



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS**

JÉSSICA ANTONIA NUNES GOMES

ESTUDO DA FUNÇÃO TÍMICA EM PORTADORES DE HTLV-1 COM PET/MAH

**BELÉM
2017**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS**

JÉSSICA ANTONIA NUNES GOMES

ESTUDO DA FUNÇÃO TÍMICA EM PORTADORES DE HTLV-1 COM PET/MAH

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, como requisito para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais pelo Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará.

Orientadora: Hellen Thaís Fuzii

Área de Concentração: Patologia das Doenças Tropicais.

**BELÉM
2017**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFPA**

Gomes, Jéssica Antonia Nunes

Estudo da função tímica em portadores de HTLV-1 com PET/MAH /
Jéssica Antonia Nunes Gomes; orientadora, Hellen Thaís Fuzii. — 2017.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará. Núcleo de
Medicina Tropical. Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais.
Belém, 2017.

1. HTLV - 1. 2. Função tímica. 3. PET/MAH. I. Fuzii, Hellen Thaís, orient. II.
Título.

CDD - 22. ed. 616.9792

Jéssica Antonia Nunes Gomes

Estudo da função tímica em portadores de HTLV-1 com PET/MAH

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará.

Aprovado em: ____/____/____

Conceito: _____

Banca Examinadora

Profª Drª Hellen Thaís Fuzii
Orientadora – NMT/UFPA

Prof. Dr. George Alberto da Silva Dias
Membro da Banca – CCBS/UEPA

Profª Drª Tinara Leila de Souza Aarão
Membro da Banca – ICS/UFPA

Profª Drª Rita Catarina Medeiros Sousa
Membro da Banca – ICS/UFPA

Dedico esta dissertação à minha família que sempre esteve ao meu lado com todo o seu apoio, carinho e amor independente das minhas escolhas.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Profa. Dra. Hellen Thais Fuzii

À minha orientadora só tenho a agradecer e dizer: obrigada por permitir que eu integrasse a equipe do Laboratório de Imunopatologia, obrigada por apresentar-me o mundo da pesquisa e da biologia molecular, obrigada por passar seus conhecimentos de forma tão simples e tranquila, obrigada por acreditar (mesmo quando eu mesma não acredito) e depositar tamanha confiança em mim, obrigada por fazer este trabalho ser possível, obrigada por ser realmente como uma “mãe científica” elogiando e chamando atenção nos momentos mais necessários, obrigada por fazer do Laboratório de Imunopatologia uma segunda família, obrigada por ser um exemplo de profissional e pessoa a ser seguido (que eu quero seguir). São muitas repetições da palavra “obrigada”, mas elas são uma pequena parcela da imensa gratidão que possuo pela minha orientadora Prof^a Dr^a Hellen Fuzii.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter segurado minha mão e me guiado nos caminhos até aqui.

À minha família, que sempre dedicou todo seu amor por mim. Meus pais, Maria de Lourdes e Robson, por permitirem que eu seguisse todos os meus sonhos; Minha avó Antonia e meu avô Vivaldo (que não está mais entre nós), que sempre priorizaram o meu bem-estar; minha irmã, Juliana, que além de irmã é uma amiga; e meu namorado Marcos, que em todos esses anos sempre esteve ao meu lado apoiando todas as minhas escolhas.

À Universidade Federal do Pará (UFPA), que é a minha segunda casa desde a graduação em Enfermagem até aqui, sempre trazendo novos conhecimentos e desafios.

Ao Núcleo de Medicina Tropical (NMT) por proporcionar crescimento em termos acadêmicos e profissionais, tanto na Especialização em Biotecnologia Aplicada à Saúde quanto no Mestrado em Doenças Tropicais.

Ao coordenador do Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais Prof. Dr. Givago Souza, às secretárias Socorro e Renata e a todos os professores que fizeram parte da minha formação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Aos colegas do “grupo do HTLV”, Prof. Me. Gilberto Yoshikawa, Profa. Me. Roberta Koyama e Profa. Me. Satomi Fujihara, pelo auxílio na coleta de dados, apoio e parceria durante as disciplinas; Prof. Me. Victor Cavaleiro que dividiu seu conhecimento e trouxe calma para alguns dias conturbados; e Prof. Dr. George Dias que com paciência ensinou-me técnicas de biologia molecular e sempre se dispôs a ajudar no que fosse necessário. Sem eles esse trabalho não poderia ser realizado.

À equipe do Laboratório de Clínica e Epidemiologia de Doenças Endêmicas do NMT, em especial à Profa. Dra. Rita Medeiros que viabilizou a realização deste trabalho

À Profa. Dra. Luisa Caricio e ao Prof. Me. Mário Ribeiro que proporcionaram a minha entrada como intérprete nas expedições dos estudantes de Medicina da Universidade de Michigan aqui no Pará, permitindo que eu conhecesse o NMT.

Aos Prof. Dr. Juarez Quaresma, Profa. Dra. Marizelle Araújo, Profa. Dra. Fabíola Villanova, Prof. Dra. Tinara Aarão, por sanarem dúvidas e serem sempre solícitos.

À Profa. Dra. Esther von Ledebur, por se tornar uma amiga muito querida, pelos conselhos e por me agradecer com sua “doçura alemã” sempre que necessário.

Aos companheiros de Laboratório: Elisa Soares por ensinar-me técnicas de biologia molecular e ser a primeira pessoa com quem fiz amizade no Laboratório; Allef França pela nossa amizade desde os primeiros dias no Laboratório; Eduardo Valente por sempre ser um bom ouvinte; Eric por se esforçar em fazer meu inglês melhorar; Roberto Júnior pela amizade e conversas sobre jogos; Larysse Pedroza por sempre se mostrar solícita e amiga; Amanda Raiol, por conversas aleatórias e divertidas; Carolina Moraes pela amizade e pelo seu docinho de queijo; Wesley, por indicar filmes ruins e Yana pelas conversas e pela amizade. Por todos tenho muito apreço e carinho, pois ajudaram a fazer com que meus dias no Laboratório fossem mais leves e divertidos.

Aos amigos que a vida entregou na adolescência e trago até hoje: Alana, Andrew, Ana Laura, Camila, Danielly, David, Diego, Jahyr, João, João Lucas, Júlia, Lissa, Lucas, Messias, Otávio, Wirland, Suzana e Tadeu. E a Mariana que a graduação em Enfermagem trouxe. Obrigada por fazerem parte dos meus momentos de descontração e por sempre estarem ao meu lado.

Aos pacientes que dispuseram parte do seu tempo e depositaram sua confiança no projeto que deu origem a este trabalho.

Á todos que contribuíram de alguma forma, direta ou indiretamente, na realização deste trabalho, meu mais sincero obrigada.

“Uma mente necessita de livros da mesma forma que uma espada necessita de uma pedra de amolar, se quisermos que se mantenha afiada.”

George R. R. Martin

RESUMO

Dos portadores de HTLV-1, 90% permanecem assintomáticos, 2-3% desenvolvem Leucemia Linfoma de Células T do Adulto (LLcTA) e 0,25-4% desenvolvem Paraparesia Espástica Tropical/ Mielopatia Associada ao HTLV (PET/MAH). Na PET/MAH, são encontrados infiltrados de células T CD8+ específicas na medula que destroem as células T CD4+ infectadas, levando a uma resposta imunológica ativada crônica. As células T recém-emigradas do timo (ou células T *naïve*) possuem círculos excisados pelo rearranjo do gene do receptor de células T (TREC) que não duplicam na proliferação celular, sendo um bom indicador para quantificar o número de células T *naïve* e assim avaliar a função tímica. O presente estudo almejou Verificar a função tímica de pacientes portadores da infecção pelo vírus HTLV-1 através da quantificação do número de TREC em células mononucleares do sangue periférico. Trata-se de um estudo transversal analítico, realizado com 39 pacientes, acima de 18 anos, divididos em dois grupos: com PET/MAH (PET) e sem PET/MAH (NPET). Foi realizada avaliação clínica e fisioterapêutica, coleta de sangue, separação das células linfomononucleares, extração de DNA e RNA, curva absoluta de TREC, quantificação de DNA e RNA, detecção e quantificação de partículas TREC, síntese de cDNA, expressão gênica da citocina IL-7 e análise estatística com os testes de Mann-Whitney e correlação de Spearman, com o valor de $p \leq 0,05$ como nível de significância. Dos 39 pacientes estudados, dois foram excluídos do estudo por apresentarem doença autoimune. Quanto à comparação entre grupos da quantificação de TREC: há diferença entre o grupo PET e NPET ($p = 0,01$), nos pacientes com idade ≤ 59 anos entre os grupos PET e NPET ($p = 0,04$), nas pacientes do sexo feminino entre o grupo PET e NPET ($p = 0,003$) e o grupo com cadeira de rodas e sem cadeira de rodas ($p = 0,05$). Já com relação à comparação da expressão gênica de IL-7 entre grupos: no grupo NPET há diferença entre o grupo ≤ 59 anos e o ≥ 60 anos ($p = 0,02$), no sexo feminino há diferença entre o grupo PET e NPET ($p = 0,04$). A função tímica mostrou-se prejudicada em pacientes portadores de HTLV-1 com PET/MAH comparados àqueles sem PET/MAH, pois houve um prejuízo na produção de células T *naïve* nessa população, mostrada através das diferenças entre variáveis tanto no grupo PET e NPET com relação à quantificação de TREC. Apesar de ainda não estar clara a importância deste comprometimento no desencadeamento e/ou evolução da PET/MAH, infere-se que a redução da produção de células T *naïve* pode alterar a resposta imunológica nesses pacientes, repercutindo diretamente no quadro clínico dos mesmos.

Palavras-chave: HTLV-1. PET/MAH. TREC. Função tímica.

ABSTRACT

In HTLV-1 infections 90% of carriers remain asymptomatic, 2-3% develop Adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) and 0.25-4% develop HTLV-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). In HAM/TSP, specific CD8 + T cell infiltrates are found in the marrow that destroy infected CD4 + T cells, leading to a chronic activated immune response. Recently emigrated T cells (or naïve T cells) have excised circles by the rearrangement of T cell receptor (TREC) genes that do not double in cell proliferation, being a good indicator to quantify the number of naïve T cells and thus evaluate the thymic function. This study aimed to verify the thymic function of patients with HTLV-1 infection by quantifying the number of TREC in peripheral blood mononuclear cells. This is a cross-sectional, analytical study of 39 patients over 18 years of age, divided into two groups: HAM/TSP (PET) and without HAM/TSP (NPET). We performed a clinical and physiotherapeutic evaluation, blood collection, lymphomononuclear cell separation, DNA and RNA extraction, absolute TREC curve, DNA and RNA quantification, TREC particle detection and quantification, cDNA synthesis, cytokine IL-7 and statistical analysis with the Mann-Whitney tests and Spearman's correlation, with $p \leq 0.05$ as significance level. Of the 39 patients studied, two were excluded from the study because they presented autoimmune disease. Regarding the comparison between groups of TREC quantification: there was a difference between the PET and NPET groups ($p = 0.01$), in patients with age ≤ 59 years between the PET and NPET groups ($p = 0.04$), in the ($p = 0.003$) and the group with a wheelchair and without a wheelchair ($p = 0.05$). As for the comparison of IL-7 gene expression between groups: in the NPET group there was a difference between the group ≤ 59 years and the ≥ 60 years ($p = 0.02$), in the female there was a difference between the PET and NPET groups ($p = 0.04$). Thymic function was impaired in patients with HTLV-1 with HAM/TSP compared to those without HAM/TSP, as there was a loss in naïve T cell production in this population, shown by the differences between variables in both PET and NPET groups With respect to the quantification of TREC. Although the importance of this compromise in the triggering and / or evolution of HAM/TSP is not yet clear, it is inferred that the reduction of naïve T cell production can alter the immunological response in these patients, directly affecting their clinical picture.

Keywords: HTLV-1. HAM/TSP. TREC. Thymic function.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 – Distribuição da infecção por HTLV-1/2 em 27 hemocentros pertencentes a todos os estados do Brasil e Distrito Federal	22
Figura 02 – Estrutura do HTLV-1.....	23
Figura 03 – DNA proviral do HTLV-1	24
Figura 04 – Hipóteses para o desenvolvimento da PET/MAH com base na resposta imunológica do hospedeiro.....	29
Figura 05 – Desenvolvimento das células T no timo	34
Figura 06 - Formação do TREC	36
Gráfico 01 – Comparação de TREC em PET e NPET, dos pacientes portadores de HTLV-1 atendidos no Laboratório de Clínica e Epidemiologia de Doenças Endêmicas do NMT-UFPA, Belém-PA, 2010-2016.....	50
Gráfico 02 – (A) Comparação de TREC entre pacientes ≥ 60 e ≤ 59 PET (B) Comparação de TREC entre pacientes ≥ 60 e ≤ 59 NPET. (A) e (B) realizados em pacientes portadores de HTLV-1 atendidos no Laboratório de Clínica e Epidemiologia de Doenças Endêmicas do NMT-UFPA, Belém-PA, 2010-2016.....	51
Gráfico 03 – (A) Comparação de TREC entre PET e NPET em ≥ 60 . (B) Comparação de TREC entre PET e NPET em ≤ 59 . (A) e (B) realizados em pacientes portadores de HTLV-1 atendidos no Laboratório de Clínica e Epidemiologia de Doenças Endêmicas do NMT-UFPA, Belém-PA, 2010-2016	52
Gráfico 04 – (A) Correlação entre TREC e a idade em PET. (B) Correlação entre TREC e a idade em NPET. (A) e (B) realizados em pacientes portadores de HTLV-1 atendidos no Laboratório de Clínica e Epidemiologia de Doenças Endêmicas do NMT-UFPA, Belém-PA, 2010-2016.....	53
Gráfico 05 – (A) (A) Comparação de TREC entre PET e NPET em pacientes do sexo masculino (B) Comparação de TREC entre PET e NPET em pacientes do sexo feminino (A) e (B) realizados em pacientes portadores de HTLV-1 atendidos no Laboratório de Clínica e Epidemiologia de Doenças Endêmicas do NMT-UFPA, Belém-PA, 2010-2016	54
Gráfico 06 – (A) Comparação de TREC entre sexo masculino e feminino em PET (B) Comparação de TREC entre sexo masculino e feminino em NPET. (A) e (B) realizados em pacientes portadores de HTLV-1 atendidos no Laboratório de Clínica e Epidemiologia de Doenças Endêmicas do NMT-UFPA, Belém-PA, 2010-2016.....	55
Gráfico 07 – Comparação de TREC entre CAD e SCAD, em pacientes portadores de HTLV-1 atendidos no Laboratório de Clínica e Epidemiologia de Doenças Endêmicas do NMT-UFPA, Belém-PA, 2010-2016	56

Gráfico 08 – Comparação da expressão gênica de IL-7 entre PET e NPET, de pacientes portadores de HTLV-1 atendidos no Laboratório de Clínica e Epidemiologia de Doenças Endêmicas do NMT-UFPA, Belém-PA, 2010-2016..... 57

Gráfico 09 – **(A)** Comparação da expressão gênica de IL-7 entre ≥ 60 e ≤ 59 em PET **(B)** Comparação da expressão gênica de IL-7 entre ≥ 60 e ≤ 59 em NPET **(A)** e **(B)** realizados em pacientes portadores de HTLV-1 atendidos no Laboratório de Clínica e Epidemiologia de Doenças Endêmicas do NMT-UFPA, Belém-PA, 2010-2016..... 58

Gráfico 10 – **(A)** Comparação da expressão gênica de IL-7 entre PET e NPET em ≥ 60 . **(B)** Comparação da expressão gênica de IL-7 entre PET e NPET em ≤ 59 . **(A)** e **(B)** realizados em pacientes portadores de HTLV-1 atendidos no Laboratório de Clínica e Epidemiologia de Doenças Endêmicas do NMT-UFPA, Belém-PA, 2010-2016 59

Gráfico 11 – **(A)** Correlação entre a expressão gênica de IL-7 e idade em PET. **(B)** Correlação entre a expressão gênica de IL-7 e idade em NPET. **(A)** e **(B)** realizados em pacientes portadores de HTLV-1 atendidos no Laboratório de Clínica e Epidemiologia de Doenças Endêmicas do NMT-UFPA, Belém-PA, 2010-2016..... 60

Gráfico 12 – **(A)** Comparação da expressão gênica de IL-7 entre PET e NPET do sexo masculino. **(B)** Comparação da expressão gênica de IL-7 entre PET e NPET do sexo feminino. **(A)** e **(B)** realizados em pacientes portadores de HTLV-1 atendidos no Laboratório de Clínica e Epidemiologia de Doenças Endêmicas do NMT-UFPA, Belém-PA, 2010-2016. 61

Gráfico 13 – **(A)** Comparação da expressão gênica de IL-7 entre sexo masculino e feminino em PET. **(B)** Comparação da expressão gênica de IL-7 entre sexo masculino e feminino em NPET. **(A)** e **(B)** realizados em pacientes portadores de HTLV-1 atendidos no Laboratório de Clínica e Epidemiologia de Doenças Endêmicas do NMT-UFPA, Belém-PA, 2010-2016..... 61

Gráfico 14 – Comparação da expressão gênica de IL-7 entre CAD e SCAD, em pacientes portadores de HTLV-1 atendidos no Laboratório de Clínica e Epidemiologia de Doenças Endêmicas do NMT-UFPA, Belém-PA, 2010-2016..... 62

Gráfico 15 – **(A)** Correlação entre TREC e expressão gênica de IL-7 em PET **(B)** Correlação entre TREC e expressão gênica de IL-7 em NPET. **(A)** e **(B)** realizados em pacientes portadores de HTLV-1 atendidos no Laboratório de Clínica e Epidemiologia de Doenças Endêmicas do NMT-UFPA, Belém-PA, 2010-2016..... 63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ALT	Aminotransferase de Alanina
AST	Aminotransferase de Aspartate
CBP	<i>CREB-binding protein</i>
cDNA	DNA complementar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CCL22	<i>C-C motif chemokine 22</i>
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
CT	<i>Cyclethreshold</i>
CTCL	Linfoma Cutâneo de Células T
CWC	Column wash solution
CXCL10	<i>C-X-C motif chemokine 10</i>
DEPC	Dietil Pirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra acético
EIE	Ensaio Imunoenzimático
ERB	<i>Endotoxin removal wash</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>

GLUT-1	Transportador de Glicose 1
HBZ	<i>HTLV-1 basic leucine zipper</i>
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HLA-A*02	<i>Human Leukocyte Antigen Serotype A*02</i>
HLA-Cw*08	<i>Human Leukocyte Antigen Serotype Cw*08</i>
HSPGs	Proteoglicanos de Sulfato de Heparano
HTLV	Vírus linfotrópico de células T humanas
IFN-γ	Interferon gama
IL-13	Interleucina 13
IL-2	Interleucina 2
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-7	Interleucina 7
jsTREC	<i>joint signal TCR rearrangement excision circles</i>
LLcTA	Leucemia/Linfoma de Células T do Adulto
LB	Luria Bertani
LTRs	Repetições Terminais Longas
MHC-I	Complexo principal de histocompatibilidade classe I
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NK	Natural killer
NMT	Núcleo de Medicina Tropical

NRP-1	Neuropilina-1
ORF	Fases de leitura aberta
PBS	Tampão fosfato salino
PCAF	<i>P300/CBP-associated factor</i>
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
PET/MAH	Paraparesia Espástica Tropical/Mielopatia Associada ao HTLV
qPCR	Reação em Cadeia de Polimerase Quantitativa
RAG1	Gene de ativação de recombinação 1
RNA	Ácido ribonucleico
RNA_m	RNA mensageiro
RNA_{pol}	RNA polimerase
RNase	Ribonuclease
RPM	Rotações por minuto
RTE	<i>Recent thymic emigrant</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
TBE	Tris/Borato/EDTA
TCD4	Células T CD4+
TCD8	Células T CD8+
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCR	Receptor de células T
Th1	T-helper 1

Th2	T-helper 2
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TREC	Círculos Excisados do Receptor de Células T
UFPA	Universidade Federal do Pará

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	JUSTIFICATIVA.....	20
3	REFERENCIAL TEÓRICO.....	21
3.1	O vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1 (HTLV-1).....	21
3.2	Patologias associadas ao HTLV-1.....	26
3.2.1	Paraparesia espástica tropical/ Mielopatia associada ao HTLV (PET/MAH)	27
3.3	As células T e o HTLV-1 no desenvolvimento da PET/MAH	29
3.3.1	Células T citotóxicas.....	30
3.3.2	Células T auxiliares	31
3.4	A função tímica e a PET/MAH	32
4	OBJETIVOS	38
4.1	Objetivo geral.....	38
4.2	Objetivos específicos.....	38
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	39
5.1	Desenho	39
5.2	Local do estudo	39
5.3	População e amostra.....	39
5.3.1	Critérios de inclusão	39
5.3.2	Critérios de exclusão	40
5.4	Aspectos éticos	41
5.5	Avaliação médica.....	41
5.6	Avaliação fisioterapêutica	41
5.6.1	Grau de auxílio na marcha	41
5.7	Métodos laboratoriais	42
5.7.1	Separação e contagem das células linfomononucleares.....	42
5.7.2	Extração de DNA para quantificação de TREC	43

5.7.3	Curva absoluta de TREC.....	43
5.7.4	Purificação do DNA plasmidal de <i>Escherichia coli</i>	44
5.7.5	Quantificação do DNA	45
5.7.6	Detecção e quantificação de partículas TREC	45
5.7.7	Extração e quantificação do RNA.....	45
5.7.8	Síntese de cDNA (DNA complementar).....	46
5.7.9	Expressão gênica de IL-7	47
5.8	Análise estatística	47
6	RESULTADOS	49
6.1	Características da amostra.....	49
6.2	Função tímica de pacientes infectados pelo HTLV com PET/MAH e sem PET/MAH	50
6.3	Expressão gênica da IL-7 em pacientes infectados pelo HTLV com PET/MAH e sem PET/MAH	56
6.4	Correlação entre a expressão gênica da IL-7 e a expressão de partículas TREC em pacientes infectados pelo HTLV com PET/MAH e sem PET/MAH	62
7	DISCUSSÃO	64
8	CONCLUSÃO.....	69
	REFERÊNCIAS.....	70
	APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	79
	APÊNDICE B – ESCALA DO GRAU DE AUXÍLIO NA MARCHA	81
	ANEXO A – PARECER DE ÉTICA DE PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS.....	82

1 INTRODUÇÃO

O Vírus Linfotrópico de Células T Humanas Tipo 1 (HTLV-1 do inglês *Human T lymphotropic virus*), identificado em 1980, foi o primeiro retrovírus associado à causa de patologia em seres humanos. Dois anos após a descoberta do HTLV-1, o HTLV-2 foi isolado. No ano de 2005, foi reportada a descoberta do HTLV-3 e do HTLV-4, porém, os dois últimos, sem muito impacto epidemiológico (POIESZ *et al.*, 1980; KALYANARAMAN *et al.*, 1982; MAHIEUX; GESSAIN, 2009).

Dos 4 tipos de HTLV, o mais importante quanto às manifestações clínicas é o HTLV-1, associado principalmente à leucemia/linfoma de células T do adulto (LLcTA), uma doença maligna agressiva, e à paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1 (PET/MAH), que caracteriza-se como uma alteração neurológica, envolvendo os neurônios motores superiores, de evolução lenta e progressiva, trazendo manifestações clínicas como déficits sensoriais e distúrbios esfinteriano (GESSAIN *et al.* 1985; YOSHIDA; MIYOSHI; HINUMA, 1982; FUZII *et al.*, 2014).

Apesar das patologias associadas ao HTLV-1 terem um prognóstico complexo, em média 90% dos portadores de HTLV-1 permanecem assintomáticos ao longo da vida. Dos outros 10% de infectados, levando-se em consideração a etnia e o gênero, cerca de 2-3% desenvolvem LLcTA e 0,25-4% desenvolvem PET/MAH que são as mais importantes em termos epidemiológicos. Os demais pacientes evoluem com uveíte associada ao HTLV-1, dermatite infecciosa, linfoma cutâneo de células T (CTCL do inglês *cutaneous T-cell lymphoma*), manifestações oftalmológicas entre outras manifestações (COOK *et al.*, 2012; COOK *et al.*, 2013).

O HTLV-1 infecta principalmente células T CD4+ (TCD4), modificando o comportamento da célula. Isto pode levar a alterações na resposta imunológica, com grande importância para o desenvolvimento de várias doenças relacionadas a este vírus. Em particular em relação à PET/MAH, nota-se um aumento da resposta inflamatória Th1, e que se relaciona com achados histopatológicos na medula espinhal, onde se encontram infiltrados inflamatórios perivasculares, principalmente de células T CD8+ (TCD8) específicos que destroem as TCD4 infectadas. Esse mecanismo de resposta imunológica ativada de forma crônica pode desencadear a base da patogênese da PET/MAH, que seria a desmielinização dos neurônios (ENOSE-AKAHATA *et al.*, 2013). Tal fato leva a crer que a resposta imunológica

celular do hospedeiro pode ter grande influência na patogênese das doenças provocadas pelo HTLV-1.

Assim, as células T são essenciais para a resposta imunológica adaptativa e peças importantes na patogênese das doenças associadas ao HTLV-1. Essas células tem seu desenvolvimento iniciado de um progenitor linfoide comum na medula óssea e migram para o timo para amadurecimento e assim que encerram sua maturação no timo, dirigem-se à periferia do sistema vascular e são chamadas de células T *naïve* periféricas (HAINES *et al.*, 2009).

As células T *naïve* possuem características singulares quando chegam à periferia do sistema vascular, uma vez que não sofreram proliferação e possuem círculos excisados pelo rearranjo dos genes do receptor de células T (TREC) (LIND *et al.*, 2001; ABBAS, 2008). Os TRECs são produzidos durante a maturação das células T no timo, onde ocorre o rearranjo do gene do receptor de célula T (TCR). Durante este processo, o TREC é excisado e permanece de forma episomal nesta célula (DOUEK, 1998). O TREC não duplica com a proliferação celular, sendo um bom indicador para quantificar o número de células T *naïve* que deixaram o timo e assim avaliar a função tímica.

Apesar de haver a redução da produção de células T *naïve* com o envelhecimento do indivíduo e conseqüentemente o decréscimo no número de partículas TRECs, alguns estudos mostram que em infecções, como na infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV do inglês *Human immunodeficiency virus*), esse decréscimo também ocorre, sugerindo uma deterioração do timo e uma diminuição na função tímica (HAZENBERG *et al.*, 2000).

2 JUSTIFICATIVA

A infecção por HTLV-1 causa grandes alterações na resposta imunológica dos pacientes infectados, mesmo naqueles que permanecem assintomáticos. Em pacientes que desenvolvem PET/MAH, os estudos focam na produção de citocinas e seus fatores de transcrição relacionados, sendo pouco estudada a produção de células T *naïve* pelo timo. Essa produção de células T *naïve* é importante para manter a qualidade da resposta imunológica. Como descrito no estudo de Yasunaga *et al.* (2001), há indício de alteração na função tímica em pacientes com PET/MAH, isso pode influenciar no quadro clínico desenvolvido pelo paciente.

O desenvolvimento da PET/MAH ainda não está bem esclarecido, porém, a participação do sistema imunológico é de grande importância. Nota-se que nesses pacientes há um desequilíbrio na resposta imunológica que leva a uma resposta inflamatória do tipo Th1, e apesar disso, os pacientes apresentam diminuição da resposta imunológica contra outros agentes infecciosos. Essa alteração pode estar relacionada com a função tímica, a qual, se estiver prejudicada, interfere no repertório de reconhecimento das células T. Como foi descrito, infecções podem interferir no funcionamento do timo, e em relação ao HTLV-1, os estudos são raros, necessitando de maior entendimento sobre sua relação com o timo.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 O vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1 (HTLV-1)

O HTLV-1 é um retrovírus complexo, pertencente à família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae* e ao gênero *Deltaretrovirus* (MURPHY *et al.*, 2012; GESSAIN; MAHIEUX, 2012).

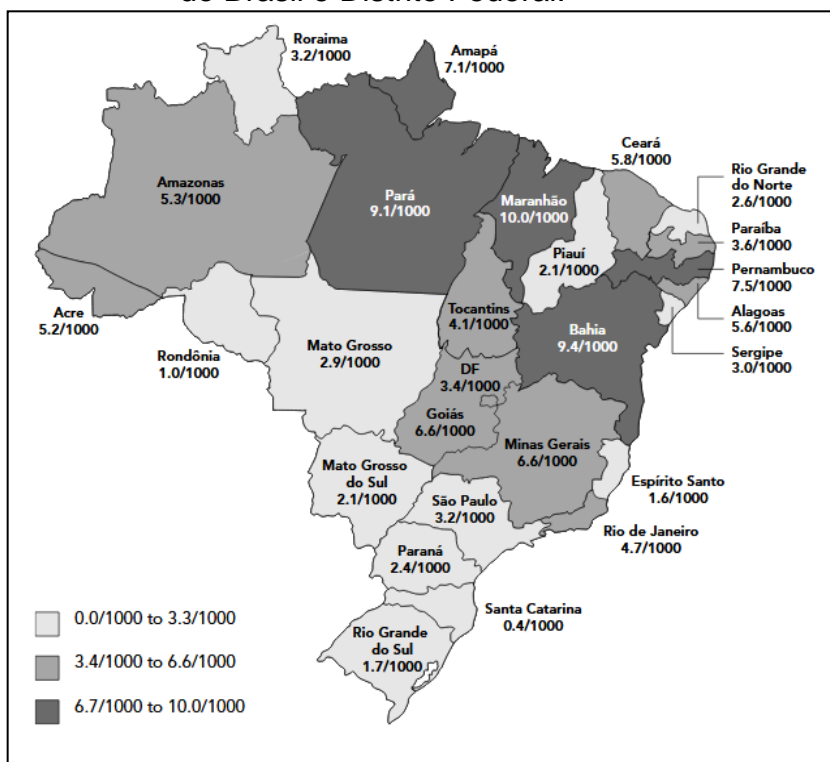
Gessain e Cassar (2012) realizaram uma estimativa de que o HTLV-1 causa infecção em 5 a 10 milhões de pessoas no mundo. Porém, acredita-se que haja um número muito maior de infectados, pois tal estimativa foi realizada em regiões endêmicas, como por exemplo, Japão, Caribe, África e América Latina, não abrangendo regiões como China, Índia, Noroeste e Leste da África.

Os estudos epidemiológicos mais consistentes da infecção pelo HTLV-1 foram iniciados no Brasil em 1993. Atualmente o Brasil está inserido no cenário mundial do HTLV-1 como região endêmica, no entanto há uma disparidade na prevalência da infecção quando algumas regiões são comparadas com outras (CATALAN-SOARES; CARNEIRO-PROIETTI; PROIETTI, 2005).

O estudo que demonstra o cenário brasileiro de forma mais ampla avaliou doadores de sangue e foi realizado em 27 hemocentros de todo país demonstrou que as regiões Norte e Nordeste apresentam os estados com as maiores prevalências de HTLV-1/2, sendo que o Estado do Pará está em terceiro lugar com 9,1/1000 doadores de sangue, a Bahia em segundo (9,4/1000) e Maranhão em primeiro (10/1000) (Figura 01) (CATALAN-SOARES; CARNEIRO-PROIETTI; PROIETTI, 2005).

A transmissão do HTLV-1 ocorre basicamente através de três modos: transmissão vertical de mãe para filho através de amamentação prolongada, com alta carga proviral no leite; transmissão horizontal através do contato sexual, que principalmente ocorre do homem para a mulher; transmissão horizontal parenteral, ocorrido por produtos sanguíneos contaminados com HTLV-1, através de transplantes de órgãos e de sangue, no canal de parto e por materiais perfurocortantes contaminados (ANDO *et al.*, 2003; GARCIA-LOYGORRI *et al.*, 2015; PAIVA *et al.*, 2016).

Figura 01 – Distribuição da infecção por HTLV-1/2 em 27 hemocentros pertencentes a todos os estados do Brasil e Distrito Federal.



Fonte: Catalan-Soares; Carneiro-Proietti; Proietti (2005).

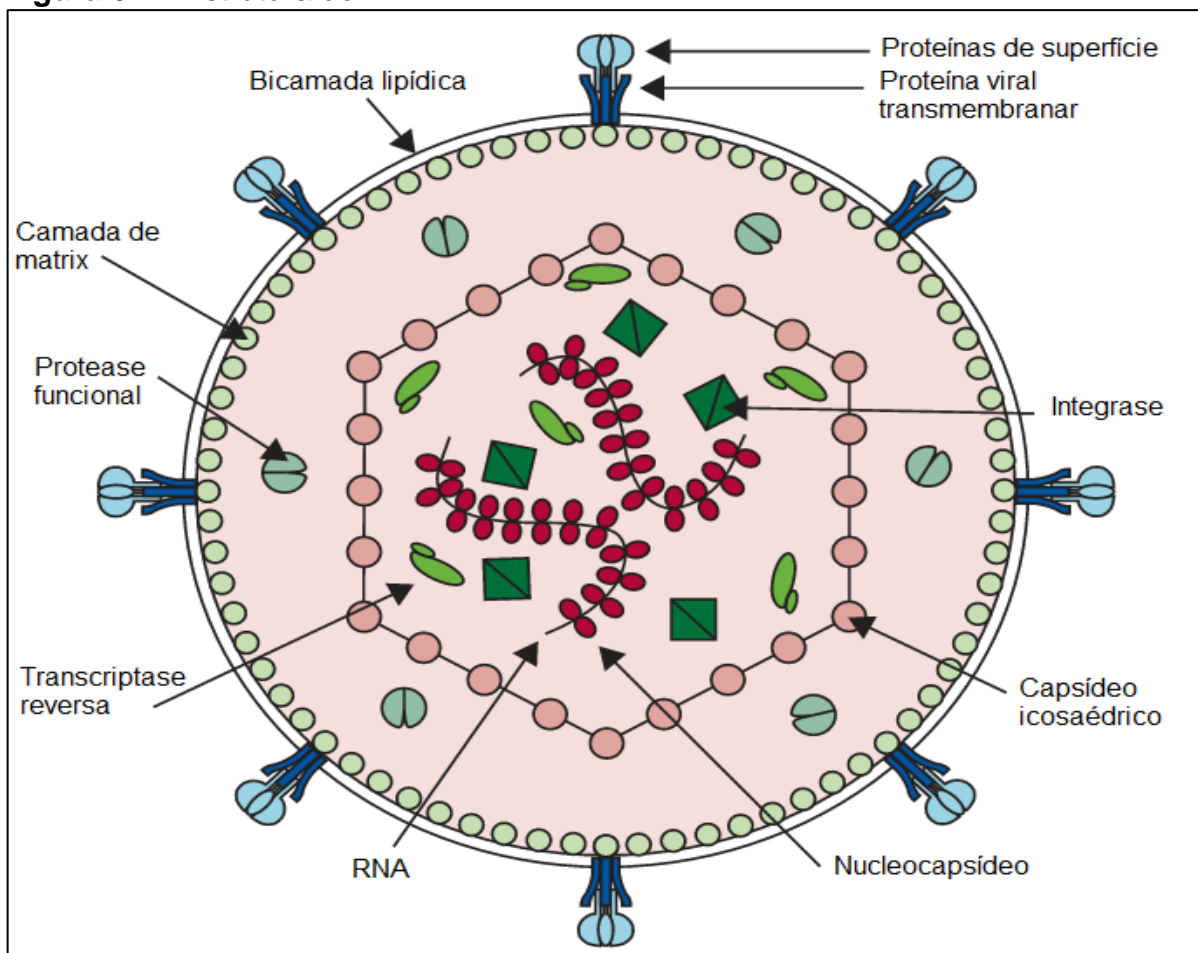
O vírion maduro é esférico, com diâmetro de 110 a 140 nm, envolto por uma membrana derivada da célula hospedeira e pelas glicoproteínas codificadas pelo gene viral Env. No seu centro, há o nucleocapsídeo que contém duas cópias de 9kb do RNA (do inglês *Ribonucleic acid*) genômico, a proteína transcriptase reversa, responsável pelo início da transcrição reversa e as enzimas integrases, já as enzimas proteases virais, que irão clivar as proteínas estruturais do vírus, encontram-se fora do nucleocapsídeo (Figura 02) (YAO; WIGDAHL, 2000).

O vírus infecta várias células de humanos e não humanos *in vitro*, porém *in vivo* as TCD4 são seu alvo principal, enquanto que as TCD8 e células dendríticas se apresentam somente como suscetíveis, podendo constituir um reservatório para o vírus (NAGAI *et al.*, 2001; JONES *et al.*, 2008).

A infecção pelo HTLV-1 por vírus livre é rara, mas quando ocorre inicialmente o vírus se liga às células através de três moléculas: proteoglicanos de sulfato de heparano (HSPG), a neuropilina-1 (NRP-1), e um transportador de glicose (GLUT-1 do inglês *Glucose transporter 1*). O principal mecanismo de transmissão do vírus é por transferência do vírus entre células por sinapse celular, porém também

mantendo seu ciclo infeccioso *in vivo* pela proliferação clonal seletiva de células T infectadas (GESSAIN; MAHIEUX, 2012; MELAMED *et al.*, 2013).

Figura 02 – Estrutura do HTLV-1.



Fonte: Adaptado de Verdonck *et al.* (2007).

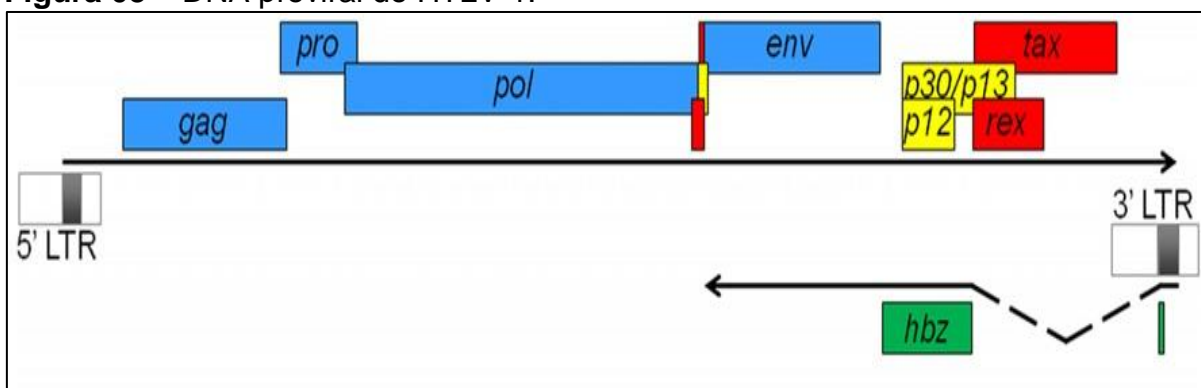
Após sua entrada na célula hospedeira, o vírus ativa a transcrição do RNA viral em DNA (Ácido desoxirribonucleico) viral no citoplasma da célula, pela atuação da proteína transcriptase reversa. Depois o DNA viral é transportado para o núcleo da célula onde então ocorre sua integração com genoma da célula hospedeira. A partir desse momento o vírus irá iniciar o uso da maquinaria da célula hospedeira, para a realização da sua expressão gênica, tradução de proteínas e montagem de novos vírus (GALLO; POIESZ; RUSCETTI, 1981). A expressão dos genes do HTLV-1 é autorregulada e ocorre através da expressão de proteínas regulatórias que, além de controlar a replicação viral, modificam a maquinaria da célula hospedeira para responder a favor da infecção.

O HTLV-1 apresenta em seu genoma as fases de leitura abertas (ORFs do inglês *Open reading frame*) gag, pro, pol e env, além de duas proteínas estruturais e

enzimáticas do vírus e são flanqueadas por duas repetições terminais longas (LTRs do inglês *Long terminal repeats*) (Figura 03). Nas LTRs encontra-se o promotor viral responsável pelo recrutamento de fatores celulares CREB (do inglês *cAMP response element-binding protein*), CBP (do inglês *CREB-binding protein*)/P300), PCAF (do inglês *P300/CBP-associated factor*) e RNAPol (RNA polimerase) que irão promover a transcrição dos genes virais e do promotor que é utilizado para transcrever a proteína HBZ (do inglês *HTLV-1 basic leucine zipper*) (GAUDRAY *et al.*, 2002; BAYDOUN; BELLON; NICOT, 2008; GESSAIN; MAHIEUX, 2012).

Além dos genes comuns aos vírus da família *Retroviridae* (gag, pol e env), o HTLV-1 possui uma região chamada de pX que está presente a partir da extremidade 3' da ORF Env. Nesta região estão presentes as ORFs que codificam as proteínas reguladoras (Tax, Rex, HBZ) e as proteínas acessórias: p12, p21, p13, p30. Dessas proteínas próprias do HTLV-1 destaca-se HBZ que é o único gene transcrito de forma inversa no genoma viral (Figura 03) (GESSAIN; MAHIEUX, 2012).

Figura 03 – DNA proviral do HTLV-1.



Fonte: Adaptado de Barbeau, Peloponese e Mesnard (2013).

A proteína Rex atua regulando a expressão dos genes virais. Possui tanto um sinal de localização nuclear quanto um sinal de exportação nuclear, para realizar o transporte do RNAm (RNA mensageiro) viral entre o núcleo e o citoplasma, facilitando o trânsito desses transcritos e permitindo uma alta expressão de proteínas estruturais e enzimáticas (JOURNO; DOUCERON; MAHIEUX, 2009; GESSAIN; MAHIEUX, 2012). REX facilita o acúmulo dos transcritos virais no citoplasma das células infectadas por HTLV-1. Ye *et al.* (2003) mostraram que a falta de REX prejudica a replicação viral, mas não impede a capacidade do vírus de infectar e imortalizar células sanguíneas mononucleares periféricas *in vitro*.

TAX é uma pequena proteína transativadora que modula a expressão dos genes do HTLV-1. É necessária para uma ativação acentuada do provírus, sendo predominantemente nuclear com uma pequena quantidade distribuída no citoplasma das células hospedeiras (RAMÍREZ; NYBORG, 2007). Esta proteína é tratada como um potente ativador da LTR, pois recruta os fatores de transcrição da célula do hospedeiro, além de ser responsável por várias funções distintas, dentre elas, proliferação celular, inibição da apoptose, instabilidade genética, ativação da telomerase e inativação de supressores de tumor (CHLICHLIA; KHAZAIE, 2010; BAYDOUN; BELLON; NICOT, 2008).

A proteína Tax não se liga diretamente ao DNA, mas ativa a transcrição através da fosforilação de CREB, que induz o recrutamento de CBP/p300, PCAF e RNAPol da célula hospedeira, levando à transcrição eficiente das proteínas virais. Além do importante papel na transcrição viral, Tax também está envolvida na transformação celular, sendo chamada de oncoproteína, uma vez que confere propriedades proliferativas às células T primárias imortalizadas infectadas por HTLV-1 (BOXUS *et al.*, 2008; ZHAO; MATSUOKA, 2012; GESSAIN; MAHIEUX, 2012).

Ao mesmo tempo em que Tax induz a proliferação de TCD4, ela se torna um alvo imunodominante, sendo altamente reconhecido pelas células T citotóxicas CD8+. Assim, há uma rápida eliminação de TCD4 que expressam Tax em grande quantidade, culminando na seleção de TCD4 que expressam menor quantidade de Tax, os quais escapam da vigilância imunológica. Com isso, em geral, há baixa detecção de Tax em pacientes infectados (BELROSE *et al.*, 2011). Para manter-se estável a proliferação e manutenção viral, a partir da menor expressão de Tax, inicia-se o aumento da expressão de HBZ, que é menos imunogênica, para substituir Tax nas mesmas funções, e reforçar ainda mais a sua supressão (KANNIAN; GREEN, 2010).

A proteína HBZ é codificada por um RNA anti-sentido e é detectada em todas as células infectadas pelo HTLV-1 (Figura 03) (GAUDRAY *et al.*, 2002). Assim como a Tax, atua no processo de modificação celular, alterando as vias de tradução de sinais intracelulares, regulação da expressão gênica viral e celular, além de alteração neoplásica (KANNIAN; GREEN, 2010).

HBZ apresenta uma expressão conservada em todas as células de LLcTA, promovendo a proliferação de células da mesma. Isso leva a crer que o gene HBZ é essencial para a oncogênese. Além disso, sua expressão está diretamente ligada à

alta carga proviral de HTLV-1 e com a gravidade da PET/MAH (SAITO *et al.*, 2009; ENOSE-AKAHATA *et al.*, 2013). Atua no sequestro dos fatores de transcrição mediados por Tax e inibe a ligação de p65, proteína integrante da família NF- κ B (do inglês *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) no DNA, através da promoção da expressão da ubiquitina PDLIM2 E3-ligase, que aumenta a degradação de p65. Com esse mecanismo, reprime parcialmente a via clássica de sinalização da NF- κ B, promovendo a diminuição dos transcritos virais e inibe a produção de Tax. (TANAKA; GRUSBY; KAISHO, 2007; ZHAO *et al.*, 2009; CHOUDHARY; RAUCH; RATNER, 2011; ZHAO; MATSUOKA, 2012).

Assim, o HTLV-1 inicialmente expressa em larga escala o gene da proteína Tax, que faz com que seus outros genes virais também sejam expressos em larga escala, levando as TCD4 à entrada constante em ciclo celular. Porém Tax é altamente imunogênico e células T que expressam essa proteína são logo eliminadas (BELROSE *et al.*, 2011).

Após a instalação da infecção, inicia-se o aumento na expressão de HBZ que inibe a expressão de Tax e passa a exercer o seu papel, tendo as vantagens de estimular em menor escala a expressão dos outros genes virais e ser menos imunogênico, culminando na sobrevivência das células T infectadas levando ao acúmulo e persistência do vírus (BELROSE *et al.*, 2011).

3.2 Patologias associadas ao HTLV-1

O HTLV-1 está associado a várias patologias, incluindo uveíte associada ao HTLV e dermatite infecciosa, porém, as principais são a LLcTA, que se trata de uma leucemia onde a forma aguda é a mais comum e fatal e a PET/MAH que se caracteriza como uma mielopatia crônica e progressiva (COOK *et al.*, 2013). Além de apresentar relação com outras doenças infecciosas como estrogiloidíase e tuberculose, sugerindo que a infecção por HTLV-1 também pode diminuir a resposta imunológica do hospedeiro (COUTINHO *et al.*, 2014). Porém, até o momento, a compreensão acerca dos mecanismos de progressão das patologias associadas ao HTLV-1 é limitada, por não haver nenhuma associação entre um genótipo viral e um tipo específico de patologia. Contudo, sabe-se que, em certos indivíduos, ocorre uma alta resposta imunológica contra o vírus (FURUKAWA *et al.*, 2000; KANNAGI *et al.*, 2004).

3.2.1 Paraparesia espástica tropical/ Mielopatia associada ao HTLV (PET/MAH)

Segundo Gessain *et al.* (1985) e Osame *et al.* (1986) a PET/MAH é uma mielopatia lentamente progressiva que afeta principalmente os tratos piramidais e de forma rápida o sistema sensorial. Inicialmente os pacientes apresentam queixas de fraqueza nos membros inferiores, lombalgia e perda urinária. Após a progressão da doença, as alterações neurológicas incluem espasticidade e/ou hiperreflexia das extremidades inferiores, e a maior frequência de distúrbios urinários, constipação, fraqueza muscular da extremidade inferior, lombalgia, além de alguns pacientes apresentarem problemas cognitivos variando de casos leves a uma encefalopatia grave (GESSAIN; MAHIEUX, 2012).

Estudos mostram que células infectadas com HTLV-1 estão presentes no fluido cefalorraquidiano e com uma frequência duas vezes maior em comparação ao sangue periférico, mostrando o recrutamento ou expansão de células infectadas com HTLV-1 no sistema nervoso central (SNC) (HAYASHI *et al.*, 2008).

O mecanismo completo de contribuição do HTLV-1 para a patogênese da PET/MAH ainda é desconhecido, porém sabe-se que as lesões ocorrem principalmente na coluna torácica, envolvem vários fenômenos de ativação do sistema imunológico contra a presença dos antígenos de HTLV-1 e, com isso, há um processo inflamatório que leva à degeneração da bainha de mielina (GARCÍA-VALLEJO; DOMÍNGUEZ; TAMAYO, 2005; CASSEB; PENALVA-DE-OLIVEIRA, 2000).

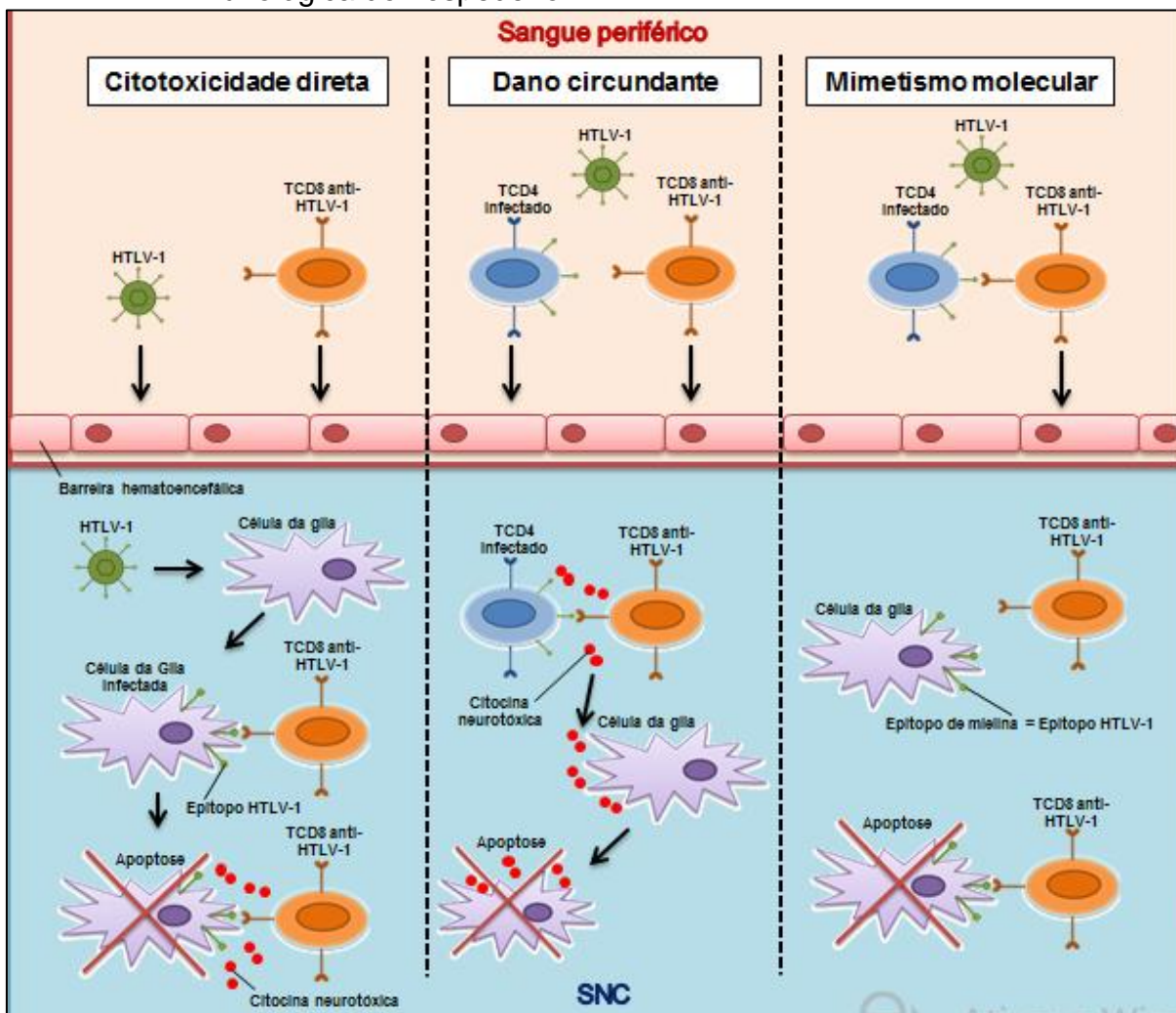
Estudos são realizados para tentar mostrar o motivo pelo qual somente alguns portadores do HTLV-1 evoluem para doenças graves enquanto outros permanecem saudáveis ao longo da vida, sugerem um papel importante da resposta imunológica de cada hospedeiro frente à infecção pelo HTLV-1 (BANGHAM *et al.*, 1999).

Desta maneira, existem três hipóteses para o desenvolvimento da PET/MAH com base na resposta imunológica do hospedeiro. A primeira hipótese aponta para o mecanismo de citotoxicidade direta, onde células T citotóxicas CD8+, específicas para antígenos do HTLV-1, cruzariam a barreira hematoencefálica e destruiriam, por mecanismos citotóxicos diretos ou via produção de citocinas neurotóxicas, as células da glia infectadas pelo HTLV-1 (Figura 04) (ARAÚJO; SILVA, 2006; COOPER; VAN DER LOEFF; TAYLOR, 2009; SAITO *et al.*, 2010; SHOEIBI *et al.*, 2013).

A segunda, também denominada de dano circundante ou “bystander” envolveria as TCD4 infectadas e as células T CD8+ específicas para a proteína viral Tax, que juntos atravessariam a barreira hematoencefálica e produziriam grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias, levando a um processo de intensa inflamação e destruição tecidual. Neste sentido, acredita-se, que as células T são ativadas na PET/MAH, e quando atravessam a barreira hematoencefálica, dão início ao processo inflamatório no SNC resultante em lesão celular (Figura 04) (ARAÚJO; SILVA, 2006; COOPER; VAN DER LOEFF; TAYLOR, 2009; SAITO *et al.*, 2010; SHOEIBI *et al.*, 2013).

A terceira e última hipótese denominada de autoimunidade, aponta para um processo de mimetismo molecular no qual a semelhança entre uma proteína neuronal do hospedeiro e a mais importante proteína do vírus, o antígeno de Tax, acarretaria um processo inflamatório de autoimunidade com lesão neuronal (Figura 04) (ARAÚJO; SILVA, 2006; COOPER; VAN DER LOEFF; TAYLOR, 2009; SAITO *et al.*, 2010; SHOEIBI *et al.*, 2013).

Figura 04 – Hipóteses para o desenvolvimento da PET/MAH com base na resposta imunológica do hospedeiro.



Fonte: Própria do autor.

3.3 As células T e o HTLV-1 no desenvolvimento da PET/MAH

O sistema imunológico tem como objetivo a proteção do organismo, para tanto, o mesmo deve possuir mecanismos de identificação e de resposta contra agressões externas e internas. Tais respostas são montadas através de mecanismos de ativação e proliferação de células, devendo haver um sistema de controle, do contrário, ao invés de trazer benefícios, podem se tornar uma ameaça à homeostase do organismo (HAUBEN; RONCAROLO, 2005).

Dentro do contexto de células do sistema imunológico, encontram-se as células T. Estas são divididas entre: TCD4 responsáveis por coordenar a resposta imunológica contra patógenos e para antígenos estranhos; e TCD8 que atuam na proteção do organismo eliminando células infectadas (principalmente por vírus) e

aquelas transformadas, no caso do câncer (SAITO *et al.*, 2010; SCHMID *et al.*, 2010).

Na infecção pelo HTLV-1, a participação das células T é de grande importância para o desenvolvimento de PET/MAH, na qual ocorre aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias e na ativação das células T, além de redução na resposta de memória, trazendo a característica de um perfil de resposta pró-inflamatório (COUTINHO *et al.*, 2014). Nas lesões do SNC dos pacientes com PET/MAH é encontrado um infiltrado linfocitário, sugerindo que haja uma participação contundente da resposta imunológica do hospedeiro gerando inflamação levando ao dano tecidual, mostrando que a resposta imunológica do hospedeiro tem grande papel na progressão da PET/MAH (BANGHAM *et al.*, 2015).

3.3.1 Células T citotóxicas

As TCD8 desenvolvem um papel fundamental para a resposta imunológica do hospedeiro nas infecções virais atuando na indução a apoptose de células infectadas, além de realizar a vigilância imunológica. No entanto, a ausência desse mecanismo, traz a persistência viral (SCHMID *et al.*, 2010).

No caso da PET/MAH, as TCD8 específicas contra HTLV-1 são amplamente encontradas no sangue periférico, sendo sua abundância proporcional à carga proviral de HTLV-1. De maneira que a carga proviral está diretamente ligada ao risco de PET/MAH e à eficiência das TCD8 em lisar células infectadas e manter a carga proviral baixa. A capacidade citotóxica das TCD8 também está ligada ao risco de manifestações inflamatórias nos indivíduos com PET/MAH (BANGHAM; OSAME, 2005). A carga proviral traz um estímulo antigênico crônico, derivado da persistência viral, induzindo essas células T à exaustão, caracterizando uma perturbação na atuação das TCD8 (EZINNE *et al.*, 2014; BANGHAM *et al.*, 2015).

Todo patógeno apresenta antígenos que serão prioritariamente reconhecidos pelas TCD8 do hospedeiro. No HTLV-1, o principal antígeno é a proteína Tax (MATSUOKA; JEANG, 2007; KANNAGI, 1991). O estudo realizado por Hanon *et al.* (2000) sugeriu que um desempenho eficaz de TCD8 anti-HTLV-1 contra a proteína Tax, restringe a frequência de células que expressam essa proteína, proporcionando uma baixa detecção de células que expressam Tax.

Nos pacientes infectados por HTLV-1, as TCD8 apresentam-se cronicamente ativadas, mostrando que o vírus se encontra em alta atividade, com transcrição

intermitentemente dos seus transcritos virais ou, pelo menos, em intervalos frequentes. Com essa descoberta em pacientes com PET/MAH, levou a hipótese do dano inflamatório circundante nos tecidos do SNC (BANGHAM *et al.*, 2015).

As variações genéticas das TCD8 de um indivíduo determinam a capacidade deles de eliminar as células infectadas e conseqüentemente determinar a carga proviral do hospedeiro, com uma resposta eficaz das TCD8 do hospedeiro, mantem-se uma baixa carga proviral podendo implicar no bom prognóstico da infecção por HTLV-1 (BANGHAM; OSAME, 2005; TWIGGER *et al.*, 2014). Apesar dos danos provocados pela resposta inflamatória das TCD8, estudos mostram uma ação protetora dessas células, a partir da imunogenética do hospedeiro, na qual a presença dos alelos HLA-A*02 ou HLA-Cw*08 no gene do MHC-I (moléculas responsáveis por apresentar o antígeno aos TCD8) está associada a uma baixa carga proviral e conseqüentemente um menor risco de PET/MAH. Porém, essa apresentação benéfica do MHC-I não está ligada ao principal antígeno, a proteína Tax e sim à HBZ, do contrário, as TCD8 anti-HTLV-1 ineficientes e em excesso podem contribuir para o dano tecidual do SNC, levando a PET/MAH (MACNAMARA *et al.*, 2010; TWIGGER *et al.*, 2014; ROSADAS; PUCCIONI-SOHLER, 2015).

3.3.2 Células T auxiliares

As TCD4 são essenciais para a resposta imunológica adaptativa, atuando contra agentes patogênicos e na funcionalidade das vacinas. São divididas em subconjuntos para promover a ativação de diferentes componentes imunológicos através da secreção de citocinas específicas. O subgrupo Th1 é responsável por secretar IFN- γ , promovem respostas mediadas por células contra vírus e inibem a resposta Th2. Por sua vez, as células com o perfil Th2 produzem de interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5) e interleucina 13 (IL-13), induzindo a síntese de anticorpos, respostas de mastócitos e eosinófilos e inibem a resposta mediada por Th1 (ABBAS; MURPHY; SHER, 1996; PICCIRILLO; SHEVACH, 2004).

A infecção pelo HTLV-1 é dinâmica e persistente, apresentando características como alta transcrição viral e proliferação de TCD4, estimulação antigênica e morte mediada por TCD8 (BANGHAM; OSAME, 2005).

Quando a TCD4 infectada por HTLV-1 passa a expressar a proteína Tax, estas células T podem apresentar três desfechos: mitose, morte por TCD8 ou transpassar

a barreira endotelial e acessar o SNC. Em geral, estes desfechos ocorrem simultaneamente, porém, dependendo dos pacientes, as proporções são diferentes, podendo levar ao desenvolvimento da PET/MAH (BANGHAM; OSAME, 2005).

No início da PET/MAH, as TCD4 são predominantes nas lesões e, quando estão infectadas, secretam com frequência IFN- γ , e apresentam os níveis séricos desse interferon mais altos (BANGHAM *et al.*, 2015).

Ando *et al.* (2013) mostraram em seu estudo que os astrócitos secretam a quimiocina CXCL10 (do inglês *C-X-C motif chemokine 10*) frente a produção de IFN- γ produzido pelas TCD4 infectadas. A quimiocina CXCL10, por sua vez, recruta mais TCD4 infectadas, gerando um ciclo retroalimentável com intensa produção de IFN- γ e culminando em danos ao tecido neural, dada a toxicidade do IFN- γ (BANGHAM *et al.*, 2015).

As TCD4 em pacientes infectados por HTLV-1 com PET/MAH produzem predominantemente IFN- γ , tendo essas células a característica pró-inflamatória de perfil Th1. Um dado importante é que pacientes com PET/MAH apresentam 10 a 25 vezes mais TCD4 produtores de IFN- γ em relação àqueles infectados e assintomáticos com a carga proviral semelhante. Tais fatos, juntamente com a associação entre a presença abundante de TCD4 em lesões inflamatórias iniciais no tecido nervoso, levam a crer que estas células desempenham um papel importante no dano tecidual encontrado na PET/MAH (GOON *et al.*, 2002; GOON *et al.*, 2003; GOON *et al.*, 2004).

3.4 A função tímica e a PET/MAH

No processo de formação e inicialização do repertório de células T periféricas, há um componente de suma importância: o timo. Trata-se de um órgão linfóide primário localizado no mediastino superior, dividido em vários lóbulos constituídos por um compartimento externo (córtex) e um compartimento interno (medula) (LIND *et al.*, 2001; ABBAS, 2008; HAYNES *et al.*, 2000).

A estrutura do timo é composta por um compartimento estromal, que consiste em uma rede de células epiteliais tímicas; e por um parênquima hematolinfóide que comporta os timócitos em desenvolvimento, células apresentadoras de antígeno (células dendríticas e macrófagos) e poucas células B (CRIVELLATO; VACCA; RIBATTI, 2004).

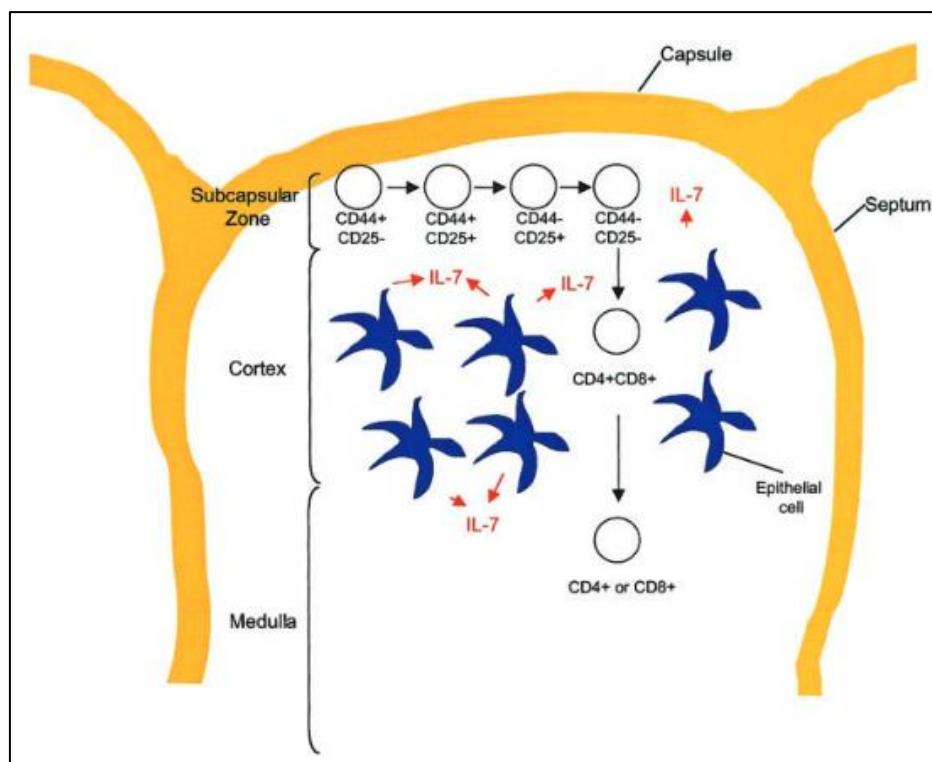
O tamanho do timo é inversamente proporcional à idade do indivíduo, e juntamente com esse fenômeno, a imunidade decai de acordo com o envelhecimento. Alcança seu maior tamanho nos primeiros meses de vida, e com o passar da idade a tendência é que a região cortical desapareça dando lugar a tecido adiposo, persistindo somente a região medular, onde é mantida a diferenciação das células T *naïve* durante a fase adulta. Entretanto, as taxas de células T *naïve* e a diversidade do repertório estão consideravelmente reduzidas (LIMA; CARNEIRO-SAMPAIO, 2007; YAGER *et al.* 2008). Além do fator idade, a redução do timo também está associada à ação de corticóides, infecções agudas e desnutrição (PAZIRANDEH *et al.*, 2004; SAVINO *et al.*, 2007).

Precedendo momento da maturação das células T no timo, tais células têm origem na medula óssea ou no fígado, no caso do feto, sendo provenientes de células-tronco pluripotentes, que são levadas ao timo através da corrente sanguínea. A diferenciação dessas células-tronco pluripotentes encontradas na medula óssea, seguem por dois ramos distintos: mielóides e linfóides (SPITS, 2002; CRIVELLATO; VACCA; RIBATTI, 2004; MESQUITA-JÚNIOR *et al.*, 2010).

Juntamente com as células B e as células NK (do inglês *Natural killer*), as células T, são provenientes do ramo linfóide. Elas deixam a medula óssea em direção ao timo, para sofrerem o processo de seleção e maturação, e a partir daí, entrarem novamente na corrente sanguínea (MESQUITA-JÚNIOR *et al.*, 2010). Estudos mostram que, no cordão umbilical de neonatos, são encontradas células precursoras do timo expressando CD34 +, onde essas células podem se diferenciar em células T sem linhagem definida, pois as mesmas não apresentam a recombinação do receptor TCR, além de não expressar o gene de ativação de recombinação 1 (RAG1 do inglês *Recombination activating gene 1*), que é necessário para rearranjos de TCR, e CD1A, CD3ε citoplasmática, CD2 e CD7, que estão presentes em precursores de células T no timo (SPITS, 2002).

Já no timo, os precursores das células T migram da medula óssea e acumulam-se na zona subcapsular (região abaixo da borda externa do córtex), a partir daí passam pela primeira etapa representada por timócitos imaturos CD3-CD4-CD8- triplo-negativos, depois se tornam T CD4 + CD8 + de duplo-positivo e, por fim, as células T se tornam maduras numa fase de somente um positivo T CD4 + ou CD8 + (Figura 05) (LIND *et al.*, 2001; FRY; MACKALL, 2002).

Figura 05 – Desenvolvimento das células T no timo.



Fonte: Adaptado de Fry e Mackall (2002).

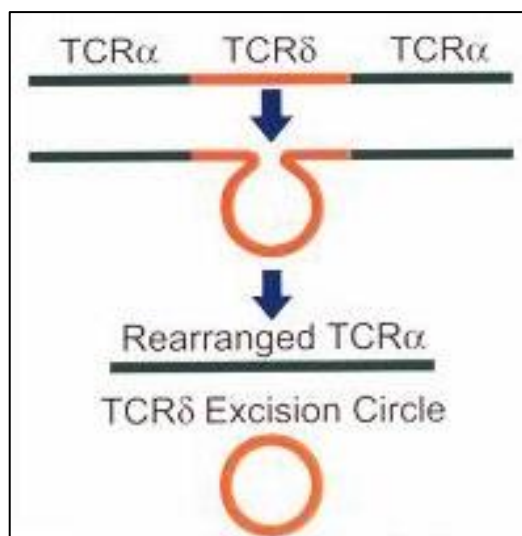
Um fator imprescindível para a proliferação e o desenvolvimento das células tímicas precursoras é a expressão da citocina interleucina-7 (IL-7) (SPITS, 2002; MACKALL; FRY; GRESS, 2011). É uma citocina produzida por células epiteliais do timo e por órgãos linfóides periféricos (LEWIS; HAINES; ROSS, 2011). Além desses principais locais, pode ser encontrada sua produção no epitélio intestinal, queratinócitos, fígado fetal e adulto, células dendríticas e células dendríticas foliculares, porém com produção relativamente menor (FRY; MACKALL, 2002). Primeiramente foi descoberta como fator de crescimento de células B, posteriormente foi detectada a sua importância no crescimento e maturação de células T. Além disso, a IL-7 é um regulador pós-tímico da sobrevivência de células T *naïve* e atua na formação de células T de memória (SASSON; ZAUNDERS; KELLEHER, 2006).

Os níveis de IL-7 são inversamente proporcionais ao número de células T *naïve* totais e para que ocorra a sua expressão é necessário que haja a interação entre células do estroma da medula óssea com células B (SUDO *et al.*, 1989; SASSON; ZAUNDERS; KELLEHER, 2006). Situações que levam a linfocitopenia, como quimioterapia e Síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS do inglês

Acquired immune deficiency syndrome), apresentam uma alta taxa dessa citocina (SASSON; ZAUNDERS; KELLEHER, 2006). Ou seja, quando há uma linfopenia periférica ou baixa na saída de células T *naïve* do timo, é detectado um aumento nos níveis de IL-7, pois não há mecanismos de uso dessas citocinas, ocasionando seu acúmulo. As células T restantes apresentam uma alta proliferação, devido a abundância da IL-7 (LEWIS; HAINES; ROSS, 2011).

A maturação intratímica dá origem às células T *naïve* maduras com seus respectivos receptores de células T (TCR), que vão circular pela periferia do sistema linfóide. Aquelas já existentes na periferia são chamadas de células T *naïve* maduras, porém há um subconjunto delas que chegaram há pouco tempo do timo, essas são chamadas de células recém-emigradas do timo do inglês *recent thymic emigrant* (RTE) (FINK; HENDRICKS, 2011). Todo o conjunto de células T *naïve* tem a função de manter a diversidade e o repertório das células T na periferia, através da sua proliferação, para substituir células que morreram ou sofreram conversão (PICCIRILLO; SHEVACH, 2004; HOUSTON; NECHANITZKY; FINK, 2008; DONG *et al.*, 2013).

No momento em que vai ocorrer a formação do receptor de células T é produzido um TREC (do inglês *TCR rearrangement excision circles*) durante o rearranjo do gene desse receptor. O DNA de TREC pode ser encontrado no citoplasma da célula T *naïve*, e por se tratar de um DNA excisado, não pode ser replicado. Quando ocorre uma divisão celular, para proliferação e expansão frente a um antígeno na periferia, o nível do TREC é mantido, levando-se a crer que as únicas células que contenham o TREC são as RTEs ou as células T *naïve* maduras que não sofreram divisão (HAYNES *et al.*, 2000; JUST, 2008) (Figura 06). Assim, a detecção desta partícula TREC, pode indicar a quantidade de produção de células T *naïve* (SOMECH *et al.*, 2011).

Figura 06 - Formação do TREC.

Fonte: Adaptado de Douek *et al.*
(1998)

Infecções virais podem interferir na função tímica, em destaque a infecção por HIV. Pacientes infectados por HIV apresentam atrofia prematura do timo semelhante às que ocorrem fisiologicamente com o envelhecimento de pessoas saudáveis, porém de maneira mais acentuada (HAYNES *et al.*, 2000). Sendo assim, verifica-se redução da função tímica, o que levaria a diminuição da contagem de células T *naïve* (partículas de TREC) verificada nesses pacientes (SAUCE *et al.*, 2011). Essa diminuição na produção de células T no timo pode ocorrer devido ao dano direto causado por TCD8 aos timócitos precursores de células T infectados e apoptose dos não infectados (CUMMINS; BADLEY, 2010).

Um trabalho comparando pessoas saudáveis e pacientes com infecção tardia por HIV mostrou que os pacientes infectados apresentaram baixos níveis de TREC no sangue periférico em relação ao controle saudável, demonstrando que há um prejuízo na emissão de células recém-imigradas do timo (ZENG; HAASE; SCHACKER, 2012). Em pacientes jovens infectados com HIV, a realização da terapia antiretroviral diminui a replicação viral, contribuindo para uma melhora da resposta imunológica. Nesse contexto, há também uma melhora nos níveis de TREC, estando relacionado com a recuperação do repertório de TCD4 (ZENG; HAASE; SCHACKER, 2012).

Assim como no HIV, Yasunaga *et al.* (2001) realizou a quantificação de TREC e detectou uma baixa porcentagem na saída de células T *naïve* do timo em

portadores de HTLV-1 com PET/MAH, não estando relacionada com a carga proviral, somente com a infecção.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Verificar a função tímica de pacientes infectados HTLV-1 através da quantificação do número de TREC em células mononucleares do sangue periférico.

4.2 Objetivos específicos

- Quantificar o número de partículas de TREC e a expressão gênica da IL-7 em pacientes infectados por HTLV- 1;
- Comparar a quantificação de partículas TREC e a expressão gênica de IL-7 entre pacientes infectados por HTLV- 1 com e sem PET/MAH;
- Comparar a quantificação de partículas TREC e a expressão gênica de IL-7 de pacientes infectados por HTLV- 1 com e sem PET/MAH estratificados por idade, sexo e grau de auxílio de marcha;
- Correlacionar idade, quantificação de partículas TREC e expressão gênica de IL-7 de pacientes infectados por HTLV- 1 com e sem PET/MAH.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Desenho

Trata-se de um estudo observacional analítico do tipo transversal.

5.2 Local do estudo

A avaliação médica e fisioterapêutica do presente estudo foram realizadas no Laboratório de Clínica e Epidemiologia de Doenças Endêmicas e os métodos laboratoriais foram realizados no Laboratório de Imunopatologia, ambos pertencentes ao Núcleo de Medicina Tropical (NMT) da Universidade Federal do Pará (UFPA), situado na capital do estado do Pará, Belém.

Segundo Universidade Federal do Pará (2017), o NMT possui 11 laboratórios de pesquisa, possui como missão “promover a articulação e integração nas diferentes áreas da saúde, com o propósito de fomentar o desenvolvimento socioambiental e a melhoria da qualidade de vida da população amazônica” e como visão “tornar-se um centro de excelência regional, de repercussão nacional e internacional no ensino, na pesquisa e na extensão” (UFPA, 2017).

5.3 População e amostra

Participaram do estudo um total de 39 portadores de HTLV-1, com e sem PET/MAH, acompanhados no Laboratório de Clínica e Epidemiologia de Doenças Endêmicas do NMT da UFPA, provenientes de uma amostragem não probabilística por conveniência.

Os pacientes foram divididos nos grupos:

- PET - Pacientes infectados por HTLV-1 e com PET/MAH;
- NPET - Pacientes infectados por HTLV-1 e sem PET/MAH;

5.3.1 Critérios de inclusão

Para participar do estudo os pacientes deveriam preencher os seguintes critérios:

- Pacientes em acompanhamento médico no ambulatório do NMT-UFPA;
- Ambos os gêneros;

- Teste de triagem por Ensaio Imunoenzimático (EIE) para HTLV-1 positivo e confirmado por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR do inglês *Polymerase chain reaction.*)
- Maiores de 18 anos;
- Que tenham assinado o termo de consentimento livre e esclarecido.

5.3.2 Critérios de exclusão

Os pacientes foram excluídos deste estudo quando apresentarem uma das condições seguintes:

- Pacientes que apresentarem anticorpos específicos para o HTLV-1 por teste triagem por EIE e forem negativos por PCR;
- HIV soropositivo;
- Portadores de Hepatites B e C;
- Tireoidopatia;
- Hepatopatia (AST (Aminotransferase de Aspartate) e/ou ALT (Aminotransferase de Alanine) duas vezes maior que o limite superior da normalidade);
- Doenças Autoimunes;
- Nefropatia (creatinina maior que 1,5 mg/dL);
- Com diagnóstico diferencial de Esclerose Múltipla; Meningite Carcinomatosa; Paraparesia Espástica Familiar; Mielite Transversa; Esclerose Lateral Primária; Síndromes Paraneoplásicas; Siringomielia; Doença de Lyme; Deficiência de B12 e Folato; Doença de Behçet; Neurosífilis; Neurotuberculose; Sarcoidose; Mielopatia Vacuolar por HIV; Doenças do Colágeno; Mielopatias Auto-imune; Síndrome de Sjögren; Mielopatias tóxicas; Esclerose Lateral Amiotrófica; Mielopatia por fungos; Fístula Vertebral Arteriovenosa; Mielopatia Hepática; Mielopatia Parasitárias (*Toxocara canis* e *Ascaris suum*); Compressão da medula espinhal (Tumor espinhal, Espondilose cervical, Tumor cerebral, etc); Mielopatias regionais endêmicas com manifestações clínicas semelhantes (incluindo esquistossomose e neurocisticercose);
- Paciente fazendo uso de fármacos imunossupressores;
- Pacientes timectomizados;

- Pacientes indígenas;
- Pacientes com incapacidade cognitiva aparente;
- Pacientes que não tenham assinado o termo de consentimento livre e esclarecido.

5.4 Aspectos éticos

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (CEP) do NMT sob parecer número 038/2010-CEP/NMT (ANEXO A), seguindo as normas da Resolução, na época, 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS), relativa à pesquisa em seres humanos. O termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A), utilizado na pesquisa, foi explicado de forma verbal a cada paciente e aplicado antes da coleta de dados.

5.5 Avaliação médica

Os pacientes foram submetidos à avaliação clínica Laboratório de Clínica e Epidemiologia de Doenças Endêmicas do NMT da UFPA com médicos reumatologista, infectologista e neurologista, ocasião esta em que se ocorreu a anamnese, o exame físico e a classificação clínica do paciente em sem PET/MAH ou com PET/MAH.

5.6 Avaliação fisioterapêutica

Os pacientes foram submetidos à avaliação fisioterapêutica por fisioterapeuta, no Laboratório de Clínica e Epidemiologia de Doenças Endêmicas do NMT da UFPA com fisioterapeuta, onde na ocasião ocorreu a avaliação do grau de auxílio de marcha.

5.6.1 Grau de auxílio na marcha

O grau de auxílio na marcha caracterizou e identificou quais dispositivos foram utilizados pelos pacientes durante a deambulação. Estes dispositivos foram classificados em ordem crescente segundo o grau de necessidade do auxílio. Foi criada assim uma escala progressiva (Apêndice B): número zero (0) - deambulação sem auxílio; número um (1) - auxílio de terceiros; número dois (2) - uso de bengala

ou muleta unilateral; número três (3) - uso de muleta bilateral; número quatro (4) - uso de andador e número cinco (5) – uso de cadeira de rodas. Sabe-se que alguns pacientes apresentam diferentes mecanismos que os auxiliam na deambulação, foi adotado um critério para a padronização da pontuação nesta escala. Este critério incluiu a pontuação do auxílio dominante durante a realização da marcha pelo paciente.

5.7 Métodos laboratoriais

5.7.1 Separação e contagem das células linfomononucleares

Para obtenção das células linfomononucleares, foi coletado de cada paciente 5 mL de sangue em tubo cilíndrico contendo anticoagulante ácido etilenodiamino tetra acético (EDTA). Homogeneizou-se a mistura manualmente por inversão, imediatamente após a coleta. O sangue então foi diluído em 1:2 com solução tampão fosfato-salino (PBS) 1x em tubo cônico Falcon® de 50 mL. Em outro tubo de 50 mL foi adicionado 5 mL de Ficoll-paque™ Plus (GE Healthcare) e em seguida a amostra diluída com PBS foi adicionada lentamente para que fossem formadas duas interfaces. Em seguida, o tubo cônico foi centrifugado a 2000 rotações por minuto (RPM) por 30 minutos, utilizando a centrífuga Hettich Zentrifugen Universal 320 R. Após a centrifugação, na região interfásica ocorreu a formação de camada de células linfomononucleares, a qual foi recolhida por pipetagem e transferida para outro tubo de 50 mL. Por fim, as células foram lavadas por mais uma vez com PBS 1x, e foram centrifugadas a 4000 RPM por 20 minutos a 15°C. O sobrenadante foi desprezado, o *pellet* de células foi ressuscitado em 1 mL de PBS 1x, a solução foi transferida para um microtubo de 1,5 mL, retirando-se 10 µl para a contagem de células linfomononucleares e o restante seguiu para armazenamento em refrigerador (Ultra Low Sanyo) a -80°C.

Para a contagem de células linfomononucleares utilizou-se 10µl de células diluídas em 90 µl de PBS 1x. Retirou-se 10 µl dessa solução para a contagem celular na câmara de Neubauer. Para obtenção do número de células/mL de cada paciente utilizou-se a seguinte fórmula: Número de células contadas na câmara de Neubauer x 10 x 10000/4.

5.7.2 Extração de DNA para quantificação de TREC

A extração foi realizada de acordo com o protocolo do PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen). Primeiramente foi adicionado em um microtubo de 1,5 ml: 10^6 células com volume total de 200 μ l em PBS, 20 μ l de proteinase K (20 mg/ml) e 20 μ l de RNase (Ribonuclease) A (20 mg/ml). Em seguida, o *mix* é levado para agitação no Agitador Tipo Vortex QL-901 (Biomixer) e incubado durante 2 minutos. Foi adicionado então, 200 μ l de Tampão de Lise, levado ao agitador tipo vortex novamente e incubado no Banho-Maria EV:015-DTP (EVLAB LTDA) a 55°C por 10 minutos. Retirado do banho-maria, colocou-se 200 μ l de etanol absoluto e realizou-se a transferência da amostra para a coluna do *kit* acoplada ao tubo coletor. Posteriormente, são iniciados três ciclos de centrifugação durante 1 minuto a 10.000 RPM em centrífuga 5415R (Eppendorf), transferência da amostra da a coluna de um tubo coletor para outro, descarte do primeiro tubo coletor e adição de 500 μ l de solução.

No ciclo 1, a solução utilizada foi a Solução de Lavagem I; no ciclo 2, Solução de Lavagem Tipo II e no ciclo 3, houve uma centrifugação de 13.000 RPM por 3 minutos, transferência do conteúdo da amostra da coluna para um microtubo de 1,5 μ l e adição de 100 μ l de água destilada/deionizada Purelink em cada coluna para eluição do DNA.

Após a eluição do DNA, ocorreu uma última centrifugação a 13.000 RPM, o DNA foi transferido do tubo coletor para um microtubo de 0,5 mL e acondicionado em congelador a -20°C.

5.7.3 Curva absoluta de TREC

A curva absoluta foi montada utilizando o *kit* de clonagem TOPO TA Cloning® (Invitrogen). Resumidamente, foi realizada uma PCR comum, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores para o fragmento TREC. Em seguida, em um microtubo de 1,5 mL foi adicionado 1 μ L da PCR, 3 μ L de água MilliQ, 1 μ L de solução de sal e 1 μ L de vetor, e foi incubado a 5 °C *overnight*. O próximo passo foi transformar as bactérias competentes com os vetores contendo o inserto. Em um tubo de *One Shot® Competent Cells* (Invitrogen), foi adicionado 2 μ l do vetor e a transformação foi por eletroporação. As bactérias transformadas foram incubadas em placas de Petri contendo meio LB (Luria Bertani) com 50 μ g/mL de kanamicina e

X-Gal. A colônias que cresceram de cor branca foram selecionadas e cresceram em meio S.O.C. a temperatura de 37°C.

5.7.4 Purificação do DNA plasmidal de *Escherichia coli*

O DNA plasmidal que correspondente ao vetor contendo o fragmento de amplificação foi purificado com o *kit Pure Yield™ Plasmid Miniprep System* (Promega®), conforme recomendações do fabricante:

Em microtubo estéril de 1,5 mL foi adicionado 600 µL do inóculo de cultura bacteriana, 100 µL de solução *Cell Lysis Buffer* e homogeneizado seis vezes por inversão. Foi adicionado 350 µL de *Neutralization Buffer* previamente refrigerado, homogeneizou-se seis vezes por inversão e foi centrifugado a 13000 RPM por três minutos. O sobrenadante foi transferido para o tubo-filtro cuidadosamente sem misturar ao *pellet* formado. Após o tubo-filtro ser centrifugado a 13000 RPM por 15 segundos, o material eluído foi descartado e acrescentou-se ao tubo 200 µL de solução *Endotoxin Removal Wash* (ERB) e centrifugado novamente a 13000 RPM por 15 segundos. Descartado o material eluído, foram adicionados 400 µL de *Column Wash Solution* (CWC) e procedeu-se a centrifugação a 13000 RPM por 30 segundos. Finalmente, para a eluir o DNA plasmidal foi utilizado 30 µL de solução *Elution Buffer* e foi centrifugado a 13000 RPM por 15 segundos. O material resultante desta centrifugação conferiu o DNA plasmidal extraído da cultura de *E. coli* contendo o fragmento de amplificação.

Para verificar se o plasmídeo contém o inserto, outro procedimento de PCR foi realizado com oligonucleotídeos iniciadores M13 senso e antisenso. A banda esperada em gel de agarose 1% em TBE foi de aproximadamente 600 pb. Com a presença da banda, este produto foi submetido ao sequenciamento para verificar se o inserto possui a sequência de TREC.

Para a curva padrão absoluta, foi realizada a quantificação e cálculo do número de partículas TREC. Para isso, foi realizado um cálculo que levou em consideração a massa molecular do plasmídeo acrescido da massa molecular do inserto. Foram realizadas diluições seriadas com fator 10, variando de 10 a 10⁷ para o desenho da curva padrão.

5.7.5 Quantificação do DNA

A avaliação qualitativa e quantitativa de DNA foi realizada para verificar a quantificação e grau de pureza do DNA extraído das amostras de sangue coletada dos pacientes e do padrão TREC plasmidal. Este procedimento foi realizado utilizando-se o *kit Quant-iT™ dsDNA Assay ssBR* (Invitrogen®) para o fluorômetro Qubit® (Invitrogen®) e procedeu-se a leitura das amostras seguindo as instruções do fabricante.

5.7.6 Detecção e quantificação de partículas TREC

A quantificação da concentração de partículas TREC foi determinada pelo método de reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real (qPCR), utilizando o equipamento StepOnePlus™ (Applied Biosystems®).

A PCR em tempo real foi realizada utilizando-se, para um volume total de 20 µL: 40 ng de DNA de cada amostra; 0,5 µL de cada oligonucleotídeo iniciador (*forward* e *reverse*) a 100 µMol e 12,5 µL de reagente QuantiFast® SYBR® Green PCR (Quiagen®). Os oligonucleotídeos iniciadores de jsTREC (*joint signal TCR rearrangement excision circles*) utilizados para a reação de PCR foram: *Forward* 5'-CCT GTT TGT TAA GGC ACA TTA GAA TCT CTC ACT G-3', *Reverse* 5'-CTA ATA ATA AGA TCC TCA AGG GTC GAG ACT GTC-3'. O tamanho do produto gerado foi de 360 pares de base.

As condições de ciclagem da PCR foram: 10 minutos a 95 °C, seguidos de 20 segundos a 95 °C, um minuto e 20 segundos a 63,5 °C por 40 ciclos consecutivos. Os ensaios foram realizados em duplicata incluindo a série de diluições do padrão de jsTREC plasmidal em concentrações de 10 a 10⁷ números de partículas.

5.7.7 Extração e quantificação do RNA

De cada paciente, o RNA total foi extraído de 10⁶ células linfomonucleares, previamente calculadas. A extração de RNA foi realizada pelo método do Trizol, de acordo com o protocolo do fabricante. Em microtubo de 1,5mL, foi acrescentado às células linfomonucleares 1mL de *Trizol Reagent* (Invitrogen) e 200µL de clorofórmio (Merk) a cada tubo. Após homogeneização por 2 minutos em Agitador Vortex Quimis, o conteúdo foi centrifugado na centrífuga Eppendorf Centrifuge 5415R a 12.000 RPM por 10 minutos a 60C. Após este período, o sobrenadante de cada tubo

foi transferido para outro microtubo de 1,5 mL, contendo 500µL de isopropanol (Merk) e em seguida homogeneizado manualmente. Este microtubo foi armazenado em refrigerador a -20°C para precipitação por um período de 24 horas. Decorrido este período, uma nova centrifugação a 12.000 RPM, por 20 minutos a 60C, será realizada. Após centrifugação, será retirado o sobrenadante, restando o *pellete* de RNA no lado e no fundo do tubo, e a este RNA precipitado foi acrescentado 1 mL de etanol 70% (Merk) em água DEPC (dietil pirocarbonato) onde foi centrifugado a 12.000 RPM, por 20 minutos a 6°C, para ser realizada a lavagem do RNA. Após esta lavagem, o *pellet* de RNA foi secado por evaporação a 37 °C, e diluído em 30 µL de água DEPC.

A análise de qualidade do RNA foi realizada em gel de agarose e formaldeído. Neste gel avaliou-se a contaminação por DNA genômico e verificou se ocorreu degradação da amostra. No gel estavam presentes duas bandas, 28S e 18S, sendo que a banda de 28S deve estar mais intensa que a de 18S. A ocorrência de outra banda, de tamanho superior a de 28S, denotaria contaminação por DNA genômico. Neste caso a amostra deveria ser submetida à re-extração por Trizol.

Após este procedimento, as amostras foram quantificadas utilizando o equipamento Invitrogen Qubit® Fluorometer e o Q32852 Quant-iT RNA Assay Kit, 100 assays *5-100ng* (250pg/uL-100ng/uL) para a leitura das amostras, seguindo as instruções do fabricante.

5.7.8 Síntese de cDNA (DNA complementar)

A transcrição reversa, das amostras, foi realizada para a obtenção do cDNA utilizado na reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR). Deste modo, este procedimento foi realizado utilizando o kit Superscript ® III Reverse Transcriptase – Invitrogen de acordo com o protocolo do fabricante. Na reação serão acrescentados 1µg da amostra de RNA de cada paciente (previamente quantificadas), oligo dT 500 pmol/mL e dNTP a 10mM, com volume final de 13µL. A reação foi incubada a 65°C por 5 minutos no termociclador (Eppendorf Mastercycler) e transferida imediatamente para o gelo. Foram adicionados, então, tampão 5x (first strand buffer), DTT (ditiotreitól) 10 mM, MgCl₂ a 50mM e Super script III 10.000U – 200U/mL, com volume final de 20 µL, levando-se a reação a 50°C por 50 minutos. Depois a enzima foi inativada, aquecendo-se a solução a 85°C por 5 minutos. Após o término da reação, em cada amostra, foi acrescentado 10 µL de água destilada

ultra pura Gibco (Invitrogen), totalizando um volume final de 30 μ L.

5.7.9 Expressão gênica de IL-7

No presente estudo, foi realizada a quantificação relativa. Para a detecção dos amplicons foi utilizado o agente fluorescente Sybr Green. As amostras foram feitas em duplicata.

Para a quantificação de IL-7 foi utilizado o par de oligonucleotídeos iniciadores:
 IL7F: 5' CGAGCAGCACGGAATAAAAA '3 e IL7R: 5'
 TCTAATGGTCAGCATCGATCA '3.

A reação de qPCR foi realizada no StepOne Plus (Real Time PCR Systems - Applied Biosystems) com o reagent Sybr Green (Applied Biosystems). A partir da reação de transcrição reversa, será utilizado cDNA, SYBR Green PCR Mastermix (2x), primers (18 μ M) *forward* e *reverse*, e água Milli Q autoclavada qsp 20 μ L. Após um período de 10 minutos a 50°C para ativação da enzima e desnaturação de 5 minutos a 95°C, serão executados 45 ciclos de 95°C por 30 segundos e 60°C por 1 minuto. Ao final, foi realizado o protocolo de dissociação térmica, para controle da especificidade da reação.

Os resultados foram analisados pelo StepOnePlusTM Software v2.0. Para a quantificação relativa, foi realizado o seguinte cálculo: será determinado o CT (do inglês *cyclethreshold*). O CT é o número de ciclos onde foi iniciada a fase exponencial da reação. Ele é determinado por uma linha traçada perpendicular ao eixo X. Onde há a interseção desta linha com a curva de fluorescência, é determinado o ciclo para quantificação, o CT. Os valores de CT dos genes de interesse serão normalizados em relação ao CT dos genes constitutivos, o GAPDH (do inglês Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) e a β -actina, resultando o Δ CT, que é o CTgene - CTconstitutivo. Por fim, foi calculado o $2^{-\Delta$ CT}, sendo este o valor a ser trabalhado como representante da expressão relativa para cada gene.

5.8 Análise estatística

Os dados obtidos foram armazenados em banco de dados elaborado no Programa Excel (Windows, Microsoft®) para posterior realização da análise estatística. Para análise estatística, foram utilizados os programas BioEstat 5.0 e o GraphPad Prism 5.0. O teste utilizado para a comparação entre grupos foi o teste de

Mann-Whitney e para a análise de correlação foi utilizado o teste de correlação de Spearman. Foi adotado valor de $p \leq 0,05$ como nível de significância.

6 RESULTADOS

6.1 Características da amostra

Dos 39 pacientes estudados, dois foram excluídos do estudo por apresentarem doença autoimune, restando 37 para a análise. Dentre os 37, dezesseis compõem o grupo dos portadores de HTLV-1 com PET/MAH (PET) e 21 o grupo dos portadores de HTLV-1 sem PET/MAH (NPET). No grupo PET, houve predominância do sexo feminino (75,0%), a idade variou de 35 a 66 anos, e aqueles indivíduos com idade ≤ 59 anos corresponderam a maioria da amostra (68,7%) neste grupo. Fato semelhante ocorreu no grupo NPET, onde houve predominância do sexo feminino (76,2%), com idade variando entre 18 e 71 anos e novamente a maior porcentagem da população se enquadrava no grupo com idade ≤ 59 anos (71,4%) (Tabela 01).

Tabela 01 – Características demográficas e clínicas de portadores de HTLV-1 dos grupos PET e NPET, atendidos no Laboratório de Clínica e Epidemiologia de Doenças Endêmicas do NMT-UFPA, Belém-PA, 2010-2016.

	PET (n = 16)		NPET (n = 21)		Valor de p
	(n)	(%)	(n)	(%)	
Sexo					
Feminino	12	75,0	16	76,2	
Masculino	4	25,0	5	23,8	0,76*
Idade					
≤ 59	11	68,7	15	71,4	
≥ 60	5	31,3	6	28,6	0,85*
Uso de Auxílio					
CAD	4	25	0	0	
SCAD	12	75	21	100	0,05*

Fonte: Protocolo de pesquisa, 2010-2016.

Legenda: PET: Pacientes com PET/MAH. NPET: Pacientes sem PET/MAH. ≤ 59 : Pacientes com idade menor ou igual a 59 anos. ≥ 60 : Pacientes com idade maior ou igual a 60 anos. CAD: Pacientes em uso de cadeira de rodas como auxílio de marcha. SCAD: Pacientes que não fazem uso de cadeira de rodas como auxílio de marcha.

*Teste G de contingência, nível de significância: $p \leq 0,05$.

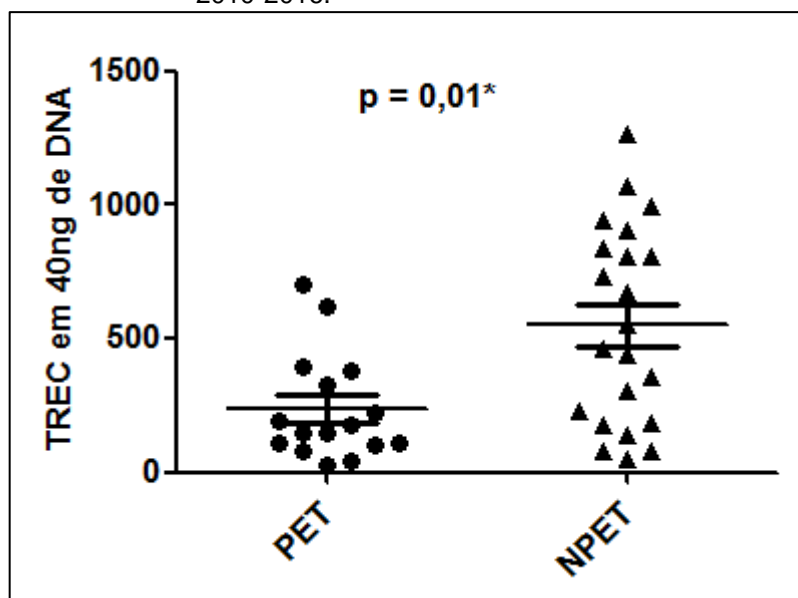
Não foi observada diferença entre as variáveis sexo ($p = 0,76$) e idade ($p = 0,85$) entre os grupos estudados, como mostra a Tabela 1, demonstrando que as amostras são semelhantes para estas variáveis e assim ambas as variáveis não representam um viés de quantificou TREC e a expressão de IL-7.

O uso de cadeira de rodas foi verificado somente nos pacientes PET devido à progressão da doença. Com isso, verifica-se que os cadeirantes totalizam 25% com idade máxima e mínima de 61 e 43 anos respectivamente e os não-cadeirantes somam 75%, com idade máxima de 66 e idade mínima de 35 (Tabela 01). A variável uso de auxílio apresenta diferença ($p = 0,05$), porém só serão utilizados os dados do grupo PET.

6.2 Função tímica de pacientes infectados pelo HTLV com PET/MAH e sem PET/MAH

Para a avaliação da função tímica dos pacientes estudados, utilizou-se a quantificação de partículas TREC. Verificou-se que há uma baixa concentração de partículas de TREC no grupo PET, comparado ao grupo NPET, de forma significativa ($p = 0,01$), sugerindo que a infecção pelo HTLV-1, juntamente com a evolução da PET/MAH, traz uma redução na função tímica da população estudada (Gráfico 01).

Gráfico 01 – Comparação de TREC em PET e NPET, dos pacientes portadores de HTLV-1 atendidos no Laboratório de Clínica e Epidemiologia de Doenças Endêmicas do NMT-UFPA, Belém-PA, 2010-2016.



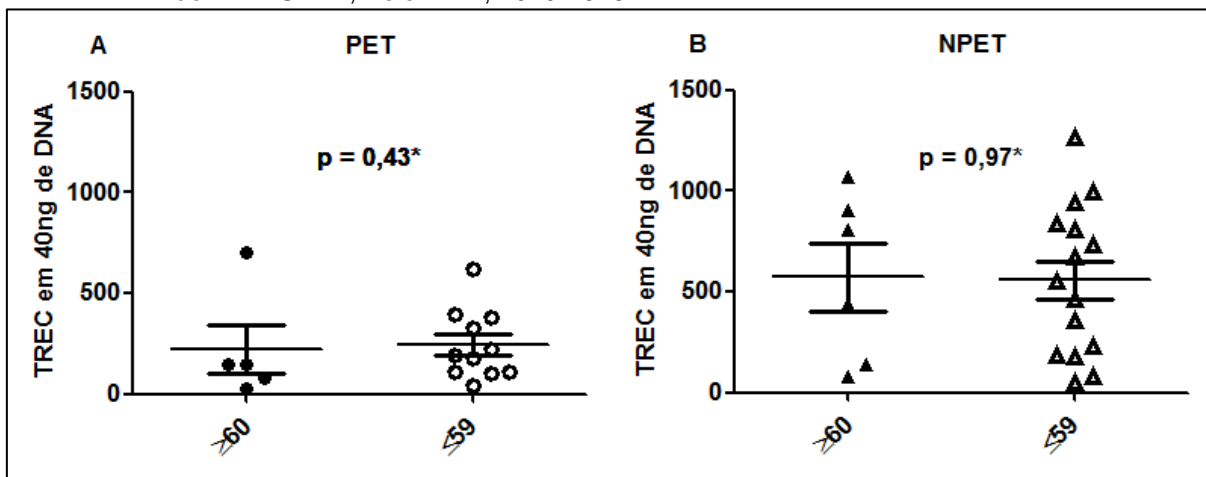
Fonte: Protocolo de pesquisa, 2010-2016.

Legenda: PET: Pacientes com PET/MAH. NPET: Pacientes sem PET/MAH. TREC: Círculos Excisados do Receptor de Células T.

* Teste de Mann-Whitney, nível de significância: $p \leq 0,05$.

Em seguida, os pacientes foram divididos em dois grupos de acordo com a idade: ≤ 59 anos e ≥ 60 anos. Comparando os dois grupos da idade, tanto de acordo com o grupo PET ($p = 0,43$) como com o grupo NPET ($p = 0,97$), em ambas as comparações não foi obtido uma diferença significativa (Gráfico 02).

Gráfico 02 – (A) Comparação de TREC entre pacientes ≥ 60 e ≤ 59 PET (B) Comparação de TREC entre pacientes ≥ 60 e ≤ 59 NPET. (A) e (B) realizados em pacientes portadores de HTLV-1 atendidos no Laboratório de Clínica e Epidemiologia de Doenças Endêmicas do NMT-UFPA, Belém-PA, 2010-2016.



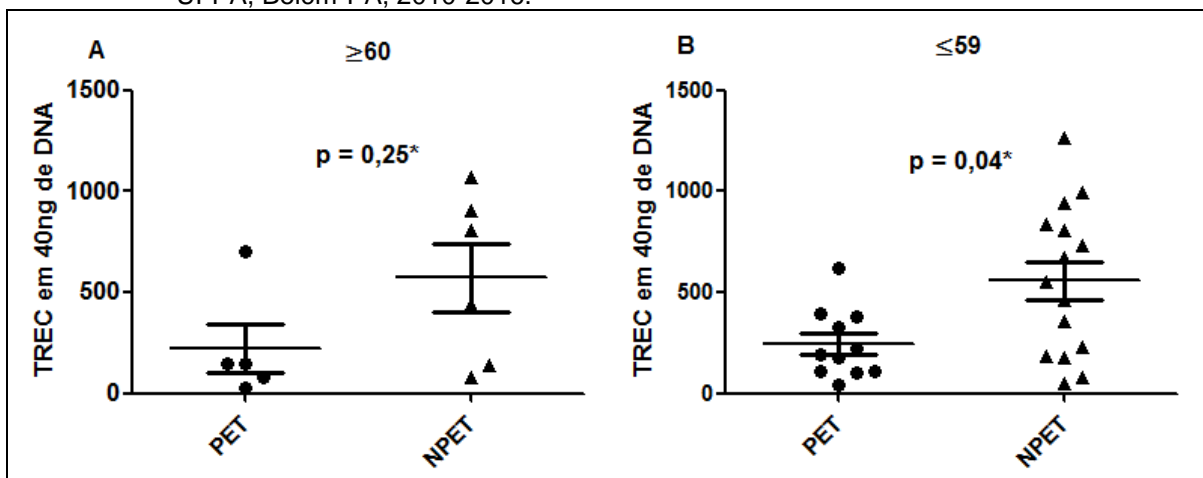
Fonte: Protocolo de pesquisa, 2010-2016.

Legenda: PET: Pacientes com PET/MAH. NPET: Pacientes sem PET/MAH. ≤ 59 : Pacientes com idade menor ou igual a 59 anos. ≥ 60 : Pacientes com idade maior ou igual a 60 anos. TREC: Círculos Excisados do Receptor de Células T.

* Teste de Mann-Whitney, nível de significância: $p \leq 0,05$.

Já comparando pacientes com idade ≤ 59 anos PET e NPET, verificou-se o mesmo resultado anterior, no qual o grupo PET apresentou menor número de partículas ($p = 0,04$). Nos pacientes com idade de 60 anos ou mais, o grupo PET também apresentou menor número de partículas TREC, porém esta diferença não foi significativa ($p = 0,25$). Os dados apresentados mostram que principalmente em pacientes com idade ≤ 59 anos, a instalação da PET/MAH poderia contribuir com a redução da função tímica, sendo que esta influência pode ser minimizada com o passar da idade, principalmente a partir dos 60 anos (Gráfico 03).

Gráfico 03 – (A) Comparação de TREC entre PET e NPET em ≥ 60 . (B) Comparação de TREC entre PET e NPET em ≤ 59 . (A) e (B) realizados em pacientes portadores de HTLV-1 atendidos no Laboratório de Clínica e Epidemiologia de Doenças Endêmicas do NMT-UFPA, Belém-PA, 2010-2016.



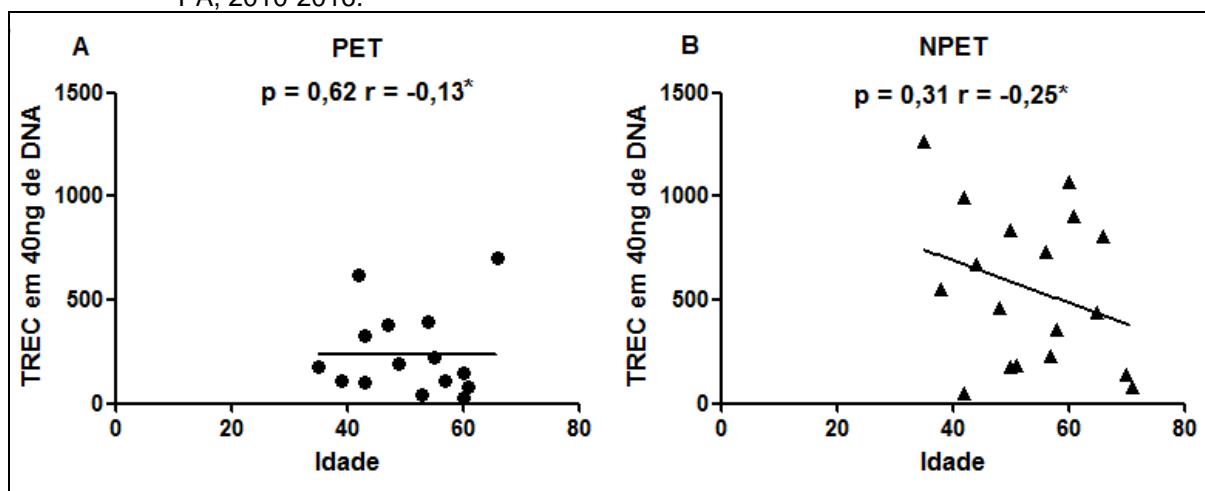
Fonte: Protocolo de pesquisa, 2010-2016.

Legenda: PET: Pacientes com PET/MAH. NPET: Pacientes sem PET/MAH. ≤ 59 : Pacientes com idade menor ou igual a 59 anos. ≥ 60 : Pacientes com idade maior ou igual a 60 anos. TREC: Círculos Excisados do Receptor de Células T.

*Teste de Mann-Whitney, nível de significância: $p \leq 0,05$.

Como verificado anteriormente, a quantificação de TREC dentre os pacientes do grupo PET é menor comparado ao grupo NPET. Quando correlacionada a idade dos pacientes com a quantificação de TREC no grupo PET, verifica-se que esses pacientes na condição de portadores de PET/MAH não possuem redução na quantificação de TREC com o passar da idade ($p = 0,62$, $r = -0,13$), da mesma maneira que a correlação é nula no grupo NPET ($p = 0,31$, $r = -0,25$) (Gráfico 04). Apesar de ambas as correlações não serem estatisticamente significantes, elas mostram certo padrão de disposição das amostras, onde a redução de partículas TREC de acordo com o avançar da idade dos pacientes tende a ocorrer em pacientes NPET.

Gráfico 04 – (A) Correlação entre TREC e a idade em PET. **(B)** Correlação entre TREC e a idade em NPET. **(A)** e **(B)** realizados em pacientes portadores de HTLV-1 atendidos no Laboratório de Clínica e Epidemiologia de Doenças Endêmicas do NMT-UFPA, Belém-PA, 2010-2016.



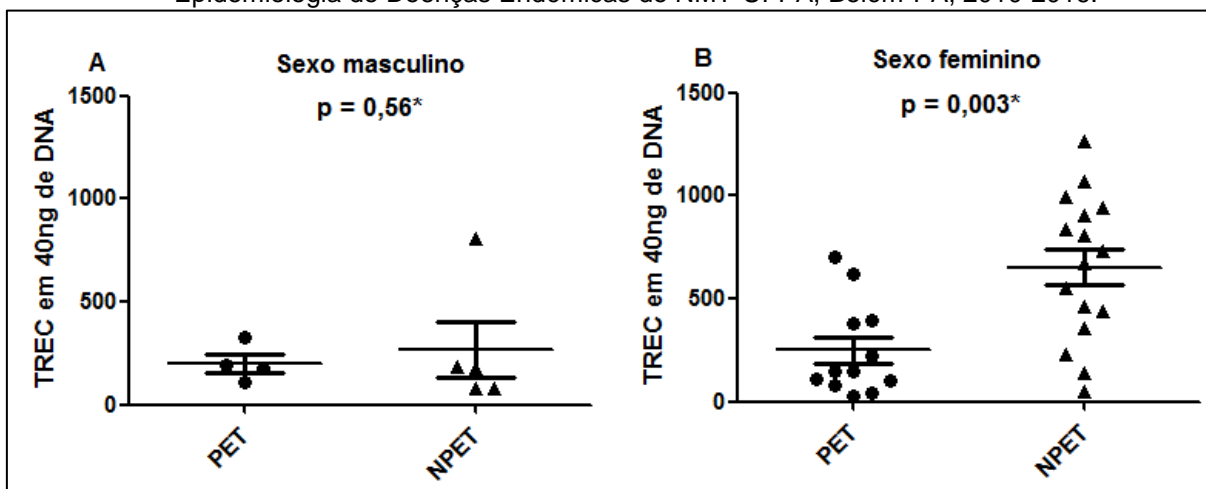
Fonte: Protocolo de pesquisa, 2010-2016.

Legenda: PET: Pacientes com PET/MAH. NPET: Pacientes sem PET/MAH. TREC: Círculos Excisados do Receptor de Células T.

*Correlação de Spearman, nível de significância: $p \leq 0,05$.

Na análise da quantificação de TREC de acordo com o sexo, pacientes do sexo masculino dos grupos PET e NPET não possuem diferença significativa ($p = 0,56$). Já a análise do sexo feminino dos grupos PET e NPET apresentou diferença significativa ($p = 0,003$), onde aquelas mulheres que possuem PET/MAH apresentaram uma menor quantidade TREC (Gráfico 05). A partir de tais dados, pode-se inferir que o sexo do paciente pode influenciar na produção de células T pelo timo, onde mulheres são mais propensas a esse perfil de redução da função tímica.

Gráfico 05 – (A) Comparação de TREC entre PET e NPET em pacientes do sexo masculino (B) Comparação de TREC entre PET e NPET em pacientes do sexo feminino (A) e (B) realizados em pacientes portadores de HTLV-1 atendidos no Laboratório de Clínica e Epidemiologia de Doenças Endêmicas do NMT-UFPA, Belém-PA, 2010-2016.



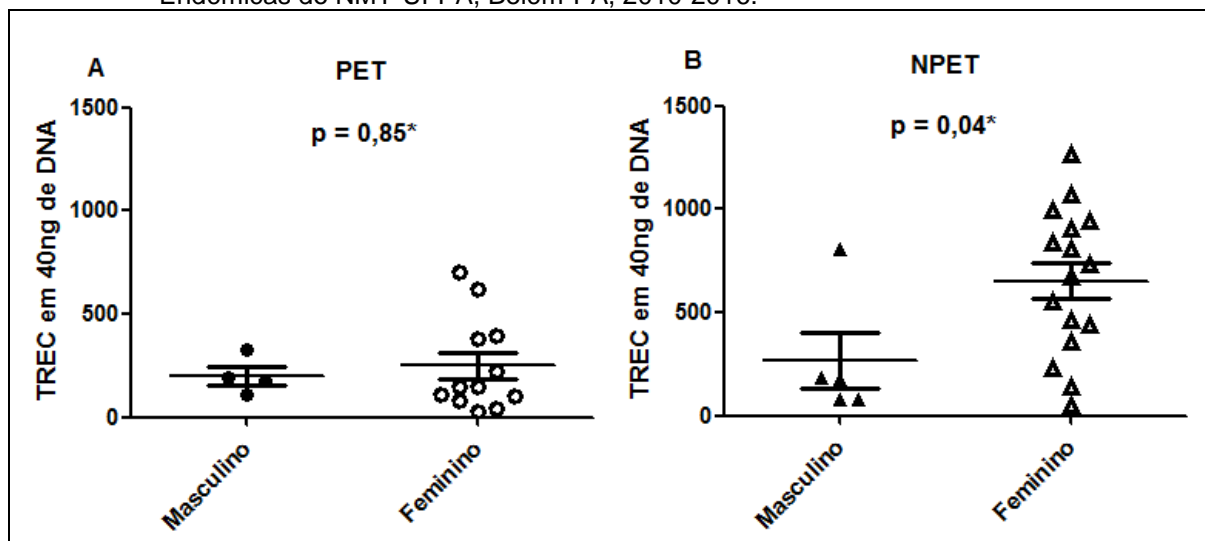
Fonte: Protocolo de pesquisa, 2010-2016.

Legenda: PET: Pacientes com PET/MAH. NPET: Pacientes sem PET/MAH. TREC: Círculos Excisados do Receptor de Células T.

*Teste de Mann-Whitney, nível de significância: $p \leq 0,05$.

Quando os pacientes PET e NPET são divididos de acordo com o sexo, percebe-se que no grupo PET, não há diferença estatisticamente significativa entre o sexo masculino e o feminino ($p = 0,85$), diferindo do comportamento apresentado pelo grupo NPET, o qual apresentou diferença estatisticamente significativa dentre os sexos ($p = 0,04$) e o sexo feminino mostrou-se com quantificação maior de TREC perante o sexo masculino (Gráfico 06).

Gráfico 06 – (A) Comparação de TREC entre sexo masculino e feminino em PET **(B)** Comparação de TREC entre sexo masculino e feminino em NPET. **(A)** e **(B)** realizados em pacientes portadores de HTLV-1 atendidos no Laboratório de Clínica e Epidemiologia de Doenças Endêmicas do NMT-UFPA, Belém-PA, 2010-2016.



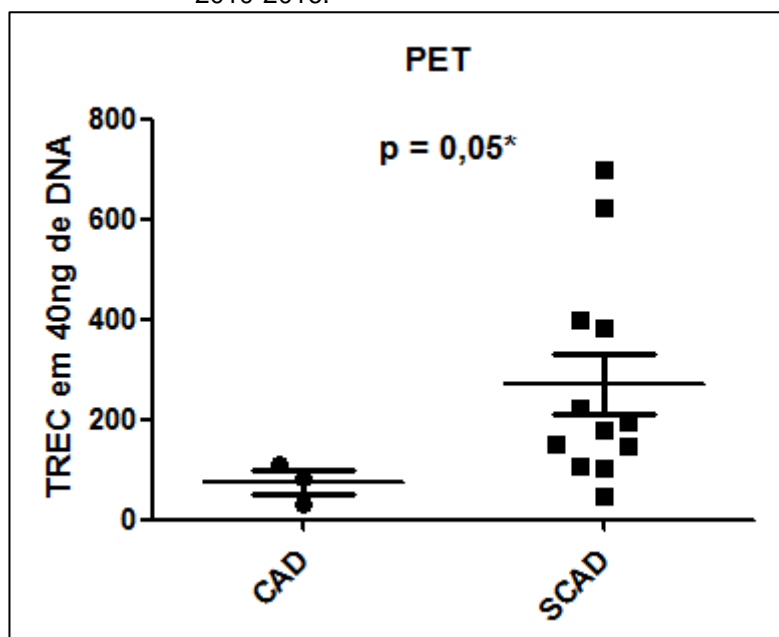
Fonte: Protocolo de pesquisa, 2010-2016.

Legenda: PET: Pacientes com PET/MAH. NPET: Pacientes sem PET/MAH. TREC: Círculos Excisados do Receptor de Células T.

*Teste de Mann-Whitney, nível de significância: $p \leq 0,05$.

Quando analisada a quantificação de TREC a partir da comparação entre pacientes em uso de cadeira de rodas (CAD) e sem cadeira de rodas (SCAD), observa-se que aqueles pertencentes ao grupo CAD possuem um menor número de cópias de TREC comparados àqueles pertencentes ao grupo SCAD, com diferença estatisticamente significativa ($p = 0,05$) (Gráfico 07). É possível que quando há um prejuízo na função tímica, há juntamente um prejuízo no prognóstico do indivíduo, levando ao comprometimento da marcha, fazendo com que o paciente seja obrigado a usar cadeira de rodas para sua locomoção.

Gráfico 07 – Comparação de TREC entre CAD e SCAD, em pacientes portadores de HTLV-1 atendidos no Laboratório de Clínica e Epidemiologia de Doenças Endêmicas do NMT-UFPA, Belém-PA, 2010-2016.



Fonte: Protocolo de pesquisa, 2010-2016.

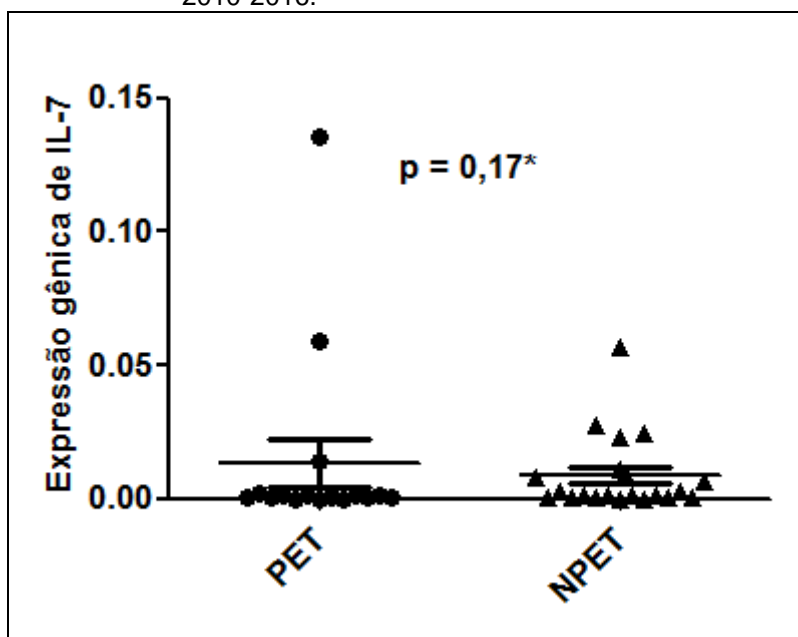
Legenda: PET: Pacientes com PET/MAH. NPET: Pacientes sem PET/MAH. CAD: Pacientes em uso de cadeira de rodas como auxílio de marcha. SCAD: Pacientes que não fazem uso de cadeira de rodas como auxílio de marcha. TREC: Círculos Excisados do Receptor de Células T.

*Teste de Mann-Whitney, nível de significância: $p \leq 0,05$.

6.3 Expressão gênica da IL-7 em pacientes infectados pelo HTLV com PET/MAH e sem PET/MAH

A expressão do gene da IL-7 é maior no grupo PET comparada à do NPET, porém a diferença entre os dois grupos não é estatisticamente ($p = 0,17$) (Gráfico 08). Apesar de não haver diferença estatisticamente significativa entre os grupos, os dados mostram um perfil de maior expressão de IL-7 em pacientes do grupo PET.

Gráfico 08 – Comparação da expressão gênica de IL-7 entre PET e NPET, de pacientes portadores de HTLV-1 atendidos no Laboratório de Clínica e Epidemiologia de Doenças Endêmicas do NMT-UFPA, Belém-PA, 2010-2016.



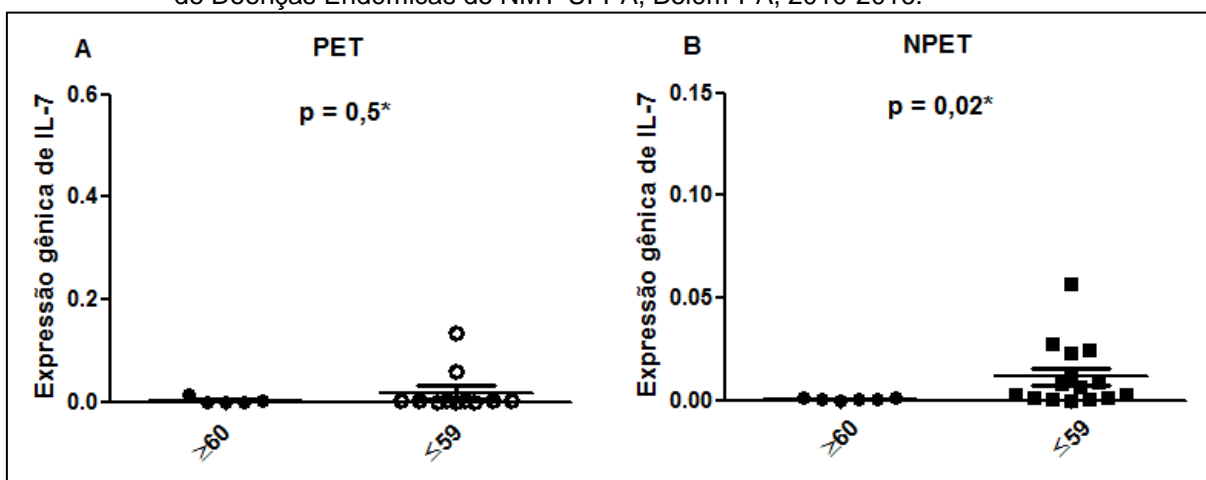
Fonte: Protocolo de pesquisa, 2010-2016.

Legenda: PET: Pacientes com PET/MAH. NPET: Pacientes sem PET/MAH. IL-7: Interleucina 7.

*Teste de Mann-Whitney, nível de significância: $p \leq 0,05$.

Quando comparados os pacientes ≤ 59 anos e maiores de 60 no grupo PET, verifica-se que a expressão gênica de IL-7 não apresenta diferença estatisticamente significativa ($p = 0,50$). Já o grupo NPET apresenta maior expressão gênica de IL-7 entre ≤ 59 anos, comparado aos ≥ 60 anos, com diferença estatisticamente significativa ($p = 0,02$) (Gráfico 09).

Gráfico 09 – (A) Comparação da expressão gênica de IL-7 entre ≥ 60 e ≤ 59 em PET **(B)** Comparação da expressão gênica de IL-7 entre ≥ 60 e ≤ 59 em NPET **(A)** e **(B)** realizados em pacientes portadores de HTLV-1 atendidos no Laboratório de Clínica e Epidemiologia de Doenças Endêmicas do NMT-UFPA, Belém-PA, 2010-2016.



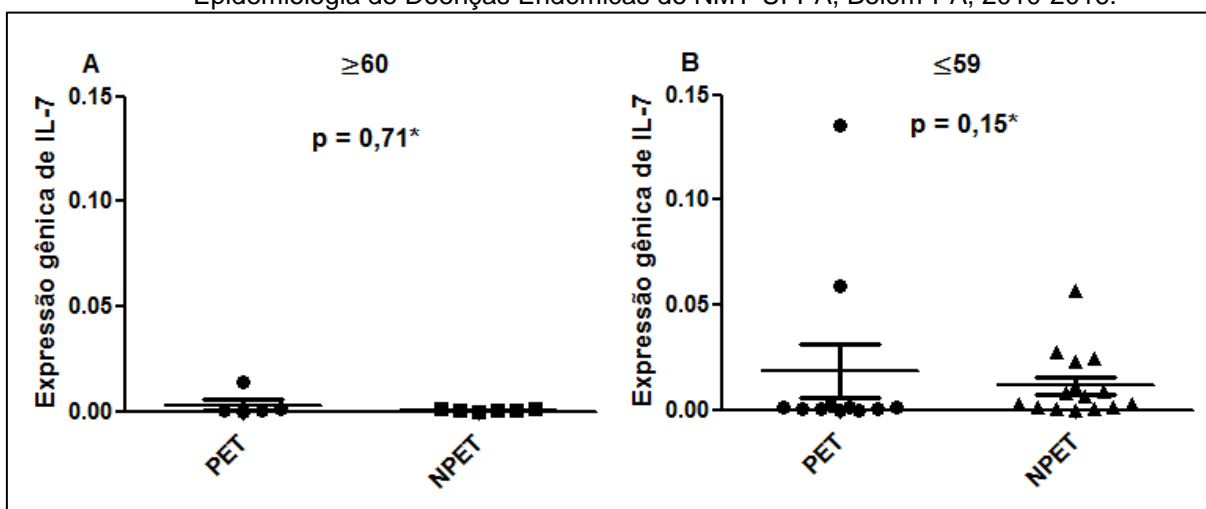
Fonte: Protocolo de pesquisa, 2010-2016.

Legenda: PET: Pacientes com PET/MAH. NPET: Pacientes sem PET/MAH. ≤ 59 : Pacientes com idade menor ou igual a 59 anos. ≥ 60 : Pacientes com idade maior ou igual a 60 anos. IL-7 Interleucina 7.

*Teste de Mann-Whitney, nível de significância: $p \leq 0,05$.

Para os pacientes maiores de ≥ 60 anos, o grupo PET apresenta maior expressão do gene da IL-7 comparados aos pacientes do grupo NPET, e o mesmo comportamento da amostra foi observado nos pacientes ≤ 59 anos entre os dois grupos, PET e NPET, todavia, tanto entre os maiores de 60 anos quanto os menores de 60 anos, não houve diferença significativa entre os grupos PET e NPET, apresentando $p = 0,71$ e $p = 0,15$, respectivamente (Gráfico 10).

Gráfico 10 – (A) Comparação da expressão gênica de IL-7 entre PET e NPET em ≥ 60 . (B) Comparação da expressão gênica de IL-7 entre PET e NPET em ≤ 59 . (A) e (B) realizados em pacientes portadores de HTLV-1 atendidos no Laboratório de Clínica e Epidemiologia de Doenças Endêmicas do NMT-UFPA, Belém-PA, 2010-2016.



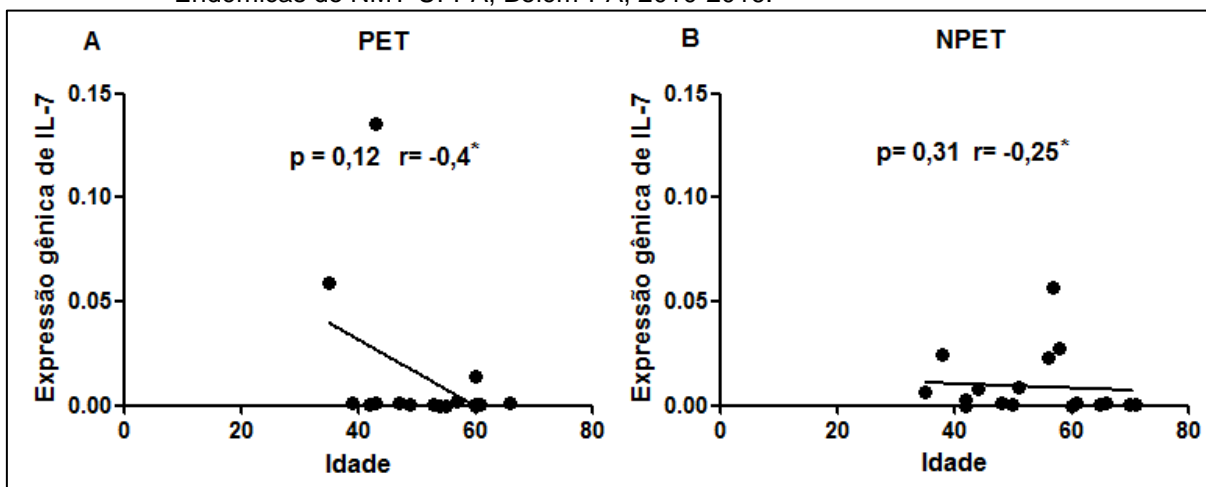
Fonte: Protocolo de pesquisa, 2010-2016. ($p \leq 0,05$).

Legenda: PET: Pacientes com PET/MAH. NPET: Pacientes sem PET/MAH. ≤ 59 : Pacientes com idade menor ou igual a 59 anos. ≥ 60 : Pacientes com idade maior ou igual a 60 anos. IL-7: Interleucina 7.

*Teste de Mann-Whitney, nível de significância: $p \leq 0,05$.

Quando correlacionada a idade dos pacientes com a quantificação relativa do gene da IL-7 tanto no grupo PET ($p = 0,12$ e $r = -0,4$) quanto no NPET ($p = 0,31$ e $r = -0,25$), verifica-se que os pacientes apresentam uma redução na produção de IL-7, onde ambas as correlações não foram estatisticamente significantes (Gráfico 11). No entanto, apesar de não haver significância nas correlações, percebe-se que os pacientes do grupo PET apresentam uma redução maior, comparados aos do grupo NPET.

Gráfico 11 – (A) Correlação entre a expressão gênica de IL-7 e idade em PET. (B) Correlação entre a expressão gênica de IL-7 e idade em NPET. (A) e (B) realizados em pacientes portadores de HTLV-1 atendidos no Laboratório de Clínica e Epidemiologia de Doenças Endêmicas do NMT-UFGA, Belém-PA, 2010-2016.



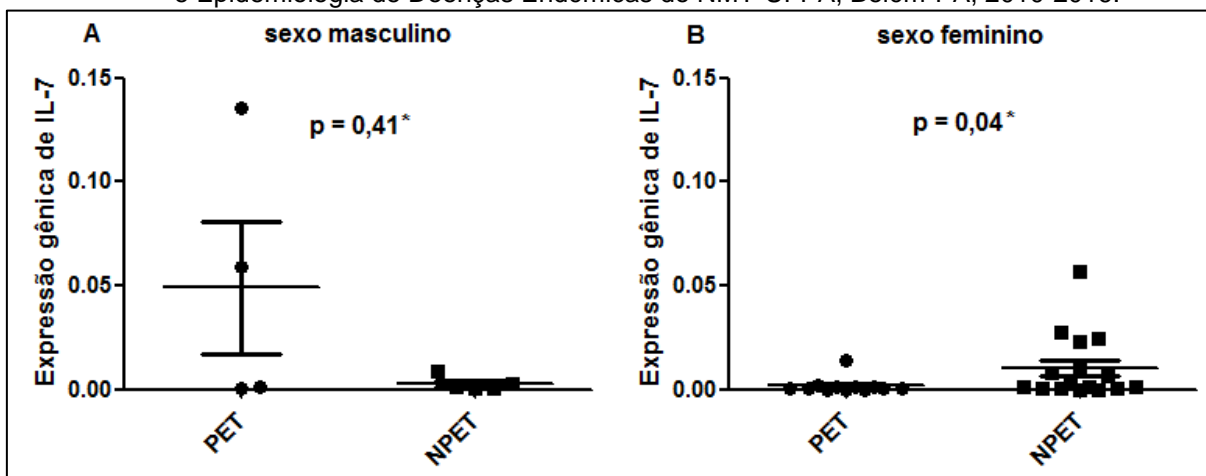
Fonte: Protocolo de pesquisa, 2010-2016.

Legenda: PET: Pacientes com PET/MAH. NPET: Pacientes sem PET/MAH. IL-7: Inteleucina 7.

*Correlação de Spearman, nível de significância: $p \leq 0,05$.

Na análise realizada de acordo com o sexo dos pacientes, o grupo PET apresentou maior expressão do gene da IL-7 do que o grupo NPET naqueles do sexo masculino, porém não houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,41$). Já entre as pacientes do sexo feminino, houve uma inversão na expressão do gene da IL-7, onde as pacientes do grupo NPET apresentaram maior expressão do que aquelas do grupo PET, com diferença estatisticamente significativa ($p = 0,04$) (Gráfico 12).

Gráfico 12 – (A) Comparação da expressão gênica de IL-7 entre PET e NPET do sexo masculino. **(B)** Comparação da expressão gênica de IL-7 entre PET e NPET do sexo feminino. **(A)** e **(B)** realizados em pacientes portadores de HTLV-1 atendidos no Laboratório de Clínica e Epidemiologia de Doenças Endêmicas do NMT-UFPA, Belém-PA, 2010-2016.



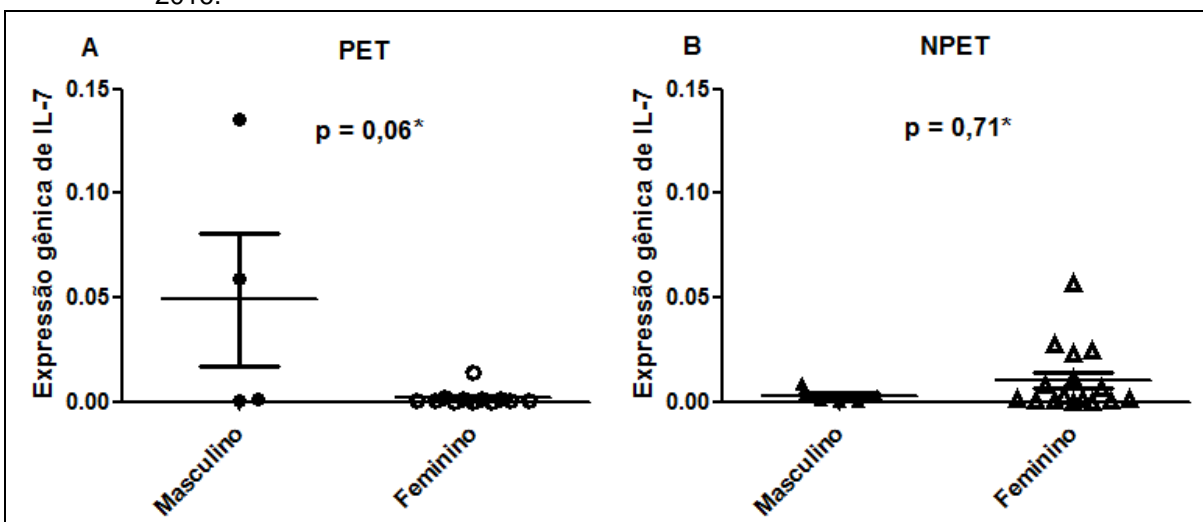
Fonte: Protocolo de pesquisa, 2010-2016.

Legenda: PET: Pacientes com PET/MAH. NPET: Pacientes sem PET/MAH. IL-7: Interleucina 7.

*Teste de Mann-Whitney, nível de significância: $p \leq 0,05$.

Os grupos PET e NPET, quando divididos de acordo com o sexo, verifica-se que não há diferença estatisticamente significativa quanto à expressão gênica de IL-7 com $p = 0,06$ e $p = 0,71$ respectivamente (Gráfico 13).

Gráfico 13 – (A) Comparação da expressão gênica de IL-7 entre sexo masculino e feminino em PET. **(B)** Comparação da expressão gênica de IL-7 entre sexo masculino e feminino em NPET. **(A)** e **(B)** realizados em pacientes portadores de HTLV-1 atendidos no Laboratório de Clínica e Epidemiologia de Doenças Endêmicas do NMT-UFPA, Belém-PA, 2010-2016.



Fonte: Protocolo de pesquisa, 2010-2016.

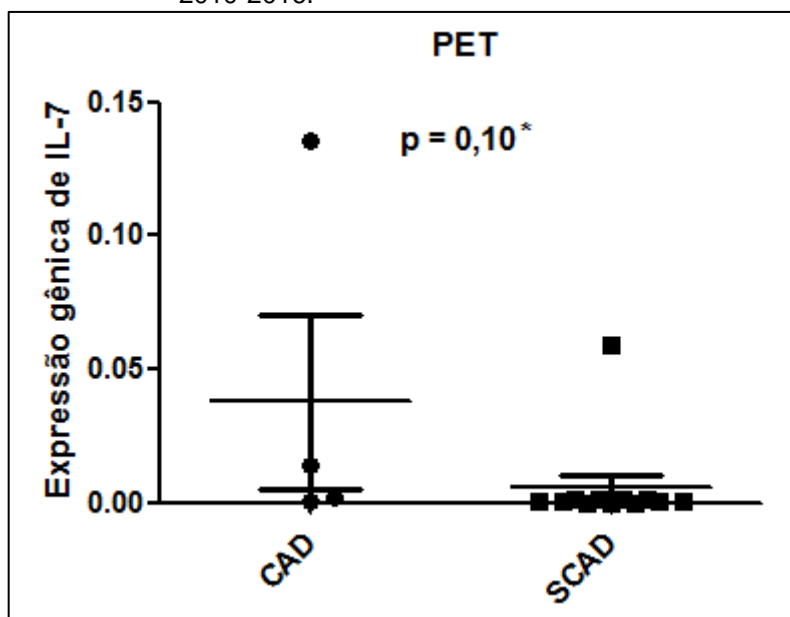
Legenda: PET: Pacientes com PET/MAH. NPET: Pacientes sem PET/MAH. IL-7: Interleucina 7.

*Teste de Mann-Whitney, nível de significância: $p \leq 0,05$.

Quando analisada expressão gênica de IL-7 a partir da comparação entre pacientes em uso de cadeira de rodas e sem cadeira de rodas, observa-se que não

há diferença entre os dois grupos ($p = 0,10$) (Gráfico 14). É possível que a expressão de IL-7 não esteja intimamente ligada na relação entre os pacientes que usam cadeira de rodas e os que não usam dentro da PET/MAH.

Gráfico 14 – Comparação da expressão gênica de IL-7 entre CAD e SCAD, em pacientes portadores de HTLV-1 atendidos no Laboratório de Clínica e Epidemiologia de Doenças Endêmicas do NMT-UFPA, Belém-PA, 2010-2016.



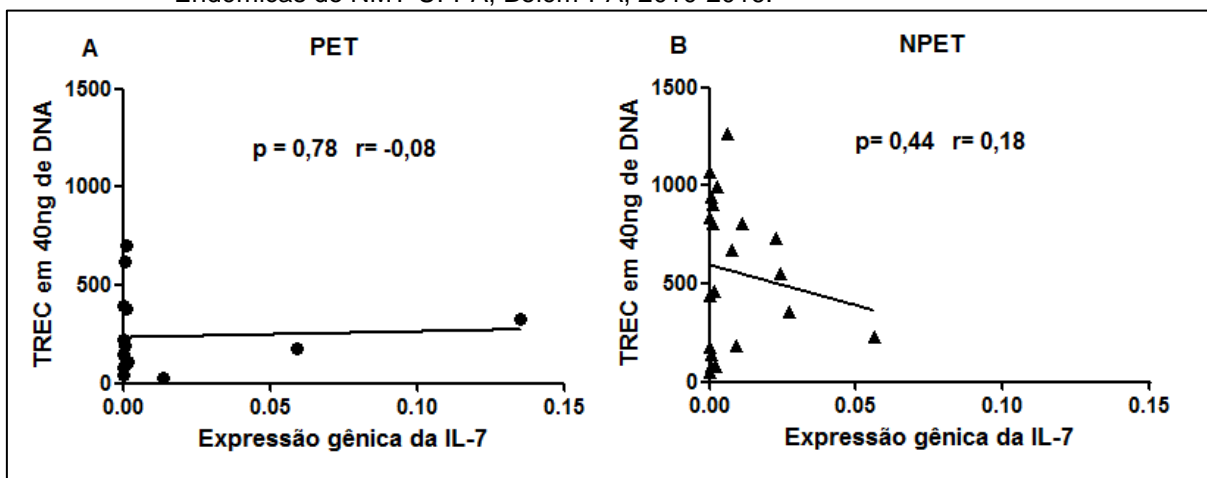
Fonte: Protocolo de pesquisa, 2010-2016.

Legenda: PET: Pacientes com PET/MAH. CAD: Pacientes em uso de cadeira de rodas como auxílio de marcha. SCAD: Pacientes que não fazem uso de cadeira de rodas como auxílio de marcha. IL-7: Interleucina 7.
*Teste de Mann-Whitney, nível de significância: $p \leq 0,05$.

6.4 Correlação entre a expressão gênica da IL-7 e a expressão de partículas TREC em pacientes infectados pelo HTLV com PET/MAH e sem PET/MAH

Quando é correlacionada a expressão gênica de IL-7 e a quantificação de TREC, verifica-se que não há correlação estatisticamente significativa, tanto no grupo PET ($p = 0,78$ e $r = -0,08$), quanto no grupo NPET ($p = 0,44$ e $r = 0,18$). No entanto, observa-se que no grupo PET, há uma tendência de que quanto maior a quantificação de TREC, maior é a expressão de IL-7, já no grupo NPET a tendência do comportamento das amostras é o oposto, com a maior presença de TREC há a menor expressão gênica de IL-7 (Gráfico 15).

Gráfico 15 – (A) Correlação entre TREC e expressão gênica de IL-7 em PET **(B)** Correlação entre TREC e expressão gênica de IL-7 em NPET. **(A)** e **(B)** realizados em pacientes portadores de HTLV-1 atendidos no Laboratório de Clínica e Epidemiologia de Doenças Endêmicas do NMT-UFGA, Belém-PA, 2010-2016.



Fonte: Protocolo de pesquisa, 2010-2016.

Legenda: PET: Pacientes com PET/MAH. NPET: Pacientes sem PET/MAH. TREC: Círculos Excisados do Receptor de Células T. IL-7: Inteleucina 7.

*Correlação de Spearman, nível de significância: $p \leq 0,05$.

7 DISCUSSÃO

A patogênese da PET/MAH continua não bem definida, porém é considerada uma doença inflamatória neurológica, na qual TCD4 infectadas por HTLV-1 e TCD8 específicas contra HTLV-1 apresentam um importante papel no desenvolvimento da doença. Estudos mostram que há a presença de infiltrado de TCD4 e TCD8 no sistema nervoso central e um aumento de citocinas inflamatórias como IFN- γ , TNF- α e IL-6 no sangue periférico, as quais são importantes mediadores da patogênese da PET/MAH. Além disso, outro ponto que demonstra desregulação da resposta imunológica nesses pacientes é a susceptibilidade de outras doenças infecciosas, como estrongiloidíase e tuberculose (HAINES *et al.*, 2009; ENOSE-AKAHATA *et al.*, 2013; COUTINHO *et al.*, 2014).

No contexto da resposta imunológica, não há muitos estudos referentes ao timo, juntamente com as suas alterações perante infecções. Sua função normal fornece um bom repertório de TCR, mantendo uma boa resposta contra agentes agressores externos. Foi demonstrado que em algumas infecções o timo sofre influência, tendo sua capacidade de produção de RTEs afetada e podendo prejudicar a homeostase do sistema imunológico, levando ao seu desequilíbrio e influenciando o quadro clínico do paciente (HAYNES *et al.*, 2000). Doenças autoimunes, como o lúpus eritematoso sistêmico, e infecções, como a causada pelo HIV, foram descritas alterando a função tímica (KAYSER; ANDRADE, 2003; SAUCE *et al.*, 2011). Assim, este trabalho dedicou-se a avaliar a função tímica nos pacientes infectados pelo HTLV-1 que desenvolveram ou não PET/MAH.

Os resultados mostraram que os pacientes que desenvolveram PET/MAH apresentaram menor número de partículas TREC quando comparados aos pacientes que não desenvolveram PET/MAH ($p = 0,01$). Tal resultado indica que há um comprometimento na função tímica e, conseqüentemente, na produção de células T *naïve* nos pacientes do grupo PET. Poucos estudos foram realizados sobre a interferência do HTLV-1 na função tímica, e apresentam resultados controversos. O estudo de Yasunaga *et al.* (2001) em humanos corrobora com os resultados obtidos neste estudo. Estes pesquisadores encontraram uma diminuição na produção de células T em pacientes infectados pelo HTLV-1 em relação a pacientes não infectados, sendo que, em pacientes que desenvolveram LLCTA a diminuição foi mais exuberante. Nota-se que com o desenvolvimento da doença associada ao

HTLV-1, o comprometimento foi maior, igual ao descrito neste trabalho, sendo que, neste caso, a doença estudada foi a PET/MAH. Entretanto, um estudo em modelo animal realizado por Villaudy *et al.* (2010) mostrou que, em camundongos HIS Rag2- γ c-/-, a infecção por HTLV-1 altera o desenvolvimento de células T no timo, estimulando a maturação precoce dos timócitos favorecendo a maior proliferação e o aumento da população dessas células T *naïve* na periferia.

A IL-7 é um fator crucial na produção de células T *naïve* e favorece a diversidade do repertório de TCR. Assim como é visto a redução no número de células *naïve* com o avançar da idade, a IL-7 também é reduzida fisiologicamente, estando ambos os fenômenos intimamente ligados (MACKALL; FRY; GRESS, 2011). Então, neste estudo a expressão do gene de IL-7 foi verificada nos pacientes do grupo PET e NPET e verificou-se que não houve diferença estatisticamente significativa dentre tais grupos ($p = 0,17$) (Gráfico 8). Isso indica que talvez, em relação à expressão de IL-7, se ocorreu a interferência da HTLV-1, foi semelhante para os dois grupos. Porém, será discutido melhor posteriormente.

A função tímica é fisiologicamente reduzida com o aumento da idade do indivíduo. A imunosenescência inicia-se no primeiro ano de vida, com uma queda acelerada durante a puberdade e ao chegar aos 50 anos está praticamente completa. Com isso, os indivíduos com idade de 60 anos ou mais apresentam uma drástica redução células T *naïve*, tanto TCD4 quanto TCD8 (CAVALLOTTI *et al.*, 2008). O estudo de Van Der Geest *et al.* (2014) mostrou que dentre os indivíduos saudáveis, a contagem de TCD4 *naïve* foi menor em indivíduos de 61 a 90 anos, quando comparados àqueles de 18 a 60 anos, porém as células T de memória apresentam-se de forma mais abundante. Assim como outro estudo realizado por Weinberger *et al.* (2007) demonstrou que a partir de 60 anos de idade, o indivíduo apresenta um declínio considerável na sua produção de células T *naïve*.

Sendo assim, separou-se em dois grupos etários cada grupo de pacientes, ≤ 59 anos e com ≥ 60 anos. Como resultado, verificou-se que aqueles que desenvolveram PET/MAH com idade ≤ 59 anos apresentaram menor quantidade de partículas TREC quando comparados aos que não desenvolveram a PET/MAH ($p = 0,04$, teste de Mann-Whitney), resultado semelhante ao encontrado anteriormente. Porém, em pacientes idosos, com idade ≥ 60 anos, apesar de manter menor quantidade de TREC em pacientes PET, a diferença entre os dois grupos perdeu a significância estatística ($p = 0,25$) (Gráfico 3). O que se pode inferir é que nos indivíduos com

idade ≤ 59 anos, como ainda não estão em imunosenescência, verifica-se melhor a interferência da ação do vírus na função tímica. Em relação à IL-7, ao separar os grupos de acordo com a idade, verificou-se que o grupo PET não apresentou diferença de expressão de IL-7 entre os grupos de com idade ≤ 59 anos e idade ≥ 60 anos. Entretanto os pacientes NPET com idade ≤ 59 anos apresentaram maior expressão de IL-7 em relação aos com idade ≥ 60 anos ($p = 0,02$) (Gráfico 9). Este resultado foi diferente ao visto anteriormente com os dados gerais. Separando por idade, pode-se verificar uma possível interferência do desenvolvimento da doença na produção de IL-7, diminuindo sua expressão mesmo em pacientes PET não idosos.

A partir da puberdade, há o início da involução do timo, e esta involução também coincide com o aumento dos hormônios sexuais (LEPOSAVIC; PERISIC; PILIPOVIC, 2012). Tanto hormônios femininos quanto masculinos causam involução tímica. A ação dos hormônios ocorre, provavelmente, pela presença de receptores de estrógeno e testosterona nas células do timo (LEPOSAVIC; PERISIC, 2008). Estratificando-se por sexo, verificou-se que em relação aos pacientes masculinos não há diferença entre pacientes do grupo PET e NPET no que tange o número de partículas TREC ($p = 0,56$) (Gráfico 5). Porém, em pacientes do sexo feminino a diferença foi significativa ($p = 0,003$) (Gráfico 5) a qual mostrou que as pacientes NPET apresentaram maior quantidade de TREC. Interessantemente, não há diferenças na quantificação de TREC entre homens e mulheres nos pacientes do grupo PET ($p = 0,85$) (Gráfico 6). O que não aconteceu entre os pacientes NPET, nos quais as mulheres apresentaram maior número de TREC ($p = 0,04$) (Gráfico 6). Esses resultados indicam que em mulheres, pode-se notar que houve diminuição de TREC após o desenvolvimento da PET/MAH, porém para homens, a quantificação de TREC foi semelhante entre os pacientes que desenvolveram ou não a PET/MAH. Esses resultados podem indicar que, em relação aos homens, haja outros mecanismos agindo sinergicamente como o desencadeado pela PET/MAH. Talvez, uma possível explicação seja que nos homens, além do efeito ocasionado pela testosterona, pode haver a ação de estrógeno somada à ação da testosterona potencializando o dano ocorrido no timo. Isso ocorre pela presença do sistema de aromatase que converte andrógeno em estrógeno, com isso, no homem, parte da ação da testosterona no timo é somado à ação do estrógeno (LEPOSAVIC; PERISIC, 2008). Outro ponto em relação ao sexo foi o resultado obtido com a

expressão de IL-7. Novamente, em relação aos homens não houve diferença significativa da expressão de IL-7 entre pacientes do grupo PET e NPET ($p = 0,41$) (Gráfico 12), mas entre as mulheres, pacientes NPET apresentaram maior expressão IL-7 ($p = 0,04$) (Gráfico 12), corroborando com os resultados anteriores.

Indivíduos com diagnóstico de PET/MAH evoluem gradativamente com comprometimento da deambulação, culminando no uso de cadeira de rodas (MARTIN *et al.*, 2010). Além disso, o paciente portador de PET/MAH apresenta intensa expansão clonal de TCD4 infectadas na periferia, com alta expressão de citocinas inflamatórias. No estudo de Dias *et al.* (2015), verificou-se que quanto maior o comprometimento na deambulação desse paciente, maior é a expressão dessas citocinas. Com isso, ficou o questionamento sobre a função tímica, se pacientes em estágio mais avançado também apresentariam maior comprometimento. Assim, separou-se o grupo de pacientes PET de acordo com o uso ou não uso de cadeira de rodas. O número de cópias de TREC foi menor em pacientes diagnosticados com PET/MAH dependentes de cadeira de rodas, comparados àqueles também diagnosticados com PET/MAH, porém não dependentes de cadeira de rodas, havendo diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ($p = 0,05$) (Gráfico 7). Portanto, os pacientes diagnosticados com PET/MAH cadeirantes, possuem também comprometimento maior da função tímica, detectada pela baixa quantificação de TREC e consequentemente população de células T *naïve* reduzida na periferia.

Os resultados apresentados mostraram que o desenvolvimento da PET/MAH interfere na função tímica, já que foi verificado menor quantidade de partículas TREC em pacientes PET, principalmente em pacientes cadeirantes, em relação aos NPET. Além disso, a expressão de IL-7 se mostrou reduzida em pacientes PET, quando avaliada em grupos etários diferentes (com idade ≤ 59 anos e idade ≥ 60 anos). Outro ponto importante foi verificar que o sexo também influencia, pois, os resultados mostram que os homens são mais comprometidos na função tímica do que as mulheres.

Os processos envolvidos no desenvolvimento da PET/MAH e sua evolução ainda não estão bem esclarecidos, porém os fatores que alteram a resposta imunológica são a provável peça-chave na construção desse conhecimento.

O presente estudo verificou que a função tímica dos pacientes infectados por HTLV-1 que desenvolvem PET/MAH está comprometida, fenômeno que pode estar

relacionado com a carga proviral, resposta imunológica descontrolada e uma possível infecção direta do timo pelo HTLV-1. Apesar de ainda não estar clara a importância deste comprometimento no desencadeamento e/ou evolução da PET/MAH, infere-se que a redução da produção de células T *naïve*, e consequentemente da renovação do repertório de TCRs, pode alterar a resposta imunológica nesses pacientes, repercutindo diretamente no quadro clínico dos mesmos.

8 CONCLUSÃO

A função tímica mostrou-se prejudicada em pacientes portadores de HTLV-1 com PET/MAH comparados àqueles sem PET/MAH, pois houve um prejuízo na produção de células T *naïve* nessa população, mostrada através da diferença entre o grupo PET e NPET com relação à quantificação de TREC.

Há uma maior diferença entre os pacientes que desenvolveram PET/MAH e os que não desenvolveram PET/MAH nos grupos dos menores de 59 anos e pertencentes ao sexo feminino.

Há diferença entre o grupo que faz uso de cadeira de rodas e o que não faz uso de cadeira de rodas como auxílio de marcha. Os que não fazem uso de cadeira de rodas apresentam uma função tímica menos prejudicada comparados àqueles que o fazem.

Não há correlação entre idade e quantificação de TREC e não há correlação entre idade e a expressão gênica de IL-7.

Não há correlação entre a quantificação de TREC com a expressão gênica de IL-7.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. **Imunologia celular e molecular**. 6a edição. Elsevier Brasil, 2008.
- ABBAS, A. K.; MURPHY, K. M.; SHER, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. **Nature**, v. 383, n. 6603, p. 787, 1996.
- ANDO, H. *et al.* Positive feedback loop via astrocytes causes chronic inflammation in virus-associated myelopathy. **Brain**, v. 136, n. 9, p. 2876–2887, 2013.
- ANDO, Y. *et al.* Long-term follow up study of vertical HTLV-I infection in children breast-fed by seropositive mothers. **Journal of Infection**, v. 46, n. 3, p. 177-179, 2003.
- ARAUJO, A. Q. C.; SILVA, M. T. T. The HTLV-1 neurological complex. **The Lancet Neurology**, v. 5, n. 12, p. 1068-1076, 2006.
- BANGHAM, C. R. M. *et al.* Genetic control and dynamics of the cellular immune response to the human T-cell leukaemia virus, HTLV-I. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 354, n. 1384, p. 691-700, 1999.
- BANGHAM, C. R. M. *et al.* HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Nature reviews**, v. 1, 2015.
- BANGHAM, C. R. M.; OSAME, M. Cellular immune response to HTLV-1. **Oncogene**, v. 24, n. 39, p. 6035-6046, 2005.
- BARBEAU, B.; PELOPONESE, J.; MESNARD, J. Functional comparison of antisense proteins of HTLV-1 and HTLV-2 in viral pathogenesis. **Frontiers in Microbiology Virology**, v. 4, n. 226, p. 1-8, 2013.
- BAYDOUN, H. H.; BELLON, M.; NICOT, C. HTLV-1 Yin and Yang: Rex and p30 master regulators of viral mRNA trafficking. **AIDS Rev.**, v. 10, n. 4, p. 195–204, 2008.
- BELROSE, G. *et al.* Effects of valproate on Tax and HBZ expression in HTLV-1 and HAM/TSP T lymphocytes. **Blood**, v. 118, n. 9, p. 2483-2491, 2011.
- BOXUS, Mathieu *et al.* The HTLV-1 tax interactome. **Retrovirology**, v. 5, n. 1, p. 76, 2008.
- CASSEB, J.; PENALVA-DE-OLIVEIRA, A.C. The pathogenesis of tropical spastic paraparesis/human T-cell leukemia type I-associated myelopathy. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 12, p. 1395 -1401, 2000.
- CATALAN-SOARES, B.; CARNEIRO-PROIETTI, A. B. F.; PROIETTI, F. A. Heterogeneous geographic distribution of human T-cell lymphotropic viruses I and II (HTLV-I/II): serological screening prevalence rates in blood donors from large urban areas in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 21, n. 3, p. 926-931, 2005.

CAVALLOTTI, C. *et al.* Age-related changes in the human thymus studied with scanning electron microscopy. **Microscopy research and technique**, v. 71, n. 8, p. 573-578, 2008.

CHAMPS, A. P. S. *et al.* Mielopatia associada ao HTLV-1: análise clínico-epidemiológica em uma série de casos de 10 anos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 6, p. 668-672, 2010.

CHLICHLIA, K.; KHAZAIE, K. HTLV-1 Tax: linking transformation, DNA damage and apoptotic T-cell death. **Chemico-biological interactions**, v. 188, n. 2, p. 359-365, 2010.

CHOUDHARY, G.; RATNER, L. The HTLV-1 hbx antisense gene indirectly promotes tax expression via down-regulation of p30 II mRNA. **Virology**, v. 410, n. 2, p. 307-315, 2011.

COOK, Lucy B. *et al.* HTLV-1: persistence and pathogenesis. **Virology**, v. 435, n. 1, p. 131-140, 2013.

COOK, Lucy B. *et al.* HTLV-1–infected T cells contain a single integrated provirus in natural infection. **Blood**, v. 120, n. 17, p. 3488-3490, 2012.

COOK, Lucy BM; TAYLOR, Graham P. HTLV-1 and HTLV-2 Prevalence in the United States. **Journal of infectious diseases**, n. editorial commentary, p. 486-487, 2013.

COOPER, S. A.; VAN DER LOEFF, M. S.; TAYLOR, G. P. The neurology of HTLV-1 infection. **Practical Neurology**, v. 9, n. 1, p. 16–26, 2009.

COUTINHO, R.; GRASSI, M. F. R.; KORNGOLD, A. B.; OLAVARRIA, V. N.; GALVÃO-CASTRO, B.; MASCARENHAS, R. E. Human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) proviral load induces activation of T-lymphocytes in asymptomatic carriers. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, p. 453, 2014.

CRIVELLATO, E.; VACCA, A.; RIBATTI, D. Setting the stage: an anatomist's view of the immune system. **Trends in Immunology**, v. 25, n. 4, p. 210-217, 2004.

CUMMINS, N. W.; BADLEY, A. D. Mechanisms of HIV-associated lymphocyte apoptosis: 2010. **Cell Death and Disease**, v. 1, n. 11, p. e99, 2010.

DIAS, G. A. S. *et al.* Neurological manifestations in individuals with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in the Amazon. **Spinal cord**, v. 54, n. 2, p. 154-157, 2015.

DONG, J. *et al.* Homeostatic Properties and Phenotypic Maturation of Murine CD4 Pre-Thymic Emigrants in the Thymus. **Plos one**, v. 8, n. 2, p. e56378, 2013.

DOUEK, D. C. *et al.* Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. **Nature**, v. 396, n. 6712, p. 690, 1998.

ENOSE-AKAHATA, Y. *et al.* Humoral immune response to HTLV-1 basic leucine zipper factor (HBZ) in HTLV-1-infected individuals. **Retrovirology**, v. 10, n. 19, p. 1-13, 2013.

EZINNE, C. C. *et al.* HTLV-1 Specific CD8+T Cell Function Augmented by Blockade of 2B4/CD48 Interaction in HTLV-1 Infection. **PloS one**, v. 9, n. 2, p. 1-10, 2014.

FINK, P. J.; HENDRICKS, D. W. Post-thymic maturation: young T cells assert their individuality. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 8, p. 544–549, 2011.

FRY, T. J.; MACKALL, C. L. Interleukin-7: from bench to clinic. **Blood**, v. 99, n. 11, p.3892-3904, 2002.

FURUKAWA, Y. *et al.* Phylogenetic subgroups of human T cell lymphotropic virus (HTLV) type I in the tax gene and their association with different risks for HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **The Journal of infectious diseases**, v. 182, n. 5, p. 1343–1349, 2000.

FUZII, H. T. *et al.* Immunopathogenesis of HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP), **Life Sciences**, v. 104, p. 9–14, 2014.

GALLO, R. C.; POIESZ, B. J.; RUSCETTI, F. W. Regulation of human T-cell proliferation: T-cell growth factor and isolation of a new class of type-C retroviruses from human T-cells. **Hamatol Bluttransfus**, v. 26, p. 502-14, 1981.

GARCIA-LOYGORRI, M. C. *et al.* La leche materna como vehículo de transmisión de virus. **Nutrición Hospitalaria**, v. 32, n. n01, p. 4-10, 2015.

GARCÍA-VALLEJO, F.; DOMÍNGUEZ, M.C.; TAMAYO, O. Autoimmunity and molecular mimicry in tropical spastic paraparesis/human T-lymphotropic virus-associated myelopathy. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 2, p. 241 -250, 2005.

GAUDRAY, G. *et al.* The complementary strand of the human T-cell leukaemia virus type 1 RNA genome encodes a bZIP transcription factor that down-regulates viral transcription. **The Journal of Virology**, v. 76, n. 24, p. 12813-12822, 2002.

GESSAIN, A. *et al.* Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. **Lancet**, v. 2, n. 8452, p. 407-410, 1985.

GESSAIN, A.; CASSAR, O. Epidemiological aspects and world distribution of HTLV-1 infection. **Frontiers in microbiology**, v. 3, n. 388, 2012.

GESSAIN, A.; MAHIEUX, R. Tropical spastic paraparesis and HTLV-1 associated myelopathy: Clinical, epidemiological, virological and therapeutic aspects. **Revue neurologique**, v. 168, n. 3, p. 257-269, 2012.

GONÇALVES, D. U. *et al.* Epidemiology, treatment, and prevention of human T-cell leukemia virus type 1-associated diseases. **Clinical microbiology reviews**, v. 23, n. 3, p. 577-589, 2010.

GOON, P. K. C. *et al.* High circulating frequencies of tumor necrosis factor alpha- and interleukin-2-secreting human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-specific CD4+ T cells in patients with HTLV-1-associated neurological disease. **The Journal of Virology**, v. 77, n. 17, 2003.

GOON, P. K. C. *et al.* High frequencies of Th1-type CD4(+) T cells specific to HTLV-1 Env and Tax proteins in patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Blood**, v. 99, n. 9, 2002.

GOON, P. K. C. *et al.* Human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I)-specific CD4+ T cells: immunodominance hierarchy and preferential infection with HTLV-I. **Journal of immunology**, v. 172, n. 3, p. 1735–1743, 2004.

HAINES, C.J. *et al.* Human CD4 + T cell recent thymic emigrants are identified by protein tyrosine kinase 7 and have reduced immune function. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 206, n. 2, p.275-285, 2009.

HANON, E. *et al.* Abundant Tax protein expression in CD4 + T cells infected with human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) is prevented by cytotoxic T lymphocytes. **Blood**, v. 95, n. 4, p.1386–1392, 2000.

HAUBEN, E.; RONCAROLO, M. G. Human CD4+ regulatory T cells and activation-induced tolerance. **Microbes and Infection**, v. 7, n. 7, p. 1023–1032, 2005.

HAYASHI, D. *et al.* Accumulation of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I)-infected cells in the cerebrospinal fluid during the exacerbation of HTLV-I-associated myelopathy. **Journal of NeuroVirology**, v. 14, n. 5, p. 459–463, 2008.

HAYNES, B. F. *et al.* The Role of the Thymus in Immune Reconstitution in Aging, Bone Marrow Transplantation, and HIV-1 Infection. **Annual Review of Immunology**, v. 18, n. 1, p. 529–560, 2000.

HAZENBERG, M. D. *et al.* Increased cell division but not thymic dysfunction rapidly affects the T-cell receptor excision circle content of the T cell population in HIV-1 infection. **Nature medicine**, v. 6, n. 9, p.1036, 2000.

HOUSTON, E. G.; NECHANITZKY, R.; FINK, P. J. Cutting edge: contact with secondary lymphoid organs drives postthymic T cell maturation. **Journal of immunology**, v. 181, n. 8, p. 5213–5217, 2008.

JONES, K. S. *et al.* Cell-free HTLV-1 infects dendritic cells leading to transmission and transformation of CD4+ T cells. **Nature medicine**, v. 14, n. 4, p. 429-436, 2008.

JOURNO, C.; DOUCERON, E.; MAHIEUX, R. HTLV gene regulation: because size matters, transcription is not enough. **Future Microbiology**, v. 4, n. 4, p. 425-440, 2009.

JUST, H. L. *et al.* T-cell receptor excision circles (TREC) in CD4 and CD8 T-cell subpopulations in atopic dermatitis and psoriasis show major differences in the emission of recent thymic emigrants. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 88, n. 6, p. 566 -572, 2008.

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

KANNAGI, M. *et al.* Immunological risks of adult T-cell leukaemia at primary HTLV-I infection. **Trends in Microbiology**, v. 12, n. 7, p. 346–352, 2004.

KANNAGI, M. *et al.* 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. Immunology**, v. 3, p. 761–767, 1991.

KANNIAN, P.; GREEN, P. L. Human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1): molecular biology and oncogenesis. **Viruses**, v. 2, n. 9, p. 2037-2077, 2010.

KAYSER, C.; ANDRADE, L. E. C. Disfunção tímica e suas possíveis implicações nas alterações imunológicas do Lúpus eritematoso sistêmico. **Rev. bras. reumatol**, v. 43, n. 1, p. 26-31, 2003.

LEPOSAVIC, G.; PERISIC, M.. Age-associated remodeling of thymopoiesis: role for gonadal hormones and catecholamines. **Neuroimmunomodulation**, v. 15, n. 4-6, p. 290-322, 2008.

LEPOSAVIC, G.; PERISIC, M.; PILIPOVIC, I. Role of gonadal hormones in programming developmental changes in thymopoietic efficiency and sexual diergism in thymopoiesis. **Immunologic research**, v. 52, n. 1-2, p. 7-19, 2012.

LEWIS, D. B.; HAINES, C.; ROSS, D. Protein tyrosine kinase 7: a novel surface marker for human recent thymic emigrants with potential clinical utility. **Journal of Perinatology**, v. 31, n. 4, p. S72–S81, 2011.

LIMA, F. A.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. O papel do timo no desenvolvimento do sistema imune. **Pediatria**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 33-42, 2007.

LIND, E. F. *et al.* Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 194, n. 2, p. 127–134, 2001.

MACKALL, C. L.; FRY, T. J.; GRESS, R. E. Harnessing the biology of IL-7 for therapeutic application. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 5, p. 330-342, 2011.

MACNAMARA, A. *et al.* HLA class I binding of HBZ determines outcome in HTLV-1 infection. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 9, p. e1001117, 2010.

MAHIEUX, R.; GESSAIN, A. The human HTLV-3 and HTLV-4 retroviruses: New members of the HTLV family. **Pathologie et biologie**, v. 57, n. 2, p. 161 -166, 2009.

MALONEY, E. M. *et al.* Incidence of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in Jamaica and Trinidad. **JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 17, n. 2, p. 167-170, 1998.

MARTIN, F. *et al.* A 15-year prospective longitudinal study of disease progression in patients with HTLV-1 associated myelopathy in the UK. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 81, n. 12, p. 1336, 2010.

MATSUOKA, M.; JEANG, K. Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. **Nature Reviews Cancer**, v.7, n. 4, p. 270, 2007.

MELAMED, A. *et al.* Genome-wide determinants of proviral targeting, clonal abundance and expression in natural HTLV-1 infection. **PLOS Pathogens**, v. 9, n. 3, p. e1003271, 2013.

MESQUITA-JÚNIOR, D. *et al.* Sistema Imunitário – Parte II Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 5, p. 552-80, 2010.

MOREIRA-RAMOS, K. *et al.* Can thymic epithelial cells be infected by human T-lymphotropic virus type 1?. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 6, p. 759-762, 2011.

MOXOTO, I. *et al.* Perfil sociodemográfico, epidemiológico e comportamental de mulheres infectadas pelo HTLV-1 em Salvador-Bahia, uma área endêmica para o HTLV. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 1, p. 37-41, 2007.

MURPHY, F. A. *et al.* **Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses**. Springer Science & Business Media, 2012.

NAGAI, M. *et al.* CD8+ T cells are an in vivo reservoir for human T-cell lymphotropic virus type I. **Blood**, v. 98, n. 6, p. 1858-1861, 2001.

ORLAND, J. R. *et al.* Prevalence and clinical features of HTLV neurologic disease in the HTLV Outcomes Study. **Neurology**, v. 61, n. 11, p. 1588-1594, 2003.

OSAME, M. *et al.* HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. **Lancet**, v. 1, p. 1031–1032, 1986.

PAIVA, A. *et al.* High risk of heterosexual transmission of human T-cell lymphotropic virus type 1 infection in Brazil. **Journal of Medical Virology**, 2016.

PAZIRANDEH, A. *et al.* Glucocorticoids delay age-associated thymic involution through directly affecting the thymocytes. **Endocrinology**, v. 145, n. 5, p. 2392 - 2401, 2004.

PICCIRILLO, C. A.; SHEVACH, E. M. Naturally-occurring CD4+CD25+ immunoregulatory T cells: central players in the arena of peripheral tolerance. **Seminars in Immunology**, v. 16, n. 2, p. 81–88, 2004.

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

RAMÍREZ, J. A.; NYBORG, J. K. Molecular Characterization of HTLV-1 Tax Interaction with the KIX Domain of CBP/p300. **Journal of Molecular Biology**, v. 372, n. 4, p. 958–969, 2007.

ROSADAS, C.; PUCCIONI-SOHLER, M. HTLV-1 ORF-I Encoded Proteins and the Regulation of Host Immune Response: Viral Induced Dysregulation of Intracellular Signaling. **Journal of immunology research**, v. 2015, p. 498054, 2015.

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

SAITO, M. Immunogenetics and the pathological mechanisms of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1- (HTLV-1-) Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP). **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2010, p. 1-8, 2010.

SAITO, S. *et al.* REVIEW ARTICLE: Th1/Th2/Th17 and Regulatory T-Cell Paradigm in Pregnancy. **American journal of reproductive immunology**, v. 63, n. 6, p. 601-610, 2010.

SASSON, S. C.; ZAUNDERS, J. J.; KELLEHER, A. D. The IL-7/IL-7 receptor axis: understanding its central role in T-cell homeostasis and the challenges facing its utilization as a novel therapy. **Current drug targets**, v. 7, n. 12, p. 1571 – 1582, 2006.

SAUCE, Delphine; APPAY, Victor. Altered thymic activity in early life: how does it affect the immune system in young adults?. **Current opinion in immunology**, v. 23, n. 4, p. 543-548, 2011.

SAVINO, W. *et al.* The thymus is a common target in malnutrition and infection. **British Journal of Nutrition**, v. 98, n. Suppl. 1, p. s11-s16, 2007.

SCHMID, J. P. *et al.* Inherited defects in lymphocyte cytotoxic activity. **Immunological reviews**, v. 235, n. 1, p. 10-23, 2010.

SHOEIBI, A. *et al.* Clinical features of HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in northeast Iran. **Acta Neurologica, Belgica**, v. 113, n. 4, p. 427-433, 2013.

SOMECH, R. T-cell receptor excision circles in primary immunodeficiencies and other T-cell immune disorders. **Current opinion in allergy and clinical immunology**, v. 11, n. 6, p. 517-524, 2011.

SPITS, H. Development of alphabeta T cells in the human thymus. *Nature reviews*. **Immunology**, v. 2, n. 10, p. 760-772, 2002.

SUDO, T. *et al.* Interleukin 7 production and function in stromal cell-dependent B cell development. **The Journal of experimental medicine**, v. 170, n. 1, p. 333 -338, 1989.

TANAKA, T.; GRUSBY, M. J.; KAISHO, T. PDLIM2-mediated termination of transcription factor NF- κ B activation by intranuclear sequestration and degradation of the p65 subunit. **Nature Immunology**, v. 8, n. 6, p. 584, 2007.

TWIGGER, K. *et al.* Frequency and function of KIR + CD8 + T cells in HTLV-1 infection. **Retrovirology**, v. 11, n. Suppl 1, p. p79, 2014.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ. Núcleo de Medicina Tropical: Quem Somos. Disponível em: <http://www.nmt.ufpa.br/site/quem-somos/>. Acesso em: 10/04/2017

VAN DER GEEST, K. S. M. *et al.* Aging disturbs the balance between effector and regulatory CD4+ T cells. **Experimental gerontology**, v. 60, p. 190-196, 2014.

VERDONCK, K. *et al.* Human T-lymphotropic virus 1: recent knowledge about an ancient infection. **Lancet Infectious Disease**, v. 7, p. 266–281, 2007.

VILLAUDY, J. *et al.* HTLV-1 propels thymic human T cell development in “human immune system” Rag2-/-gamma c-/-mice. **PLoS Pathog**, v. 7, n. 9, p. e1002231, 2011.

WEINBERGER, Birgit *et al.* Healthy aging and latent infection with CMV lead to distinct changes in CD8+ and CD4+ T-cell subsets in the elderly. **Human immunology**, v. 68, n. 2, p. 86-90, 2007.

YAGER, E. J. *et al.* Age-associated decline in T cell repertoire diversity leads to holes in the repertoire and impaired immunity to influenza virus. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n.3, p. 711–723, 2008.

YAO, J.; WIGDAHL, B. Human T Cell Lymphotropic Virus Type I genomic expression and impact on intracellular signaling pathways during neurodegenerative disease and leukemia. **Frontiers in Bioscience**, v. 5, p. 138-168, 2000.

YASUNAGA, J. *et al.* Impaired production of naive T lymphocytes in human T-cell leukemia virus type I infected individuals: its implications in the immunodeficient state. **Blood**, v. 97, n. 10, p. 3177-3183, 2001.

YASUNAGA, J.; MATSUOKA, M. Human T-Cell Leukemia Virus Type I Induces Adult T-Cell Leukemia: From Clinical Aspects to Molecular Mechanisms. **Cancer control : Journal of the Moffitt Cancer Center**, v. 14, n. 2, p. 133-140, 2007.

YE, J. *et al.* HTLV-1 Rex is required for viral spread and persistence in vivo but is dispensable for cellular immortalization in vitro. **Blood**, v. 102, n. 12, p. 3963-3969, 2003.

YOSHIDA, M.; MIYOSHI, I.; HINUMA, Y. Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 79, n. 6 p. 2031-2035, 1982.

ZENG, M.; HAASE, A. T.; SCHACKER, T. W. Lymphoid tissue structure and HIV-1 infection: life or death for T cells. **Trends in Immunology**, v. 33, n. 6, p.306-14, 2012.

ZHAO, T. *et al.* Human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor selectively suppresses the classical pathway of NF- κ B. **Blood**, v. 113, n. 12. p. 2755-2764, 2009.

ZHAO, T.; MATSUOKA, M. HBZ and its roles in HTLV-1 oncogenesis. **Frontiers in microbiology**, v.3, n. 247, p. 247, 2012.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

Correlação entre a avaliação clínica, padrão de resposta periférica e a função tímica de pacientes acometidos por paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV.

As pessoas que são infectadas pelo HTLV-1 podem desenvolver várias doenças, dentre elas, uma lesão na coluna que leva a dificuldade de caminhar, a paraparesia espástica. No entanto, a maioria dos indivíduos infectados não adoecem. Para adoecer, o vírus causa mudanças na defesa do corpo. Para entender e tratar melhor as doenças causadas pelo HTLV, este trabalho se propõe a estudar as defesas do corpo juntamente com as alterações dos pacientes infectados com HTLV. Para isso, coletaremos amostras de sangue e realizaremos avaliação clínica, sem qualquer outra intervenção.

Se você tiver qualquer dúvida sobre este estudo, você pode entrar em contato com George Alberto da Silva Dias, aluno do curso de Mestrado em Doenças Tropicais pela UFPA pelo telefone (91)8108-9582. Se você tiver dúvidas sobre seus direitos ou com relação aos aspectos éticos do trabalho, você pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (CEP) do Núcleo de Medicina Tropical - UFPA – Av. Generalíssimo Deodoro, 92, Umarizal, Belém – PA; Telefone 3241-0032.

É garantida a liberdade de retirar o consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo sem qualquer prejuízo à continuidade de tratamento na instituição. As informações serão analisadas em conjunto a outros pacientes, não divulgadas as suas identificações. Não há nenhuma despesa pessoal adicional ao participante do estudo e nenhuma compensação financeira relacionada à sua participação. Os dados obtidos por sua participação serão apenas utilizados para este estudo.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Correlação entre a Avaliação Clínica, Padrão de Resposta Periférica e a Função Tímica de Pacientes Acometidos por Paraparesia Espástica Tropical/Mielopatia Associada ao HTLV”.

Eu discuti com o George Alberto da Silva Dias sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim, quais são os propósitos, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Participante

Belém __/__/20__

Testemunha

Belém __/__/20__

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente para a participação neste estudo.

Pesquisador

Belém __/__/20__

APÊNDICE B – ESCALA DO GRAU DE AUXÍLIO NA MARCHA

0	Marcha sem auxílio
1	Marcha com auxílio de terceiros
2	Marcha com auxílio de bengala ou muleta unilateral
3	Marcha com auxílio de muletas bilateral
4	Marcha com auxílio de andador
5	Uso de cadeira de rodas

ANEXO A – PARECER DE ÉTICA DE PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLO DE MEDICINA TROPICAL
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

PARECER DE ÉTICA DE PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

1. **Protocolo:** N°038/2010-CEP/NMT
2. **Projeto de Pesquisa:** CORRELAÇÃO ENTRE A AVALIAÇÃO CLÍNICA, PADRÃO DE RESPOSTA PERIFÉRICA E A FUNÇÃO TÍMICA DE PACIENTES ACOMETIDOS POR PARAPARESIA ESPÁSTICA TROPICAL/MIELOPATIA ASSOCIADA AO HTLV.
3. **Pesquisador Responsável:** George Alberto da Silva Dias.
4. **Instituição / Unidade:** NMT/UFPA.
5. **Data de Entrada:** 11/06/2010.
6. **Data do Parecer:** 30/06/2010.

PARECER

O Comitê de Ética em Pesquisa do NMT/UFPA apreciou o protocolo em tela e, verificou que foram atendidas todas as exigências da Resolução 196/96-CNS/MS. Portanto, manifesta-se pela sua aprovação.

Parecer: **APROVADO.**

Belém, 09 de agosto de 2010.


Profº Teiichi Oikawa
Coordenador do CEP-NMT/UFPA.