptor in NK cells." PLoS One **10**(3): e0121788.

Jonjic, S., M. Babic, B. Polic and A. Krmpotic (2008). "Immune evasion of natural killer cells by viruses." Curr Opin Immunol **20**(1): 30-38.

Kannagi, M., S. Harada, I. Maruyama, H. Inoko, H. Igarashi, G. Kuwashima, S. Sato, M. Morita, M. Kidokoro, M. Sugimoto and et al. (1991). "Predominant recognition of human T cell leukemia virus type I (HTLV-I) pX gene products by human CD8+ cytotoxic T cells directed against HTLV-I-infected cells." Int Immunol **3**(8): 761-767.

Kaplan, J. E., R. F. Khabbaz, E. L. Murphy, S. Hermansen, C. Roberts, R. Lal, W. Heneine, D. Wright, L. Matijas, R. Thomson, D. Rudolph, W. M. Switzer, S. Kleinman, M. Busch and G. B. Schreiber (1996). "Male-to-female transmission of human T-cell lymphotropic virus types I and II: association with viral load. The Retrovirus Epidemiology Donor Study Group." J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol **12**(2): 193-201.

Kattan, T., A. MacNamara, A. G. Rowan, H. Nose, A. J. Mosley, Y. Tanaka, G. P. Taylor, B. Asquith and C. R. Bangham (2009). "The avidity and lytic efficiency of the CTL response to HTLV-1." J Immunol **182**(9): 5723-5729.

Kawano, T., T. Nakayama, N. Kamada, Y. Kaneko, M. Harada, N. Ogura, Y. Akutsu, S. Motohashi, T. Iizasa, H. Endo, T. Fujisawa, H. Shinkai and M. Taniguchi (1999). "Antitumor cytotoxicity mediated by ligand-activated human Vα24 NKT cells." Cancer Res **59**(20): 5102-5105.

Kiessling, R., E. Klein, H. Pross and H. Wigzell (1975). ""Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell." Eur J Immunol **5**(2): 117-121.

Kiessling, R., E. Klein and H. Wigzell (1975). ""Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype." Eur J Immunol **5**(2): 112-117.

Kim, S. J., J. H. Kehrl, J. Burton, C. L. Tandler, K. T. Jeang, D. Danielpour, C. Thevenin, K. Y. Kim, M. B. Sporn and A. B. Roberts (1990). "Transactivation of the transforming growth factor beta 1 (TGF-beta 1) gene by human T lymphotropic virus type 1 tax: a potential mechanism for the increased production of TGF-beta 1 in adult T cell leukemia." J Exp Med **172**(1): 121-129.

- Kinoshita, K., S. Hino, T. Amagaski, S. Ikeda, Y. Yamada, J. Suzuyama, S. Momita, K. Toriya, S. Kamihira and M. Ichimaru (1984). "Demonstration of adult T-cell leukemia virus antigen in milk from three sero-positive mothers." Gan **75**(2): 103-105.
- Kiwaki, T., F. Umehara, Y. Arimura, S. Izumo, K. Arimura, K. Itoh and M. Osame (2003). "The clinical and pathological features of peripheral neuropathy accompanied with HTLV-I associated myelopathy." J Neurol Sci **206**(1): 17-21.
- Kodama, D., M. Saito, W. Matsumoto, A. H. Sabouri, S. Izumo, K. Arimura, K. Usuku, C. R. Bangham and M. Osame (2004). "Longer dinucleotide repeat polymorphism in matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) gene promoter which correlates with higher HTLV-I Tax mediated transcriptional activity influences the risk of HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP)." J Neuroimmunol **156**(1-2): 188-194.
- Koralnik, I. J., J. F. Lemp, Jr., R. C. Gallo and G. Franchini (1992). "In vitro infection of human macrophages by human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I (HTLV-I)." AIDS Res Hum Retroviruses **8**(11): 1845-1849.
- Koyanagi, Y., Y. Itoyama, N. Nakamura, K. Takamatsu, J. Kira, T. Iwamasa, I. Goto and N. Yamamoto (1993). "In vivo infection of human T-cell leukemia virus type I in non-T cells." Virology **196**(1): 25-33.
- Kronenberg, M. and L. Gapin (2002). "The unconventional lifestyle of NKT cells." Nat Rev Immunol **2**(8): 557-568.
- Kubota, R., T. Kawanishi, H. Matsubara, A. Manns and S. Jacobson (1998). "Demonstration of human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) tax-specific CD8+ lymphocytes directly in peripheral blood of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients by intracellular cytokine detection." J Immunol **161**(1): 482-488.
- LaGrenade, L., B. Hanchard, V. Fletcher, B. Cranston and W. Blattner (1990). "Infective dermatitis of Jamaican children: a marker for HTLV-I infection." Lancet **336**(8727): 1345-1347.
- Li, H. C., R. J. Biggar, W. J. Miley, E. M. Maloney, B. Cranston, B. Hanchard and M. Hisada (2004). "Provirus load in breast milk and risk of mother-to-child transmission of human T lymphotropic virus type I." J Infect Dis **190**(7): 1275-1278.
- Lo, K. M., E. Vivier, N. Rochet, G. Dehni, H. Levine, W. A. Haseltine and P. Anderson (1992). "Infection of human natural killer (NK) cells with replication-defective human T cell leukemia virus type I provirus. Increased proliferative capacity and prolonged survival of functionally competent NK cells." J Immunol **149**(12): 4101-4108.
- Ma, G., J. Yasunaga and M. Matsuoka (2016). "Multifaceted functions and roles of HBZ in HTLV-1 pathogenesis." Retrovirology **13**: 16.
- Macatonia, S. E., J. K. Cruickshank, P. Rudge and S. C. Knight (1992). "Dendritic cells from patients with tropical spastic paraparesis are infected with HTLV-1 and stimulate autologous lymphocyte proliferation." AIDS Res Hum Retroviruses **8**(9): 1699-1706.

- Macnamara, A., A. Rowan, S. Hilburn, U. Kadolsky, H. Fujiwara, K. Suemori, M. Yasukawa, G. Taylor, C. R. Bangham and B. Asquith (2010). "HLA class I binding of HBZ determines outcome in HTLV-1 infection." *PLoS Pathog* **6**(9): e1001117.
- Manel, N., J. L. Battini, N. Taylor and M. Sitbon (2005). "HTLV-1 tropism and envelope receptor." *Oncogene* **24**(39): 6016-6025.
- Marcenaro, E., S. Carlomagno, S. Pesce, M. Della Chiesa, S. Parolini, A. Moretta and S. Sivori (2011). "NK cells and their receptors during viral infections." *Immunotherapy* **3**(9): 1075-1086.
- Matsubara, F., K. Haraguchi, K. Harada and A. Koizumi (2012). "Screening for antibodies to human T-cell leukemia virus type I in Japanese breast milk." *Biol Pharm Bull* **35**(5): 773-776.
- Moretta, L., R. Biassoni, C. Bottino, C. Cantoni, D. Pende, M. C. Mingari and A. Moretta (2002). "Human NK cells and their receptors." *Microbes Infect* **4**(15): 1539-1544.
- Moretta, L., C. Bottino, D. Pende, R. Castriconi, M. C. Mingari and A. Moretta (2006). "Surface NK receptors and their ligands on tumor cells." *Semin Immunol* **18**(3): 151-158.
- Nagai, M., M. B. Brennan, J. A. Sakai, C. A. Mora and S. Jacobson (2001). "CD8(+) T cells are an in vivo reservoir for human T-cell lymphotropic virus type I." *Blood* **98**(6): 1858-1861.
- Nagai, M. and M. Osame (2002). "Pathogenesis and treatment of human T-cell lymphotropic virus Type I-associated myelopathy." *Expert Rev Neurother* **2**(6): 891-899.
- Nagai, M. and M. Osame (2003). "Human T-cell lymphotropic virus type I and neurological diseases." *J Neurovirol* **9**(2): 228-235.
- Nagai, M., K. Usuku, W. Matsumoto, D. Kodama, N. Takenouchi, T. Moritoyo, S. Hashiguchi, M. Ichinose, C. R. Bangham, S. Izumo and M. Osame (1998). "Analysis of HTLV-I proviral load in 202 HAM/TSP patients and 243 asymptomatic HTLV-I carriers: high proviral load strongly predisposes to HAM/TSP." *J Neurovirol* **4**(6): 586-593.
- Nagai, M., Y. Yamano, M. B. Brennan, C. A. Mora and S. Jacobson (2001). "Increased HTLV-I proviral load and preferential expansion of HTLV-I Tax-specific CD8+ T cells in cerebrospinal fluid from patients with HAM/TSP." *Ann Neurol* **50**(6): 807-812.
- Nagasato, K., T. Nakamura, S. Shirabe, K. Shibayama, K. Ohishi, K. Ichinose, M. Tsujihata and S. Nagataki (1991). "Presence of serum anti-human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) IgM antibodies means persistent active replication of HTLV-I in HTLV-I-associated myelopathy." *J Neurol Sci* **103**(2): 203-208.
- Nagler, A., L. L. Lanier, S. Cwirla and J. H. Phillips (1989). "Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells." *J Immunol* **143**(10): 3183-3191.
- Ndhlovu, L. C., J. E. Snyder-Cappione, K. I. Carvalho, F. E. Leal, C. P. Loo, F. R. Bruno, A. R. Jha, D. Devita, A. M. Hasenkrug, H. M. Barbosa, A. C. Segurado, D. F. Nixon, E. L. Murphy and E. G. Kallas (2009). "Lower numbers of circulating Natural Killer T (NK T) cells

in individuals with human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) associated neurological disease." Clin Exp Immunol **158**(3): 294-299.

Nielsen, N., N. Odum, B. Urso, L. L. Lanier and P. Spee (2012). "Cytotoxicity of CD56(bright) NK cells towards autologous activated CD4+ T cells is mediated through NKG2D, LFA-1 and TRAIL and dampened via CD94/NKG2A." PLoS One **7**(2): e31959.

Norris, P. J., D. F. Hirschhorn, D. A. DeVita, T. H. Lee and E. L. Murphy (2010). "Human T cell leukemia virus type 1 infection drives spontaneous proliferation of natural killer cells." Virulence **1**(1): 19-28.

Olindo, S., A. Lezin, P. Cabre, H. Merle, M. Saint-Vil, M. Edimonana Kaptue, A. Signate, R. Cesaire and D. Smadja (2005). "HTLV-1 proviral load in peripheral blood mononuclear cells quantified in 100 HAM/TSP patients: a marker of disease progression." J Neurol Sci **237**(1-2): 53-59.

Paiva, A. and J. Casseb (2014). "Sexual transmission of human T-cell lymphotropic virus type 1." Rev Soc Bras Med Trop **47**(3): 265-274.

Parker, C. E., S. Daenke, S. Nightingale and C. R. Bangham (1992). "Activated, HTLV-1-specific cytotoxic T-lymphocytes are found in healthy seropositives as well as in patients with tropical spastic paraparesis." Virology **188**(2): 628-636.

Pellicci, D. G., A. J. Clarke, O. Patel, T. Mallewaey, T. Beddoe, J. Le Nours, A. P. Uldrich, J. McCluskey, G. S. Besra, S. A. Porcelli, L. Gapin, D. I. Godfrey and J. Rossjohn (2011). "Recognition of beta-linked self glycolipids mediated by natural killer T cell antigen receptors." Nat Immunol **12**(9): 827-833.

Poiesz, B. J., F. W. Ruscetti, A. F. Gazdar, P. A. Bunn, J. D. Minna and R. C. Gallo (1980). "Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(12): 7415-7419.

Proietti, F. A., A. B. Carneiro-Proietti, B. C. Catalan-Soares and E. L. Murphy (2005). "Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases." Oncogene **24**(39): 6058-6068.

Raulet, D. H. (2003). "Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands." Nat Rev Immunol **3**(10): 781-790.

Sabouri, A. H., M. Saito, K. Usuku, S. N. Bajestan, M. Mahmoudi, M. Forughipour, Z. Sabouri, Z. Abbaspour, M. E. Goharjoo, E. Khayami, A. Hasani, S. Izumo, K. Arimura, R. Farid and M. Osame (2005). "Differences in viral and host genetic risk factors for development of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis between Iranian and Japanese HTLV-1-infected individuals." J Gen Virol **86**(Pt 3): 773-781.

Saito, M. and C. R. Bangham (2012). "Immunopathogenesis of human T-cell leukemia virus type-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: recent perspectives." Leuk Res Treatment **2012**: 259045.

- Saito, M., V. M. Braud, P. Goon, E. Hanon, G. P. Taylor, A. Saito, N. Eiraku, Y. Tanaka, K. Usuku, J. N. Weber, M. Osame and C. R. Bangham (2003). "Low frequency of CD94/NKG2A+ T lymphocytes in patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis, but not in asymptomatic carriers." *Blood* **102**(2): 577-584.
- Santos, S. B., A. F. Porto, A. L. Muniz, A. R. de Jesus, E. Magalhaes, A. Melo, W. O. Dutra, K. J. Gollob and E. M. Carvalho (2004). "Exacerbated inflammatory cellular immune response characteristics of HAM/TSP is observed in a large proportion of HTLV-I asymptomatic carriers." *BMC Infect Dis* **4**: 7.
- Seich Al Basatena, N. K., A. Macnamara, A. M. Vine, C. L. Thio, J. Astemborski, K. Usuku, M. Osame, G. D. Kirk, S. M. Donfield, J. J. Goedert, C. R. Bangham, M. Carrington, S. I. Khakoo and B. Asquith (2011). "KIR2DL2 enhances protective and detrimental HLA class I-mediated immunity in chronic viral infection." *PLoS Pathog* **7**(10): e1002270.
- Souza, A., D. Tanajura, C. Toledo-Cornell, S. Santos and E. M. Carvalho (2012). "Immunopathogenesis and neurological manifestations associated to HTLV-1 infection." *Rev Soc Bras Med Trop* **45**(5): 545-552.
- Spaan, M., G. W. van Oord, H. L. Janssen, R. J. de Knecht and A. Boonstra (2015). "Longitudinal analysis of peripheral and intrahepatic NK cells in chronic HCV patients during antiviral therapy." *Antiviral Res* **123**: 86-92.
- Starling, A. L., J. G. Coelho-Dos-Reis, V. Peruhype-Magalhaes, M. A. Pascoal-Xavier, D. U. Goncalves, S. R. Bela, J. R. Lambertucci, L. Labanca, S. R. Souza Pereira, A. Teixeira-Carvalho, J. G. Ribas, B. C. Trindade, L. H. Faccioli, A. B. Carneiro-Proietti and O. A. Martins-Filho (2015). "Immunological signature of the different clinical stages of the HTLV-1 infection: establishing serum biomarkers for HTLV-1-associated disease morbidity." *Biomarkers* **20**(6-7): 502-512.
- Stern-Ginossar, N., C. Gur, M. Biton, E. Horwitz, M. Elboim, N. Stanietsky, M. Mandelboim and O. Mandelboim (2008). "Human microRNAs regulate stress-induced immune responses mediated by the receptor NKG2D." *Nat Immunol* **9**(9): 1065-1073.
- Talledo, M., G. Lopez, J. R. Huyghe, K. Verdonck, E. Gonzalez, D. Clark, G. Vanham, E. Gotuzzo, G. Van Camp and L. Van Laer (2012). "Possible implication of NFKB1A and NKG2D genes in susceptibility to HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in Peruvian patients infected with HTLV-1." *J Med Virol* **84**(2): 319-326.
- Tedder, R. S., D. C. Shanson, D. J. Jeffries, R. Cheingsong-Popov, P. Clapham, A. Dalglish, K. Nagy and R. A. Weiss (1984). "Low prevalence in the UK of HTLV-I and HTLV-II infection in subjects with AIDS, with extended lymphadenopathy, and at risk of AIDS." *Lancet* **2**(8395): 125-128.
- Thiery, J., D. Keefe, S. Boulant, E. Boucrot, M. Walch, D. Martinvalet, I. S. Goping, R. C. Bleackley, T. Kirchhausen and J. Lieberman (2011). "Perforin pores in the endosomal membrane trigger the release of endocytosed granzyme B into the cytosol of target cells." *Nat Immunol* **12**(8): 770-777.

Tschachler, E., E. Bohnlein, S. Felzmann and M. S. Reitz, Jr. (1993). "Human T-lymphotropic virus type I tax regulates the expression of the human lymphotoxin gene." Blood **81**(1): 95-100.

Uchiyama, T., T. Ishikawa and A. Imura (1996). "Cell adhesion molecules in HTLV-I infection." J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol **13 Suppl 1**: S114-118.

Uchiyama, T., J. Yodoi, K. Sagawa, K. Takatsuki and H. Uchino (1977). "Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases." Blood **50**(3): 481-492.

Vine, A. M., A. G. Heaps, L. Kaftantzi, A. Mosley, B. Asquith, A. Witkover, G. Thompson, M. Saito, P. K. Goon, L. Carr, F. Martinez-Murillo, G. P. Taylor and C. R. Bangham (2004). "The role of CTLs in persistent viral infection: cytolytic gene expression in CD8+ lymphocytes distinguishes between individuals with a high or low proviral load of human T cell lymphotropic virus type 1." J Immunol **173**(8): 5121-5129.

Vine, A. M., A. D. Witkover, A. L. Lloyd, K. J. Jeffery, A. Siddiqui, S. E. Marshall, M. Bunce, N. Eiraku, S. Izumo, K. Usuku, M. Osame and C. R. Bangham (2002). "Polygenic control of human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) provirus load and the risk of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis." J Infect Dis **186**(7): 932-939.

Walsh, K. B., M. B. Lodoen, R. A. Edwards, L. L. Lanier and T. E. Lane (2008). "Evidence for differential roles for NKG2D receptor signaling in innate host defense against coronavirus-induced neurological and liver disease." J Virol **82**(6): 3021-3030.

Wang, Y., J. Wu, R. Newton, N. S. Bahaie, C. Long and B. Walcheck (2013). "ADAM17 cleaves CD16b (FcγRIIIb) in human neutrophils." Biochim Biophys Acta **1833**(3): 680-685.

Yoshida, M. (2001). "Multiple viral strategies of HTLV-1 for dysregulation of cell growth control." Annu Rev Immunol **19**: 475-496.

Yu, F., Y. Itoyama, K. Fujihara and I. Goto (1991). "Natural killer (NK) cells in HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis-decrease in NK cell subset populations and activity in HTLV-I seropositive individuals." J Neuroimmunol **33**(2): 121-128.

Zafirova, B., F. M. Wensveen, M. Gulin and B. Polic (2011). "Regulation of immune cell function and differentiation by the NKG2D receptor." Cell Mol Life Sci **68**(21): 3519-3529.

ANEXOS

ANEXO 1

Artigos publicados durante o período do mestrado e doutorado PPgCS

Search results

Items: 3

- [In Vitro Immunomodulatory Activity of a Transition-State Analog Inhibitor of Human Purine Nucleoside Phosphorylase in Cutaneous Leishmaniasis.](#)
 1. Carvalho NB, de Oliveira Prates FV, da Silva RC, Dourado MEF, **Amorim CF**, Machado PRL, Pacheco FG, Corte TWF, Machado P, Santos DS, de **Carvalho EM**.
J Immunol Res. 2017;2017:3062892. doi: 10.1155/2017/3062892. Epub 2017 Aug 27.
PMID: 28929123 **Free PMC Article**
[Similar articles](#)

- [Age modifies the immunologic response and clinical presentation of American tegumentary leishmaniasis.](#)
 2. Carvalho AM, **Amorim CF**, Barbosa JL, Lago AS, **Carvalho EM**.
Am J Trop Med Hyg. 2015 Jun;92(6):1173-7. doi: 10.4269/ajtmh.14-0631. Epub 2015 Apr 27.
PMID: 25918209 **Free PMC Article**
[Similar articles](#)

- [Functional activity of monocytes and macrophages in HTLV-1 infected subjects.](#)
 3. **Amorim CF**, Souza AS, Diniz AG, Carvalho NB, Santos SB, **Carvalho EM**.
PLoS Negl Trop Dis. 2014 Dec 18;8(12):e33399. doi: 10.1371/journal.pntd.0003399. eCollection 2014 Dec.
PMID: 25521499 **Free PMC Article**
[Similar articles](#)

ANEXO 2

Manuscritos submetidos no ano de 2017

Journal: Plos ONE

Title: Inhibitory activity of pentacyano(isoniazid)ferrate(II), IQG-607, against promastigotes and amastigotes forms of *Leishmania braziliensis*

Authors: Camila F. Amorim¹, Luiza Galina^{2,3}, Natália B. Carvalho¹, Nathalia D. M. Sperotto^{2,4}, Kenia Pissinate², Pablo Machado^{2,3}, Maria M. Campos^{4,5}, Luiz A. Basso^{2,3,4}, Valnês S. Rodrigues-Junior^{2,4,*}, Edgar M. Carvalho^{1,6,7,*}, Diógenes Santiago Santos^{2,3}

Institutions: ¹Serviço de Imunologia, Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil. ²Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brazil. ³Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS, Porto Alegre, Brazil. ⁴Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS, Porto Alegre, Brazil. ⁵Instituto de Toxicologia e Farmacologia, PUCRS, Porto Alegre, Brazil. ⁶Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais, Salvador, Bahia, Brazil. ⁷Instituto de Pesquisa Gonçalo Muniz – Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia, Brazil.

Abstract: *M. tuberculosis* and parasites of the genus *leishmania* have the type II fatty acid biosynthesis system (FASII). The pentacyano(isoniazid)ferrate(II) compound, named IQG-607, inhibits the enzyme 2-trans-enoyl-ACP(CoA) reductase, a key component in the FASII system. Here, we aimed to evaluate the inhibitory activity of IQG-607 against promastigotes and amastigotes forms of *Leishmania (Viannia) braziliensis* isolated from patients with different clinical forms of *L. braziliensis* infection, cutaneous, mucosal and disseminated leishmaniasis. Importantly, IQG-607 inhibited the proliferation of three different isolates of *L. braziliensis* promastigotes associated with cutaneous, mucosal and disseminated leishmaniasis. The IC₅₀ values for IQG-607 were in the range of 0.015 and 0.035 mg/mL, for these forms. Additionally, IQG-607 treatment decreased the proliferation of intracellular amastigotes in infected macrophages, after analysis of the percentage of infected cells and number of intracellular parasites/100 cells. IQG-607 reduced from 58% to 98% the proliferation of *L. braziliensis* from cutaneous, mucosal and disseminated strains. Moreover, IQG-607 was also evaluated regarding its potential toxic profile, by using different cell lines. IQG-607, even at high concentrations, did not affect cellular viability of Vero, HaCat and HepG2 cell lines. Importantly, IQG-607, even used in a high concentration of 0.4 mg/ml, did

not induce DNA damage in HepG2 cells, when compared to the untreated control group. Future studies will confirm the mechanism of action of IQG-607 against *L. braziliensis*.

Journal: Plos Neglected of Tropical Diseases

Title: Participation of NK cells in the control of viral infection in HTLV-1 carriers

Authors: Camila F. Amorim¹, Natália B. Carvalho¹, José Abraão Neto¹, Silvane B. Santos^{1,2}, Fernanda Grassi³, Lucas P. Carvalho^{1,3,4}, Edgar M. Carvalho^{1,3,4}

Institutions: ¹Serviço de Imunologia, Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil. ²Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia, Brazil. ³Laboratório de Pesquisas Clínicas do Instituto de Pesquisas Gonçalo Muniz – Fiocruz/Bahia, Brazil. ⁴Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia de Doenças Tropicais (CNPq), Salvador, Bahia, Brazil.

Abstract: The cytotoxic activities of CD8+ T cells has been considered the main defense mechanism against the human T lymphotropic virus type I (HTLV-1). Similar to CD8+ T cells, NK cells are able to perform a cytotoxic degranulation with production of cytotoxic mediators, such as perforins and granzymes. NK cells are also responsible for the antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) against infected cells, but few studies have evaluated the role of NK cells in HTLV-1 infection. The aim of this study was to characterize the subsets and measure the frequency of NK cells in HTLV-1 carriers (HC) and in patients with HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP), and correlate these findings with the proviral load and development of HAM/TSP. The diagnosis of HTLV-1 infection was performed by detection antibody against viral antigens by ELISA and confirmed by Western blot. Phenotypic characterization of NK cells was performed by flow cytometry. The frequencies of CD56+, CD56+CD3-, CD56+CD16+, CD56dim and CD56+CD16bright were decreased in HAM/TSP patients and inversely correlated with proviral load in HTLV-1 infected subjects. The frequency of CD56+CD3- cells was inversely correlated with proviral load in HC but not in HAM/TSP patients. HAM/TSP patients showed decreased frequency of CD56+ and CD56dim cells expressing CD16, main receptor for ADCC. These data indicate that NK cells may play key role in the control of HTLV-1 infection preventing the progression of HC to HAM/TSP.

ANEXO 3

Termo de Comprometimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Controles

Nome do Projeto: Resposta Imunológica, Fatores Virais e Infecções por Helmintos na Expressão da Doença Associada ao HTLV-1

Investigador Principal: Edgar M. Carvalho, médico, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Rua João das Botas s/n, Canela, 40110-160, Salvador-Bahia-Brasil.

Comitê de Ética: Maternidade Climério de Oliveira/UFBA, Rua do Limoeiro, nº 137 - Nazaré Cep.: 40.055-150 Salvador, BA, 55 71 3283-9210/9211, cepmco@ufba.br/cepmco@gmail.com

Nome do Participante: _____

Número de Identificação no Projeto: _____

Convite e Objetivo: Você é convidado a participar de um estudo que tem como objetivo avaliar as razões pelas quais alguns pacientes apresentam doença neurológica associada à infecção pelo HTLV-1. Além das informações aqui presentes você pode perguntar tudo sobre o estudo aos médicos que fazem parte do projeto. Antes de concordar em participar desta pesquisa é importante que você leia este documento, e caso decida participar do estudo você será solicitado (a) a assinar este formulário de consentimento.

Você foi selecionado como um possível participante nesse estudo porque você doou sangue a um banco de sangue em Salvador, Bahia e foi identificado como NÃO estando infectado pelo vírus HTLV-1.

Participação Voluntária:

A sua participação no estudo é voluntária e você estará contribuindo para o melhor entendimento da doença causada pelo vírus HTLV-1. Sua participação nesse estudo será de apenas 1 dia. Você é livre para recusar a participar no estudo, sem perder os seus direitos a cuidados médicos de rotina e sem nenhuma consequência quanto a futuros cuidados médicos no Hospital Universitário Prof. Edgard Santos.

Finalidade do Estudo: O objetivo desse estudo é entender as razões porque pessoas desenvolvem uma doença neurológica associada ao HTLV-1 e quais outros sintomas elas podem vir a desenvolver por causa dessa infecção.

Procedimentos: Caso você decida participar do estudo será solicitado que você doe trinta mililitros de sangue (mais ou menos 2 colheres de sopa) que vão ser usados para avaliar sua resposta imunológica (sua capacidade de combater infecções).

Confidencialidade: Qualquer informação obtida durante este estudo será confidencial sendo apenas compartilhada com outros membros da equipe científica. Os resultados serão divulgados na forma de comunicação científica, não permitindo a identificação individual dos participantes.

Análises de Riscos e Benefícios:

A retirada de sangue nos pacientes pode provocar dor leve devido à punção com agulha. Em casos raros se acompanha de sangramento ou mancha na pele. A retirada de sangue venoso é um procedimento médico de rotina, e todos os cuidados apropriados serão tomados.

Retorno de Benefícios para o Sujeito e para a Sociedade: Muito pouco se sabe a respeito dos sintomas iniciais da doença neurológica associada ao HTLV-1. O objetivo do presente estudo é identificar anormalidades imunológicas associadas ao HTLV-1. O conhecimento adquirido através desse estudo poderá no futuro ajudar pessoas infectadas pelo HTLV-1, pois permitirá identificar precocemente pessoas propensas a desenvolver problemas neurológicos e neste caso poder realizar precocemente tratamento na perspectiva de evitar o desenvolvimento da doença. Desta

Café
 Claudia Albuquerque Dias
 Secretária Administrativa
 Comitê de Ética em Pesquisa
 CEP/MC/UFBA

08/11/11

forma, o estudo não traz para você nenhum benefício mas ajudará os indivíduos que são infectados pelo HTLV-1.

Custos: Você não terá quaisquer custos com os exames de laboratório ou com a avaliação médica. Você não receberá nenhum pagamento por sua participação nesse estudo. Adicionalmente as suas despesas com transporte e alimentação para participar no estudo serão pagas pelo projeto.

Esclarecimentos:

Caso tenha alguma pergunta ou apresente alguma complicação relacionada aos procedimentos realizados na pesquisa, você pode contatar pelo telefone 3237-7353 os pesquisadores: Dr. Edgar M. Carvalho e Dr. André Luiz Muniz, no Serviço de Imunologia do HUPES-UFBA, Rua João das Botas, s/n – Canela, telefone (071) 3237-7353, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa CEP/COM/UFBA, na pessoa do Dr. Eduardo Neto, Maternidade Climério de Oliveira/UFBA, Rua do Limoeiro, nº 137 – Nazaré, Cep.: 40.055-150 Salvador, BA, 55 71 3283-9210/9211, cepmco@ufba.br/cepmco@gmail.com

Consentimento:

Se você leu o consentimento informado ou este lhe foi explicado e você concorda em participar do estudo, favor assinar o nome abaixo. A você será entregue uma cópia deste formulário para guardar.

- Sim, eu concordo que a amostra de sangue possa ser guardada para pesquisa no futuro.
- Não, eu não concordo que a amostra de sangue possa ser guardada para pesquisa no futuro.

_____	_____	_____
Assinatura do participante	Data	Hora
_____	_____	_____
Assinatura da testemunha	Data	Hora

COMPROMISSO DO PESQUISADOR

Discuti as questões acima apresentadas com os participantes do estudo. É minha opinião que o indivíduo entende os riscos, benefícios e direitos relacionados a este projeto.

_____	_____	_____
Assinatura do pesquisador	Data	Hora

Claudia 08/11/11
 Claudia Albuquerque Dias
 Secretária Administrativa
 Comitê de Ética em Pesquisa
 CEP/COM/UFBA

ANEXO 4

Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa



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


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

PARECER/RESOLUÇÃO ADITIVA N.º 35/2013

Para análise e deliberação deste Institucional o Professor, Doutor, **Edgar Marcelino de Carvalho Filho**, Pesquisador Responsável pelo Projeto de Pesquisa “Resposta imunológica, fatores virais e infecções por helmintos na expressão de doença associada ao HTLV-1”, aprovado em 30 de Abril de 2008 pelo Parecer/Resolução n.º 030/2008 deste Colegiado, apresentou, em 17 de Julho de 2013, o “Relatório Anual” das atividades desenvolvidas, bem como o pedido de prorrogação do Estudo.

Inexistindo na proposição analisada conflito administrativo, processual e ético que contrariem as disposições vigentes, fica aceito o “Relatório” além de conceder a continuidade por mais 01 (um) ano da Pesquisa, a partir desta data.

Salvador, 24 de Julho de 2013.


 Professor, Doutor, Eduardo Martins Netto.
 Coordenador – CEP/MCO/UFBA

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