



BAHIANA
ESCOLA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA

**ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E SAÚDE HUMANA**

BÁRBARA NASCIMENTO ROCHA RIBEIRO SOARES

**AVALIAÇÃO FENOTÍPICA E FUNCIONAL DE CÉLULAS T REGULATÓRIAS EM
INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HTLV-1**

TESE DE DOUTORADO

**SALVADOR
2019**

BÁRBARA NASCIMENTO ROCHA RIBEIRO SOARES

**AVALIAÇÃO FENOTÍPICA E FUNCIONAL DE CÉLULAS T REGULATÓRIAS EM
INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HTLV-1**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Medicina e Saúde Humana da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública como requisito parcial para obtenção do Título de Doutora em Medicina e Saúde Humana.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Fernanda Rios Grassi

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Gustavo Regis Santos

**Salvador
2019**

Ficha Catalográfica elaborada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas

S676 Soares, Bárbara Nascimento Rocha Ribeiro
Avaliação fenotípica e funcional de células T regulatórias em indivíduos infectados pelo HTLV-1. / Bárbara Nascimento Rocha Ribeiro Soares. – 2019. 82f.: il. Color; 30cm.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Fernanda Rios Grassi
Coorientador: Prof. Dr. Carlos Gustavo Regis Santos

Doutora em Medicina e Saúde Humana.

Inclui bibliografia

1. TGF-B. IL - 10. 2. Linfócitos T regulatório. 3. HTLV-1 HAM/TSP.

I. Título.

CDU: 616.98


BÁRBARA NASCIMENTO ROCHA RIBEIRO SOARES

**“AVALIAÇÃO DE CÉLULAS T REGULATÓRIAS EM INDIVÍDUOS
INFECTADOS PELO HTLV-1”**

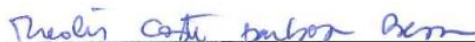
Tese apresentada à Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora em Medicina e Saúde Humana.

Salvador, 05 de junho de 2018.

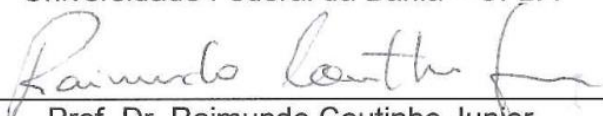
BANCA EXAMINADORA



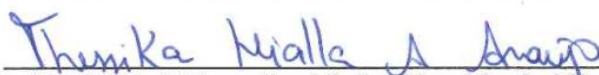
Prof. Dr. Lucas Pedreira de Carvalho
Doutor em Patologia Humana
Universidade Federal da Bahia – UFBA



Prof. Dr. Theolis Costa Barbosa Bessa
Doutor em Patologia Humana
Universidade Federal da Bahia – UFBA



Prof. Dr. Raimundo Coutinho Junior
Doutor em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa
Universidade Salvador - UNIFACS



Prof.ª Dr.ª Thessika Hialla Almeida Araújo
Doutora em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública – EBMSP



Prof.ª Dr.ª Rita Elizabeth Moreira Mascarenhas
Doutor em Biologia Celular e Molecular
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública – EBMSP

AGRADECIMENTOS

Uma tese pela sua finalidade acadêmica consiste em um trabalho individual, porém há contributos de natureza diversa que não podem e nem devem deixar de ser realçados. Por essa razão, desejo expressar os meus sinceros agradecimentos:

À Escola Bahiana de Medicina pela oportunidade de realizar o doutoramento.

Ao Centro de HTLV da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

Aos pacientes do Centro de HTLV da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública pela colaboração.

À orientadora Dra. Maria Fernanda Grassi pela competência científica e orientação dada, oportunizando a realização deste trabalho. Gratidão também pela humanização durante todo o processo, isso me fez admirar ainda mais.

Ao Dr. Carlos Gustavo pelo apoio fundamental na finalização deste manuscrito. Muito Obrigada!

À Dr. Bernardo Galvão pela colaboração.

À Luana Góis pelos ensinamentos e auxílios desde a bancada até a escrita, muito obrigada pelo companheirismo e apoio Lú!

À Gabriel Queiroz pelo tempo dedicado nos momentos que precisei de sua ajuda. Obrigada por caminhar junto comigo Gabi.

À Raphaela Lisboa por tornar os momentos de experimentos mais leves e descontraídos.

À Jaque e os demais ICs, mestrandos e doutorandos do LASP pelo convívio agradável.

À Ritinha, Jurema e D. Eugenia por toda ajuda e delicadeza.

A Noilson pelo grande companheiro sempre buscando ajudar no que fosse necessário.

Ao Dr. Fred Luciano pela edição das figuras e por todos os compartilhamentos.

Ao Dr. Lucas Carvalho pelas suas contribuições e disponibilidade em ajudar sempre.

Ao Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ e funcionários.

A todos os professores e funcionários da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública.

Aos meus colegas de doutoramento especial, fomos uma grande equipe!

Ao quinteto fantástico o qual faço parte juntamente com Ritinha, Léa, Tieta e Ubton. Caminhar ao lado de vocês fez dessa etapa muito mais leve. Obrigada por todos os compartilhamentos, por me adoçarem diariamente com palavras e ensinamentos valiosos. Vocês se tornaram mais que colegas e hoje posso carinhosamente chamá-los de amigos!

Ao meu marido que vibra comigo a cada segundo dessa jornada, sem dúvida, essa vitória também é sua Zé!

Aos irmãos “meus filhos” Beto e Malu por serem tão meus e nunca desistirem de mim.

A meu sobrinho e afilhado por todo meu amor e por fazer de mim melhor a cada dia.

Aos meus pais e sogros pelos incentivos!

Aos que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

O desenvolvimento desta tese somente foi possível com o apoio de todos vocês.

Ainda que seus passos pareçam inúteis; vá abrindo caminhos como a água que desce cantando a montanha. Outros te seguirão...

Antonie de Saint-Exupéry

RESUMO

O HTLV-1 induz ativação no sistema imune que pode levar a proliferação espontânea de células T. Na HAM/TSP, doença associada ao HTLV-1, existe uma maior frequência de células T ativadas secretando citocinas pró-inflamatórias. Os linfócitos T regulatórios (Treg) são importantes na manutenção da homeostase do sistema imunológico, pois atuam no controle da resposta inflamatória e da autoimunidade. Os linfócitos Treg secretam citocinas imunorregulatórias como IL-10 e TGF- β que inibem a ativação de linfócitos T, células dendríticas e macrófagos. Alterações imunes induzidas pelo HTLV-1 podem alterar a frequência e/ou a função dos linfócitos T regulatórios contribuindo para o desenvolvimento da HAM/TSP. Este estudo objetivou avaliar a função efetora dos linfócitos T regulatórios de indivíduos infectados pelo HTLV-1. Foram avaliados 32 indivíduos infectados pelo HTLV-1, sendo 15 com HAM/TSP e 17 indivíduos assintomáticos (ASS). Para compor o grupo controle, foram incluídos no estudo 15 voluntários saudáveis não infectados (NI). Células mononucleares do sangue periférico foram cultivadas e marcadas com anticorpos monoclonais (anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD25, anti-FOXP3, anti-IL-10 e anti-TGF- β) para quantificar a frequência de linfócitos Treg CD4⁺ e CD8⁺ produtores de IL-10 e/ou TGF- β por citometria de fluxo. A frequência dos linfócitos Treg CD4⁺ foi 3,4 vezes mais elevada no grupo com HAM/TSP quando comparados ao grupo ASS. A frequência dos linfócitos Treg CD4⁺ e CD8⁺ monoprodutores de IL-10 foi maior no grupo HAM/TSP quando comparado ao grupo ASS. Entretanto, a frequência de linfócitos Treg CD4⁺ produtores de TGF- β e não produtores IL-10 foi menor HAM/TSP em comparação ao grupo ASS. A frequência de linfócitos Treg CD8⁺ duplo-produtores de IL-10⁺TGF- β ⁺ foi maior no grupo com HAM/TSP quando comparados ao grupo NI. No grupo HAM/TSP também foi observada uma correlação positiva entre a frequência de linfócitos Treg CD4⁺IL-10⁺ e a PVL. Esta tese observou uma alteração na frequência de linfócitos Treg e na produção de IL-10 por estas células nos indivíduos infectados por HTLV com HAM/TSP. O aumento da frequência dos linfócitos T regulatórios e o desequilíbrio na produção das citocinas regulatórias IL-10 e TGF- β pode estar contribuindo para o desenvolvimento da HAM/TSP.

Palavras chave: HTLV-1. HAM/TSP. Linfócitos T regulatório. TGF- β . IL-10.

ABSTRACT

HTLV-1 induces a significant activation of the immune system, leading to the spontaneous proliferation of T-cells secreting proinflammatory cytokines in HAM/TSP individuals. Regulatory T-cells (Tregs) might be involved in the control of inflammation through the secretion of IL-10 and TGF- β . This study aimed to compare the cytokine profiles of CD4⁺ and CD8⁺ Treg subsets in asymptomatic HTLV-1-infected individuals and HAM/TSP patients. Asymptomatic HTLV-1-infected individuals and those with a diagnosis of HAM/TSP were matched by sex and age. A group of uninfected individuals were employed as controls. Peripheral blood mononuclear cells were cultivated and labeled with monoclonal antibodies (anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD25, anti-FOXP3, anti-IL-10 and anti-TGF- β). The frequency of Treg subsets producing or not IL-10 and/or TGF- β were quantified by flow cytometry. The frequency of CD4⁺ Tregs was statistically higher in HAM/TSP patients compared to asymptomatic HTLV-1-infected individuals. The frequencies of CD4⁺ and CD8⁺ Tregs subsets producing IL-10 alone were statistically higher in HAM/TSP compared to asymptomatic individuals. In addition, a positive correlation between CD4⁺IL-10⁺ Tregs and proviral load was observed in HAM/TSP. The dysregulated production of IL-10 and TGF- β in Tregs of HAM/TSP individuals may contribute to the exacerbated inflammatory response that characterizes this disease.

Key words: HTLV-1. HAM/TSP. regulatory T-cells. TGF- β . IL-10.

LISTA DE ABREVIATURAS

μL	= Microlitros
APC	= Aloficocianina
ASS	= Portador do HTLV-1 assintomático para HAM/TSP
ATLL	= Leucemia/linfoma de células T do adulto
BSA	= Albumina sérica bovina
CD	= <i>Cluster of differentiation</i>
CHTLV	= Centro de Referência de Portadores do HTLV
CMSP	= Células mononucleares de sangue periférico
CPV	= Carga provial
CTL	= Linfócitos T citotóxicos
CTLA-4	= Antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico
DNA	= Ácido desoxirribonucleico
EDTA	= Ácido etilenodiamino tetra-acético
env	= Envelope
FBDC	= Fundação Bahiana para o Desenvolvimento das Ciências
FITC	= Isotiocianato de fluoresceína
FOXP3	= Forkhead box P3
FSC	= <i>Forward scatter</i>
gag	= Grupo antigênico
GLUT-1	= Transportador de glicose-1
HAM/TSP	= Mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical
HIV	= Vírus da imunodeficiência humana
HSPGs	= Proteoglicanas de heparan sulfato
HTLV-1	= Vírus linfotrópico de células T humanas
IL	= Interleucina
LTR	= <i>Long terminal repeats</i>
MHC	= Complexo principal de histocompatibilidade
mL	= Mililitros
NI	= Não infectado
NK	= Células <i>natural killer</i>
NKT	= Células T <i>natural killer</i>
Nm	= Nanômetros

OMS	= Organização Mundial da Saúde
PBS	= Tampão salina fosfato
PCR	= Reação em cadeia da polimerase
PE	= Ficoeritrina
pol	= Polimerase
RNA	= Ácido ribonucleico
RNAm	= Ácido ribonucleico mensageiro
RPM	= Rotações por minuto
TCM	= Células T de memória central
TCR	= Receptor de células T
TNF	= Fator de necrose tumoral
TGF-β	= Fator de crescimento transformante beta
Treg	= Células T regulatórias
SNC	= Sistema nervoso central
Gp46	= Glicoproteína 46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição do HTLV-1 no mundo	15
Figura 2 - Frequências das células regulatórias CD4+ e CD8+ em indivíduos infectados e não infectados pelo HTLV-1	29
Figura 3 - Produção de IL-10 e TGF- β por linfócitos T regulatórios CD4+ e CD8+ em indivíduos infectados pelo HTLV-1 e indivíduos não infectados.	31
Figura 4 - Frequências das células T CD4+ e CD8+ FOXP3- CD25+ e FOXP3- CD25- em indivíduos infectados e não infectados pelo HTLV-1	32
Figura 5 - Produção de IL-10 e TGF- β por linfócitos T CD4+ e CD8+ FOXP3- CD25+ e FOXP3- CD25- em indivíduos infectados pelo HTLV-1 e indivíduos não infectados.....	34
Figura 6 - Correlação entre a frequência de linfócitos T regulatórios que produzem IL-10 e a carga proviral.....	35
Figura 7 - Figura esquemática que representa a hipótese desta tese sobre as disfunções dos linfócitos T regulatórios podem contribuir para a HAM/TSP.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características da população de estudo	28
--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
3	HIPÓTESE	22
4	OBJETIVOS	23
4.1	Objetivo Geral	23
4.2	Objetivos Específicos	23
5	MATERIAL E MÉTODOS	24
5.1	Desenho do estudo	24
5.2	Critérios de inclusão e exclusão	24
5.3	Obtenção de células mononucleares de sangue periférico	25
5.4	Avaliação do fenótipo regulatório	25
5.5	Extração de DNA e quantificação da carga proviral do HTLV-1	26
5.6	Análise estatística	26
5.7	Aspectos éticos	27
6	RESULTADOS	28
6.1	Caracterização da população de estudo	28
6.2	Frequência da expressão de FOXP3 e CD25 nos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺	28
6.3	Avaliação da produção intracelular de TGF-β e IL-10 em linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ com perfil regulatório	30
6.4	Frequência de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ FOXP3⁻ CD25⁺ e FOXP3⁻ CD25⁻	32
6.5	Avaliação da produção intracelular de TGF-β e IL-10 em linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ FOXP3⁻ CD25⁺ e FOXP3⁻ CD25⁻	33
6.6	Correlação entre a Carga proviral e Linfócitos T regulatórios produtores de IL-10	34
7	DISCUSSÃO	36
8	CONCLUSÃO	41
	APÊNDICE	52
	ANEXO	79

1 INTRODUÇÃO

O vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1 (HTLV-1 - “Human T lymphotropic virus type 1”) foi o primeiro retrovírus humano descrito. Em 1977, no Japão, o HTLV foi inicialmente associado com a leucemia de células T do adulto (ATLL), sendo depois encontrado em diversas partes do mundo ⁽¹⁾. O isolamento do HTLV foi realizado em 1980 a partir de linfoma cutâneo de células T ⁽¹⁾. A transmissão ocorre via horizontal, vertical e parenteral. A infecção pelo HTLV-1 acomete entre cerca de 5 a 10 milhões de pessoas no mundo ⁽²⁾. Estima-se que no Brasil, aproximadamente, 800 mil pessoas estejam infectadas pelo vírus ^(2,3), sendo que a cidade que apresenta a mais alta prevalência na população geral é Salvador com 1,76% ⁽⁴⁾.

A infecção pelo HTLV-1 é associada etiologicamente ao linfoma/leucemia de células T do adulto (ATLL), à mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP) e à uveíte ^(1,5,6), além de outras doenças infecciosas crônicas como a dermatite infecciosa e uveíte. Para as doenças associadas ao vírus citadas anteriormente, frequentemente é observado uma carga proviral elevada ⁽⁷⁻¹⁰⁾.

Na infecção pelo HTLV-1 as células alvos são linfócitos T CD4⁺ (*cluster of differentiation 4*). As células infectadas proliferam espontaneamente e tem potencial para produção e secreção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias. Diversas citocinas pró-inflamatórias como TNF-alfa IFN-gama e IL-6 têm sido relatadas tanto em indivíduos infectados com HAM/TSP quanto em indivíduos assintomáticos dentre elas, a citocina, IL-2 pode induzir a proliferação de linfócitos infectados ⁽¹¹⁾.

A subpopulação de células T regulatórias (Treg) é considerada importante na manutenção da homeostase do sistema imunológico ^(12,13). Essas células podem estar envolvidas na imunopatogênese de infecções virais crônicas, uma vez que suprimem a ativação dos linfócitos T citotóxicos CD8 que auxiliam na eliminação das células infectadas e controlam a replicação viral ^(14,15). Até o presente momento, todos os estudos publicados sobre linfócitos T regulatórios revelaram dados discordantes. Enquanto alguns trabalhos apontam uma menor frequência de células Treg (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ e CD4⁺CD25^{high}CTLA-4⁺) em indivíduos com HAM/TSP comparados a não infectados ^(16,17), outros mostram um maior percentual de Treg (CD4⁺FOXP3⁺Tax⁻ e CD4⁺FOXP3⁺) nos indivíduos infectados pelo retrovírus ⁽¹⁸⁻²⁰⁾. Além disso, a frequência de células Treg foi inversamente correlacionada à taxa de lise mediada pelos linfócitos T CD8⁺ citotóxicos CTLs ⁽¹⁹⁾, e com a carga proviral ⁽¹⁷⁾. Outros estudos demonstram um efeito supressor da proteína viral Tax na expressão de

FOXP3, crítico para o desenvolvimento e função das células Treg⁽¹⁶⁾. Deste modo, é importante definir se a infecção pelo HTLV-1 causa um comprometimento da imunorregulação exercido pelas células T regulatórias podendo contribuir para o predomínio do ambiente inflamatório observado em doenças associadas ao HTLV-1, como a HAM/TSP.

Há poucos trabalhos que avaliam o envolvimento das células Treg no desenvolvimento da HAM/TSP e de outras doenças associadas à infecção pelo HTLV-1. Além do mais, nenhum destes estudos caracterizou ou quantificou a produção das citocinas regulatórias interleucina-10 (IL-10) e o fator de crescimento e transformação-beta (TGF- β). Portanto, o conhecimento da resposta imune e caracterização da imunopatologia de indivíduos infectados pelo HTLV-1 poderão contribuir na elucidação do processo de evolução da doença a partir da compreensão e caracterização dos linfócitos T regulatórios em indivíduos portadores do retrovírus com HAM/TSP.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Estima-se que cerca de 5 a 10 milhões de pessoas estejam infectadas pelo HTLV-1 no mundo, sendo sudoeste do Japão, ilhas do Caribe, África e América do Sul consideradas regiões endêmicas (Figura 1) ⁽²¹⁾. Somente no Brasil, existem aproximadamente 2,5 milhões de pessoas infectadas pelo vírus ^(22,23). Um estudo de prevalência multicêntrico em cinco capitais brasileiras estimou que aproximadamente 0,45% dos doadores de sangue estão infectados. Entre as taxas de prevalência detectadas neste estudo, Salvador é a cidade de maior número de indivíduos infectados (1,35%) ⁽²⁴⁾. Posteriormente, ao estudar as taxas de infecção entre usuários de drogas intravenosas em Salvador, verificou-se que 22% dos homens e 46,2% mulheres estavam infectados ^(4,25). Uma pesquisa de base populacional reafirma a elevada prevalência do HTLV-1 em Salvador e caracterizando a cidade como a de mais alta prevalência com 1,76% da população geral infectada ⁽⁴⁾.

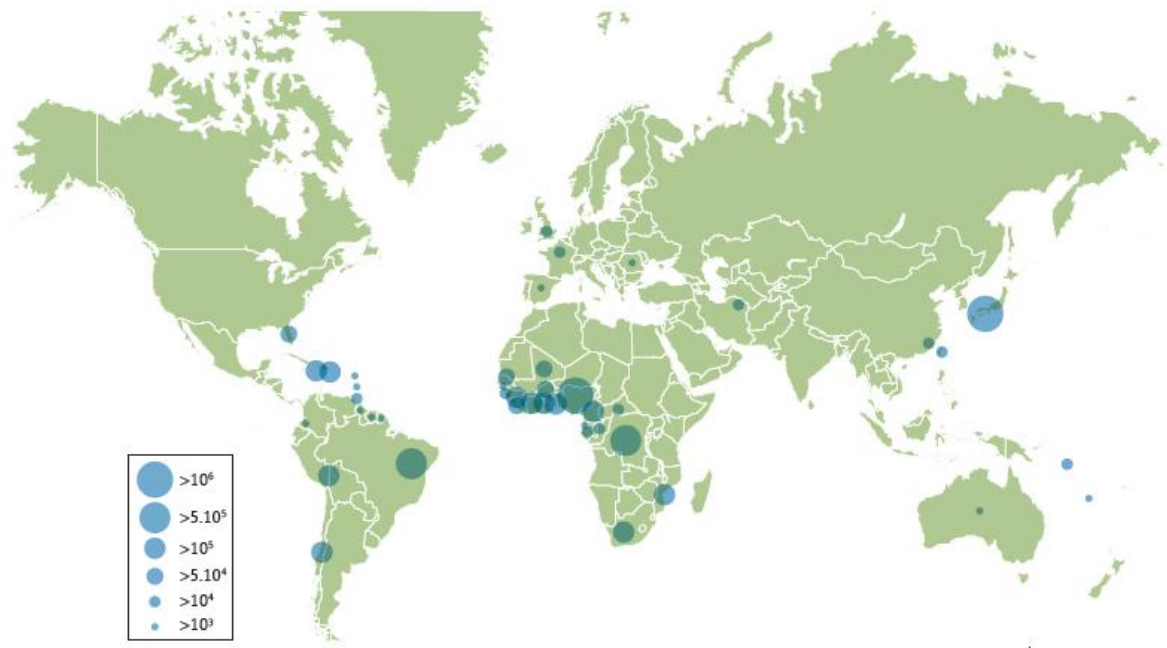


Figura 1 - Distribuição do HTLV-1 no mundo

Fonte: Gessin, Cassar ⁽²⁾.

A transmissão do HTLV-1 pode ocorrer por contato sexual ^(26,27); por via parenteral, através da transfusão sanguínea e de hemoderivados, ⁽²⁸⁾ e compartilhamento de agulhas contaminadas ⁽²⁵⁾; e por transmissão vertical, principalmente através da amamentação ⁽²⁹⁾.

O HTLV-I infecta preferencialmente linfócitos T CD4⁺CD45RO⁺ (memória) do sangue periférico, embora outros tipos celulares como células da glia, dendríticas e linfócitos T CD8⁺, possam também ser infectadas⁽³⁰⁻³⁴⁾.

A infecção das células alvo inicia-se pela interação entre a proteína viral de superfície, a glicoproteína gp46, e a superfície da membrana celular, em uma interação envolvendo o receptor de superfície celular Glut-1, proteoglicanos heparan-sufato, neutrofilina-1 e transportador ubiquitário de glicose⁽³⁵⁾. Após esta interação, a proteína transmembrana, gp21, promove a fusão do envelope viral com a membrana celular. Em seguida, ocorre à liberação do genoma viral no interior da célula e a fita simples de RNA viral é transcrita reversamente a um DNA de fita dupla pela transcriptase reversa viral. Após a síntese, a fita de DNA viral é transportada para o núcleo e inserida em locais inespecíficos no DNA celular pela proteína viral integrase⁽³⁶⁾. O provírus utiliza a maquinaria celular para codificar proteínas estruturais, enzimas e proteínas regulatórias. Após a montagem do provírus, pode ocorrer a liberação de algumas partículas virais por brotamento. Além disso, a transmissão ocorre através de sinapses virais onde o vírus pode ser transmitido célula-célula⁽³⁷⁾. Desta maneira, ocorre a polarização induzida pelo vírus de células infectadas com a formação de um canal proteico, permitindo a passagem de proteínas virais de uma célula para outra através do contato célula a célula⁽³⁸⁾. Entretanto, o principal mecanismo de propagação viral *in vivo* é através da expansão clonal de células infectadas. Esse processo é induzido e regulado pelas proteínas codificadas pelo provírus^(39,40). A proteína regulatória, Tax tem sido implicada no mecanismo de proliferação de linfócitos em pacientes infectados pelo HTLV-1. O gene para esta proteína representa o principal fator transativador do vírus e interage com fatores de transcrição celular induzindo a ligação desta proteína a sítios específicos na região LTR (*long terminal repeats*) do genoma proviral⁽⁴¹⁾. Tax pode estimular a mitose ativando as ciclinas D (CDK4 e CDK6), inibir proteínas regulatórias do ciclo celular (p15, p16, p53, pRb), suprimindo a apoptose e influenciando na proliferação celular pela expressão de fatores de crescimento, como IL-2 e seu receptor⁽⁴¹⁾.

As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de indivíduos infectados pelo HTLV-1 apresentam proliferação espontânea de linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e de células NK *in vitro* mesmo na ausência de estímulos ou suplementação com a citocina IL-2^(42,43). A proliferação celular representa um dos principais mecanismos de manutenção da infecção, uma vez que a propagação do vírus ocorre principalmente por divisão mitótica, com a expansão clonal das células infectadas^(40, 44).

A infecção pelo HTLV-1 pode cursar sem implicações inerentes ao desenvolvimento de patologias, porém o vírus tem sido associado principalmente à leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL) e à mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP) desde a sua descoberta^(6,45). Entretanto, outros estudos também demonstram associação com outras doenças como uveíte⁽⁵⁾, artropatia^(46,47), polimiosite⁽⁴⁸⁾, síndrome de Sjögren⁽⁴⁹⁾, ceratoconjuntivite seca⁽⁵⁰⁾ e dermatite infecciosa^(51,52). De maneira geral, as doenças associadas ao HTLV-1 costumam ocorrer após longos anos de latência viral. No entanto, casos de dermatite infecciosa podem ocorrer em pacientes durante a infância e adolescência⁽¹⁰⁾.

A ATLL pode acometer cerca (3–5%) e a HAM/TSP (0.3–2%) dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 após longos anos de latência clínica^(53,27). As taxas de incidência e prevalência destas doenças apresentam-se significativas em todas as áreas endêmicas para a infecção por serem a HAM/TSP e ATLL as principais patologias associadas ao vírus⁽³⁾.

A HAM/TSP é uma doença inflamatória crônica e progressiva do sistema nervoso central que leva à paraparesia dos membros inferiores e é caracterizada por lesão e desmielinização da medula espinhal^(6,54). Em cerca de 60% dos indivíduos, o primeiro sintoma é a fraqueza dos membros inferiores⁽⁵⁵⁾. A disfunção da bexiga é bastante comum durante o curso da doença, assim como noctúria, urgência e incontinência. Dor lombar e em músculos de membros inferiores, parestesia, espasticidade, prisão de ventre, e impotência sexual são os demais sintomas comumente relatados^(48,55,56). A HAM/TSP parece avançar mais rápido em mulheres do que em homens, sobretudo naquelas cujo início da patologia se dá antes da menopausa. Possivelmente os hormônios sexuais contribuam para o desenvolvimento da doença, porém a razão para esta diferença entre ambos os sexos permanece desconhecida⁽⁵⁷⁾. O curso da HAM/TSP ocorre de maneira variável, podendo ser de forma rápida ou muito lentamente, sem possibilidade de remissão^(55,58).

A patologia da HAM / TSP ocorre com fase inflamatória inicial, caracterizada por sinais e sintomas que são causados por lesões no sistema nervoso central (SNC) ocasionados pelos infiltrados inflamatórios de células mononucleares^(59,60-62). Estes infiltrados podem ser amplamente dispersos e encontrados com mais frequência na medula espinhal torácica superior^(63,64). A fase inflamatória é seguida por um estágio de cicatrizes, atrofia e neurodegeneração⁽⁹⁾. Embora a expectativa de vida seja substancialmente encurtada e não haja tratamento satisfatório para a HAM/TSP, esta patologia não está diretamente relacionada com risco de morte.

A presença do infiltrado linfocitário nas lesões sugere uma participação ativa do sistema imunológico na patogenia da HAM/TSP durante a infecção pelo HTLV-1⁽⁶⁵⁾. No entanto sabe-se que os linfócitos T CD4⁺ são as células preferencialmente infectadas pelo HTLV-1 e constituem o principal reservatório *in vivo* para o retrovírus⁽³¹⁾. O tropismo do vírus por linfócitos T CD4⁺ parece estar relacionada a grande quantidade de proteoglicanos heparan-sufato na superfície destas células, pois esta molécula torna-se necessária para a entrada eficiente do HTLV-1 na célula hospedeira⁽⁶⁶⁾.

As principais hipóteses para explicar a patogênese da HAM/TSP são a autoimunidade, citotoxicidade direta e dano colateral^(61,65,67). Para a primeira hipótese, os linfócitos T CD4⁺, deflagrariam uma resposta imune contra as células da glia após atravessarem a barreira hematoencefálica e reconhecerem antígenos semelhantes. Estas seriam capazes de reconhecer células neuronais não infectadas como infectadas destruindo-as. No mecanismo da citotoxicidade, acredita-se que o HTLV-1 infecta as células residentes no sistema nervoso central, as quais apresentariam antígenos virais em sua superfície celular aos CTLs circundantes específicos para o HTLV-1 que atravessariam a barreira hematoencefálica e reconheceriam as células infectadas, destruindo-as. Por fim para suscitar a teoria do dano colateral, células da glia seriam destruídas pela ação dos mediadores citotóxicos liberados pelos CTLs contra as células T CD4⁺ infectadas após atravessarem a barreira hematoencefálica^(61,68,69).

O caráter latente da infecção pelo HTLV-1 é corroborado pelos altos títulos de anticorpos e a elevada frequência de linfócitos T citotóxicos (CTLs) específicos para a proteína viral Tax^(9,70). Os CTLs desempenham papel importante na limitação da replicação do HTLV-1, reduzindo o número de PBMC que apresentam o DNA proviral integrado ao genoma celular. Ou seja, reduz a carga proviral, que está diretamente relacionada com o risco de desenvolvimento da HAM/TSP^(71,72). Estas CTL promovem a lise de células infectadas por mecanismo de citotoxicidade a partir da liberação de grânulos⁽⁷³⁾. Porém, o dano tecidual observado nos indivíduos portadores da mielopatia pode ser decorrente de uma resposta imune exacerbada dos CTLs⁽⁶⁹⁾. As citocinas inflamatórias interferon-gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), secretadas por células infectadas pelo HTLV estão em maior concentração nos indivíduos infectados HAM/TSP em comparação aos indivíduos infectados assintomáticos^(11,74,75). Embora a síntese de IFN- γ e TNF- α seja importante no controle da replicação viral, estas citocinas também estão envolvidas na patogênese da HAM/TSP^(61,67). Neste contexto da infecção, as citocinas regulatórias, IL-10 e TGF- β promovem uma *downregulation* na produção de IL-2 e IFN- γ ⁽⁷⁶⁾. Estas citocinas imunoreguladoras são

capazes de suprimir a inflamação e as respostas Th1⁽⁷⁷⁾. Porém, a relação de supressão entre a citocina moduladora IL-10 e as citocinas inflamatórias IFN- γ e TNF- α parece não influenciar na regulação da resposta inflamatória. Em testes realizados *in vitro* foi demonstrado que a IL-10 não é capaz de modular síntese de IFN- γ e TNF- α nos indivíduos HAM/TSP quando comparados a indivíduos assintomáticos^(76,78).

De maneira geral, as células T regulatórias desempenham um papel fundamental na autotolerância. Estas células medeiam a supressão de células T autorreativas presentes na periferia, bem como promover a regulação negativa a antígenos. Células Tregs são capazes de suprimir a ativação, proliferação e funções efetoras de células T CD4⁺, T CD8⁺, *natural killer* (NK), NKT, células B e células apresentadoras de antígenos (APCs) *in vitro* e *in vivo*, através da secreção de citocinas regulatórias^(79,80). A descoberta de que a atividade supressora de linfócitos T CD4⁺ é enriquecida com o marcador extracelular CD25 permitiu maior caracterização fenotípica e funcional deste subconjunto de células. Foi notado que a transferência de suspensões de linfócitos T CD4⁺ depletadas de células CD25⁺ induziu o desenvolvimento de doenças autoimunes em camundongos atímicos (84). Por outro lado, a transferência de linfócitos T CD4⁺CD25⁺ foi capaz de prevenir essas doenças nos camundongos. Esses resultados indicaram que as células CD4⁺CD25⁺ contribuíram para a manutenção da autotolerância⁽⁸¹⁾.

Em 2001, as células Tregs foram, pela primeira vez, caracterizadas em humanos como apresentando o fenótipo CD4⁺CD25^{high}, o que compreende 1 a 2% dos linfócitos T CD4⁺ circulantes⁽⁸²⁾. Uma característica adicional dos linfócitos T supressores CD4⁺CD25⁺ é a alta expressão do fator de transcrição FOXP3, que parece ter uma função chave no papel supressor das Tregs⁽⁸³⁾. O fator de transcrição FOXP3 é crítico para o desenvolvimento e função das células T regulatórias, e sua expressão ocorre tanto em Tregs tímicas quanto em Tregs periféricas⁽¹⁴⁾. Uma redução significativa desta proteína tem sido observada em pacientes com vários tipos de doenças autoimunes, sugerindo que defeitos na expressão de FOXP3 e/ou o funcionamento das Treg podem causar alterações importantes na tolerância imunológica^(80,84).

Além do receptor de IL-2 cadeia α (CD25) e de FOXP3, outras moléculas são utilizadas na caracterização do fenótipo regulador, tais como, CTLA-4, GITR, CD62L, CD127 e CD45RO. No entanto, nenhum desses marcadores é tido como específico para células T reguladoras^(82,85,86).

Existem diversas subclasses de linfócitos T regulatórios, podendo ser classificados em duas populações principais, células Treg de ocorrência natural (nTreg) e células Treg

induzidas (iTreg). As naturais são desenvolvidas no timo, expressam constitutivamente CTLA-4, GITR e CD25^{high}, e estão naturalmente presentes no organismo. As induzidas após estímulos antigênicos ou exposição a citocinas regulatórias, tais como IL-10 e TGF- β são geradas na periferia ^(87,88).

Outras células com função regulatória já foram identificadas, como células NKT ⁽⁸⁹⁾, linfócitos $\gamma\delta$ ⁽⁹⁰⁾, linfócitos T duplo-negativos (CD4⁻CD8⁻) e linfócitos B CD1⁺ ⁽⁹¹⁾. Além disso, subclasses de linfócitos Treg CD8⁺ já foram identificadas, sendo o fenótipo semelhante à de linfócitos Treg CD4⁺ ⁽¹⁵⁾. Células regulatórias induzidas na periferia podem exercer sua função supressora mediante a produção das citocinas IL-10 e TGF- β ⁽⁹²⁻⁹⁵⁾. A produção e ação dessas duas citocinas são inter-relacionados e provavelmente se envolvem um *feedback* positivo no qual a IL-10 aumenta a expressão do TGF- β e vice-versa. Em doenças autoimunes já foi demonstrado que uma redução de linfócitos T CD4⁺ produzindo IL-10 é observada no líquido sinóvia e em PBMCs de pacientes com artrite reumatóide, favorecendo o desenvolvimento da doença ⁽⁹⁶⁾. Por outro lado, para infecções virais crônicas como a do HIV, as frequências de linfócitos T CD4⁺ produtores de IL-10 são maiores em indivíduos com uma replicação ativa do vírus em comparação com indivíduos não infectados ou indivíduos infectados não progressores ⁽⁹⁷⁾. Na infecção por HTLV-1 com desenvolvimento de ATLL, foi descrito um aumento na concentração sérica de IL-10, favorecendo a progressão da doença uma vez que esta citocina imunorreguladora auxilia na supressão de respostas com perfil Th1 ^(80,98). IL-10 e TGF- β regulam ativamente a tolerância periférica ⁽⁹⁹⁾.

Múltiplos mecanismos podem ser desencadeados na supressão mediada pelos diversos subtipos de linfócitos Treg. Outra possibilidade é que variados mecanismos supressores operem simultaneamente e sinergicamente, de forma que a disfunção de um deles não seja suficiente para prejudicar gravemente a regulação do sistema. Apesar de não estarem completamente elucidados, têm-se como mecanismo regulatório a lise de células efetoras ⁽¹⁰⁰⁾.

Na infecção viral crônica como, por exemplo, pelo HIV, as Tregs podem ser benéficas para o vírus promovendo a limitação da resposta imune não específica e também específica ao antígeno viral ⁽⁹⁷⁾. Aparentemente, a progressão da doença depende do equilíbrio entre as Tregs e células T efetoras ⁽¹⁰¹⁾. De fato, o aumento do nível de Treg em indivíduos com HIV tem sido associado a uma redução da ativação da resposta imune e elevados níveis de carga viral ⁽¹⁰²⁾. Por outro lado, foi demonstrado que o acúmulo de Treg nos tecidos linfóides também foi associado com alta viremia, tanto em pacientes infectados quanto em macacos infectados pelo mesmo vírus ⁽¹⁰³⁾.

Na infecção pelo HTLV-1, a frequência de células Treg foi inversamente correlacionada à atividade citolítica dos CTLs^(17,19). Além disso, linfócitos T regulatórios já foram caracterizados como reservatórios virais em indivíduos com ATLL e HAM / TSP⁽²⁰⁾.

O papel dos linfócitos T regulatórios ainda não são completamente estabelecidos na infecção pelo HTLV-1, existindo controversas na literatura. No contexto da HAM/TSP, altas frequências de linfócitos Treg CD4⁺ são descritas nestes indivíduos em comparação com indivíduos saudáveis^(18,19). Nos demais estudos existentes, a frequência destas mesmas células é menor no grupo com HAM/TSP quando comparadas a indivíduos saudáveis^(16, 17).

Considerando-se a natureza inflamatória da HAM/TSP e com base nas lacunas existentes em relação a imunorregulação exercida pelos linfócitos T regulatórios CD4⁺ e CD8⁺, este estudo faz-se necessário, pois busca quantificar e elucidar a função das citocinas reguladoras IL-10 e TGF- β que ainda permanecem desconhecidas na HAM/TSP.

3 HIPÓTESE

A hipótese deste trabalho é que alterações imunes induzidas pelo HTLV-1 podem alterar a frequência e/ou a função dos linfócitos T regulatórios contribuindo para o desenvolvimento da HAM/TSP.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar a função dos linfócitos T regulatórios de indivíduos infectados pelo HTLV-1.

4.2 Objetivos Específicos

- Quantificar a frequência dos linfócitos T regulatórios CD4⁺ e CD8⁺ em indivíduos assintomáticos e com HAM/TSP;
- Quantificar a frequência de linfócitos T regulatórios produtores de TGF- β e IL-10 em indivíduos assintomáticos e com HAM/TSP.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo observacional, de corte transversal, analítico para avaliar fenótipo e função dos linfócitos T regulatórios de indivíduos infectados pelo HTLV-1 com HAM/TSP.

Tratou-se de uma amostra de conveniência proveniente do Centro de HTLV da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP). Os indivíduos infectados envolvidos no estudo foram previamente identificados e caracterizados como assintomático (n=17) e HAM/TSP D (n=15) de acordo com critérios estabelecidos por De Castro Costa ⁽¹⁰⁴⁾. Foi incluído um grupo controle constituído por 15 indivíduos não infectados e saudáveis. Este grupo foi composto por doadores selecionados no banco de sangue HEMOBA, membros do grupo de pesquisa e indivíduos do LACEN (Laboratório Central de Saúde Pública do estado da Bahia). Todos os indivíduos tiveram sorologia negativa para as infecções virais crônicas como HIV, HCV e HBV.

5.2 Critérios de inclusão e exclusão

Indivíduos infectados pelo HTLV-1, acompanhados no CHTLV, assintomáticos ou com HAM/TSP com diagnóstico estabelecido pelo neurologista, que aceitaram participar do estudo.

Foram excluídos deste estudo indivíduos com diagnóstico por infecções virais crônicas como HIV-1, e hepatites B e C. O grupo controle foi constituído de 15 indivíduos sadios não infectados pelo HTLV-1.

Após assinatura do termo de consentimento livre esclarecido (TCLE) foram colhidos 10 mL de sangue por punção venosa em tubos contendo heparina (10mL) e EDTA (5mL). As amostras de sangue heparinizado foram destinadas à realização dos ensaios funcionais e/ou criopreservadas para análises posteriores. As amostras de sangue em EDTA foram destinadas a determinação da carga proviral.

5.3 Obtenção de células mononucleares de sangue periférico

As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram obtidas por gradiente de densidade, utilizando-se o reagente Ficoll-Hypaque (densidade 1,077g/mL) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri - EUA). Inicialmente, realizou-se a separação e remoção do plasma. A fração celular do sangue foi diluída 1:3 (v/v) em tampão fosfato pH 7,5 (PBS, 1X). Foram adicionados 5 mL de Ficoll-Hypaque em tubos de polipropileno de 15 mL. O sangue diluído em PBS 1X foi adicionado delicadamente sobre o Ficoll. Realizou-se uma centrifugação a temperatura ambiente e com desaceleração nula, a 1800 rpm durante 28 minutos. Após esse processo, foi coletado, utilizando-se uma pipeta *pasteur*, o anel de PBMC formado entre o Ficoll e o PBS. O anel foi então transferido para outro tubo de polipropileno, e submetido a três lavagens com cerca de 10 mL de PBS (1X), e centrifugação a 1500 rpm por 10 minutos. O *pellet* de PBMC formado durante a centrifugação foi ressuspensionado em 2 mL de meio RPMI. Por fim, realizou-se a contagem e avaliação da viabilidade celular em câmara de Neubauer com o corante azul de Tripan.

5.4 Avaliação do fenótipo regulatório

Para avaliar a frequência de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ com fenótipo regulatório (FOXP3⁺ e CD25⁺) e a expressão intracelular de citocinas (IL-10 e TGF- β), PBMC foram cultivadas em meio RPMI 1640 (*Sigma-Aldrich*, Saint Louis, Missouri - EUA) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB) inativado, por 24 horas a 37°C e 5% de CO₂ na ausência de estímulo e na presença de fitohemaglutinina, como controle positivo. Monensina e brefeldina A (*Sigma-Aldrich*, Saint Louis, Missouri - EUA) (4 μ g/mL) foram adicionadas às culturas 5 horas antes do término da incubação. Após o cultivo, o sobrenadante das culturas foi coletado e armazenado a -20° para análises posteriores. As PBMC foram lavadas 1 vez com PBS por 10 minutos a 1500 rpm e bloqueadas com a incubação com SFB por 10 min. Em seguida, o PBMC foi incubado com os anticorpos monoclonais anti-CD3APC-CY7, anti-CD4-FITC, anti-CD8-APC e anti-CD25-PECy5 (*BD Biosciences*, San Diego, CA, USA) para marcação membranar. Em seguida, foi realizada a permeabilização e fixação das membranas usando o Fix/Perm buffer 1X (*Biolegend*, San Diego, CA, EUA) seguido de lavagens com o FOXP3 perm buffer 1X (*Biolegend*, San Diego, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A marcação intracelular foi realizada com a incubação do PBMC com anticorpos

monoclonais anti-FOXP3-PE, anti-IL-10APC e anti-TGF- β FITC (*ebioscience*, San Diego, CA, USA) por 30 minutos, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Finalmente, as células foram novamente lavadas e fixadas com PBS-paraformolaldeído 0,2%. As amostras foram acondicionadas a 4°C, ao abrigo da luz, até o momento da aquisição em citômetro de fluxo, Facs Fostessa (*BD Biosciences*). As análises foram realizadas no software FlowJo (*FlowJo LLC*, Ashland, OR, USA).

5.5 Extração de DNA e quantificação da carga proviral do HTLV-1

A extração de DNA de 1×10^6 de PBMC foi realizada utilizando-se o QIAAMP DNA MINI KIT (*QIAGEN*), conforme instruções do fabricante para determinação da carga proviral (PVL). A PVL foi mensurada por reação da polimerase em cadeia (PCR) quantitativa em tempo real, através do sistema TaqMan™ (*Applied Biosystems*), como descrito anteriormente por outros pesquisadores⁽¹⁰⁵⁾. Foram utilizados os *primers forward* SK110 e *reverse* SK111 para o amplificação de um fragmento de 186 pares de base do gene *pol* e a sonda TaqMan marcada com (5FAM e 3 TAMRA) para a sequência referência do HTLV-1 (HTLVATK), localizada no fragmento 4829-4858 pb.

Como controle interno da reação, foi quantificado em paralelo o DNA da albumina. A quantidade de provírus foi calculada através da razão entre o número de cópias do gene *pol* do HTLV-1 e o número de cópias de albumina, obedecendo à seguinte fórmula: $PVL = \text{número de cópias do HTLV-1 (gene } pol) \times 10^6 / \text{número de cópias da albumina} / 2$.

5.6 Análise estatística

As variáveis foram testadas para distribuição Gaussiana, pelo teste de *Shapiro-Wilk*, e expressas em percentual, média, mediana, desvio padrão e intervalo interquartil. Foi utilizado o teste não paramétrico *Mann Whitney* para comparar um parâmetro entre dois grupos. Para analisar possíveis diferenças entre mais de dois grupos de pacientes foi utilizado o teste *One way anova - Kruskal-Wallis*, seguido do pós-teste *Dunn's Multiple Comparison*. Foram consideradas estatisticamente significantes as diferenças com valores de $p < 0,05$. Utilizou-se o software *GraphPad Prism* versão 7.0 (*GraphPad Inc.*, San Diego, CA) para realizar a análise dos dados.

5.7 Aspectos éticos

O estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da FIOCRUZ e aprovado sob o número de registro 187/2011 - 16903513.3.0000.0040. Todos os pacientes convidados a participar do estudo foram esclarecidos sobre os procedimentos de coleta e riscos e benefícios do estudo. Todos aqueles que aceitaram participar assinaram o TCLE, em anexo, e foram assegurados quanto ao sigilo e a possibilidade de retirar-se do estudo a qualquer momento.

6 RESULTADOS

6.1 Caracterização da população de estudo

Foram incluídos no estudo 47 indivíduos, dos quais 15 eram voluntários não infectados pelo vírus, 17 eram pacientes infectados pelo HTLV-1 e assintomáticos para HAM-TSP (ASS) e 15 com diagnóstico de HAM/TSP.

Dos 47 indivíduos incluídos neste estudo, 28 eram do sexo feminino (59%) e 19 do sexo masculino (41%). A porcentagem de mulheres correspondeu a 60% para o grupo HAM/TSP, 70% para o grupo ASS e 60% para os indivíduos saudáveis não infectados. As idades variaram entre 33 e 80 anos e a média de idade entre os grupos de 51.3 ± 12.1 para o grupo HAM/TSP, 56.7 ± 14.1 para o grupo ASS e 40.7 ± 12.2 para o grupo controle. A média da idade no grupo ASS foi estatisticamente maior em comparação ao grupo não infectado ($p=0,04$). A quantificação da PVL foi realizada em 09 indivíduos ASS e 07 com HAM/TSP. A mediana da PVL no grupo HAM/TSP foi maior em comparação ao grupo ASS, apesar da diferença não ser significativa ($p=0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1 - Características da população de estudo

Variáveis	HAM/TSP (n=15)	Assintomáticos (n=17)	Não Infectados (n=15)	Valor de p
Sexo feminino (%)	60	70	60	
Idade (anos)	51.3 ± 12.1	56.7 ± 14.1	40.7 ± 12.2	0,04
PVL (cópias/ 10^6)	$82,3 \times 10^6$ (14,593-167,444)	$19,70 \times 10^6$ (50,7-74819)	NR	0,05

A idade é apresentada em média e desvio padrão e carga proviral (PVL) é apresentada em mediana (intervalo interquartil). NR: não realizada.

6.2 Frequência da expressão de FOXP3 e CD25 nos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺

A frequência dos linfócitos T regulatórios CD25⁺FOXP3⁺ foi 2,2 vezes mais elevada no grupo com HAM/TSP (3,3%, IQR: 1,6-12,9%) quando comparado com o grupo assintomático (1,5%, IQR: 0,61- 2,80%) ($p= 0,03$). Quando avaliada as subpopulações regulatórias em CD4⁺ e CD8⁺, foi observada uma frequência 3,4 vezes mais elevada nos

linfócitos T regulatórios com perfil $CD4^+$ no grupo com HAM/TSP (1,59%, IQR 0,97-3,25%) quando comparado com indivíduos infectados assintomáticos (0,46%, IQR 0,20-1,50%), ($p=0,02$) (Fig. 2B). A frequência dos linfócitos T regulatórios com perfil $CD8^+$ foi similar quando comparados os grupos de indivíduos não infectados (1,02%; IQR 0,18-4,05%), assintomáticos (0,55%, IQR 0,33-1,49%) e com HAM/TSP (1,28%, IQR 0,55-7,51%) (Fig. 2C).

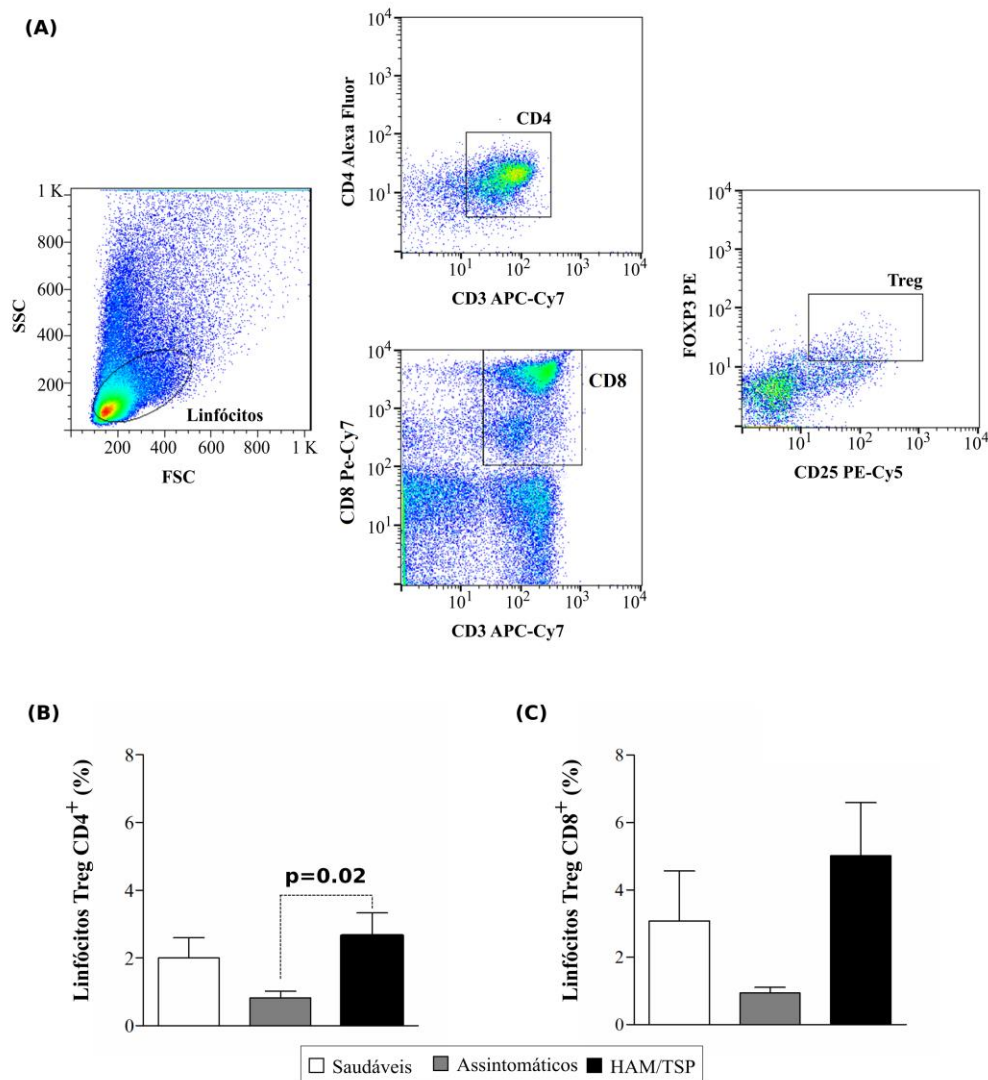


Figura 2 - Frequências das células regulatórias $CD4^+$ e $CD8^+$ em indivíduos infectados e não infectados pelo HTLV-1

PBMC foram marcados com anticorpos monoclonais anti-CD3-APC-Cy7, anti-CD4-AlexaFluor-700, anti-CD8-PECy7, anti-CD25-PECy5, anti-FOXP3-PE. Todas as amostras foram analisadas por citometria de fluxo. (A) Figuras que representam o total de linfócitos adquiridos e a seleção de linfócitos $CD4^+$ ou $CD8^+$. Em seguida, a seleção de linfócitos T regulatórios se deu pelas marcações FOXP3 e CD25. (B) Frequências de células regulatórias $CD4^+$ em indivíduos assintomáticos para HTLV-1 ($n=17$) HAM/TSP ($n=15$) e controles saudáveis ($n=15$). (C) Frequências de células regulatórias $CD8^+$ estão mostradas nos mesmos grupos. As barras indicam a mediana das frequências com intervalos interquartéis. As diferenças estatísticas foram calculadas pelo *Kruskal-Wallis* seguido do pós teste de *Dunn's* com múltiplas comparações. $p=0.02$.

6.3 Avaliação da produção intracelular de TGF- β e IL-10 em linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ com perfil regulatório

A frequência dos linfócitos regulatórios T CD4⁺ produtores de IL-10 e não produtoras TGF- β foi maior no grupo com HAM/TSP (9,26%, IQR 6,00-40,0%) quando comparado com o grupo ASS (0%, IQR: 0-5,35%) (p=0.003) (Fig. 3B). Entretanto, a frequência de linfócitos T CD4⁺ produtores de TGF- β e não produtores IL-10 foi 3.87 vezes mais baixa no grupo HAM/TSP (8,00%, IQR: 4,55-31,0%) quando comparado com indivíduos assintomático (31,0%, IQR: 18-47,35%) (p=0.04) (Fig. 3B). A frequência dos linfócitos T regulatórios produzindo IL-10 e TGF- β simultaneamente foi similar quando comparados os grupos de indivíduos do grupo não infectados (7,8%, IQR 0,77-20,5%), ASS (22,4%, IQR 8,35-31,65%) e HAM/TSP (18%, IQR 4,00-31,0%) (p= 0,09) (Fig. 3B).

Em seguida, foi verificada que a frequência de linfócitos T regulatórios com perfil CD8⁺ produtores de IL-10 e TGF- β . Verificou-se uma maior frequência de células produtoras de IL-10 e não produtoras de TGF- β no grupo HAM/TSP (8%, IQR: 2,90-30,6%) quando comparados ao grupo de indivíduos ASS (0%, IQR: 0-5,50%) (p=0.01) (Fig. 3C). A frequência das células T regulatórias CD8⁺ com marcação duplo-positiva (IL-10⁺TGF- β ⁺) foi 31.3 vezes maior no grupo com HAM/TSP (36,6%, IQR: 8,23-66,7%) quando comparados ao grupo de controle composto por indivíduos não infectados (19,7%, IQR: 9,79-30,25%) (p=0.001). A frequência dos linfócitos T regulatórios CD8⁺ produzindo TGF- β , não produtores de IL-10, foi similar nos três grupos (Indivíduos não infectados: 21,5%, IQR 0,37-64,9%; ASS: 53,7%, IQR 33,5-63,35%; e indivíduos com HAM/TSP: 20%, IQR 2,16-39,1%) (p= 0,15) (Fig. 3C).

Os gráficos setoriais mostram uma alta frequência de linfócitos T regulatórios produzindo ambas as citocinas regulatórias IL-10 e TGF- β nos grupos HAM/TSP e ASS em relação ao grupo de indivíduos não infectados (Fig 3B e 3C). Nos mesmos gráficos foi possível observar que a fração de células regulatórias que expressavam somente IL-10 foi superior no grupo com HAM/TSP quando comparado aos indivíduos ASS. Foi também observada que a frequência das células regulatórias T CD4⁺ que não expressavam nenhuma citocina foi superior no grupo de indivíduos não infectados (63,45%; IQR 36,8-72,39%) quando comparados aos grupos ASS (35,6%, IQR 16,15-50,55%) e HAM/TSP (33,1%, IQR 19,3-60,0%) (p=0,04). Em relação aos linfócitos T CD8⁺ regulatórias não produtores de citocinas, não foi observado diferenças significativas em relação aos grupos (indivíduos não infectados: 53,3%, IQR 12,5-92,9%; ASS: 27,3%, IQR 10,9-35,0%; e HAM/TSP: 13,9%,

IQR 0-31,5%) ($p=0,10$). O perfil de distribuição das células regulatórias T $CD4^+$ e T $CD8^+$ produtoras ou não de citocinas nos grupos HAM/TSP, assintomáticos e não infectados pode ser evidenciado nas Figuras 3B e 3C.

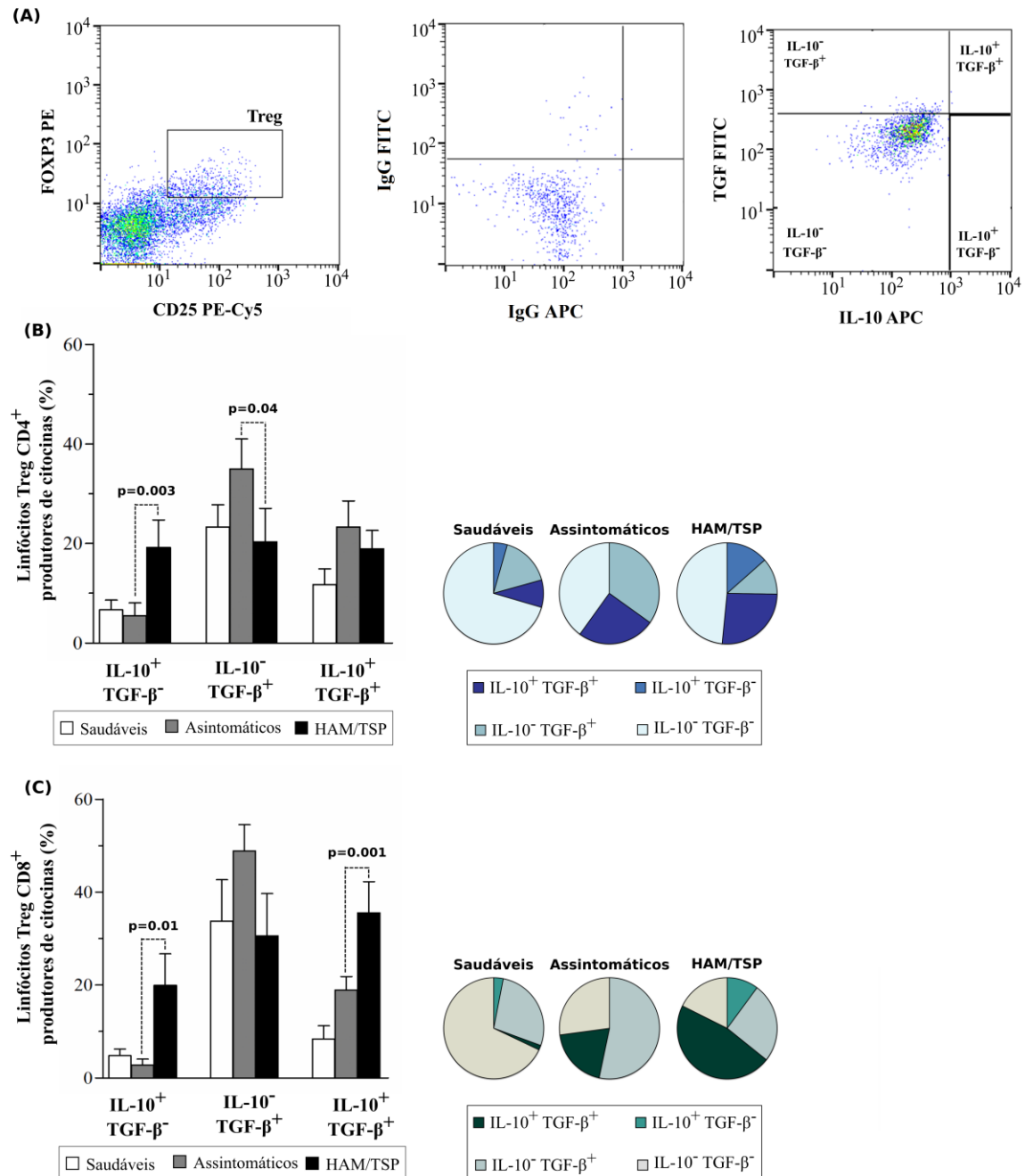


Figura 3 - Produção de IL-10 e TGF-β por linfócitos T regulatórios $CD4^+$ e $CD8^+$ em indivíduos infectados pelo HTLV-1 e indivíduos não infectados.

PBMCs foram marcadas com anti-CD3-APC-Cy7, anti-CD4-AlexaFluor-700, anti-CD8-PECy7, anti-CD25-PECy5, anti-FOXP3-PE, anti-TGF-β-FITC e anti-IL-10-APC por citometria de fluxo. (A) Representação do total de linfócitos apresentados em *plots* com marcação FOXP3+CD25+CD4⁺ ou FOXP3+CD25+CD8⁺, seguido marcação com controle isotípico IgG APC e IgG FITC e marcação para IL-10, TGF-β e CD25. (B) Frequências dos linfócitos T regulatórios $CD4^+$ produzindo IL-10 e TGF-β nos grupos ASS (n=17), HAM/TSP (n=15) e controles não infectados (n=15). (C) Frequências de linfócitos T regulatórios $CD8^+$ produtores de IL-10 and TGF-β nos mesmos grupos ASS, HAM/TSP e controles não infectados. As barras indicam a mediana das frequências e intervalos interquartis. O padrão de distribuição das células regulatórias produtoras de citocinas

está apresentado nos gráficos circulares setoriais IL10⁺TGF-β⁺, IL10⁺TGF-β⁻; IL10⁻TGF-β⁺ e não produtoras IL10⁻TGF-β⁻ em indivíduos não infectados (n=15), ASS (n=17) e HAM/TSP (n=15). Análise estatística realizada através do teste de *Kruskal-Wallis* seguido do pós-teste de *Dunn*. *p<0,05. **p<0,005.

6.4 Frequência de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ FOXP3⁻ CD25⁺ e FOXP3⁻ CD25⁻

A frequência dos linfócitos T CD4⁺ FOXP3⁻ CD25⁺ foi mais elevada no grupo com indivíduos saudáveis (4,8%, IQR 2,4-16,4%) quando comparado com o grupo assintomático (0,9% IQR 0,6-1,95%;) (p= 0,01) (Fig. 4A). Diferenças estatísticas não foram observadas quando estudada a população de linfócitos T CD4⁺ FOXP3⁻ CD25⁻ (indivíduos não infectados: 72,3%, IQR 46,1-82,9%; ASS: 83,9%, IQR 24,6-89,2%; e HAM/TSP: 78,9%, IQR 47,5-89,8%) (p=0,48) (Fig. 4B). Ao analisar a frequência dos linfócitos T CD8⁺ FOXP3⁻ não foram observadas diferenças estatísticas na população de linfócitos T CD8⁺ FOXP3⁻ CD25⁺ (indivíduos não infectados: 3,2%, IQR 1,5-13,5%; ASS: 1,0%, IQR 0,42-3,9%; e HAM/TSP: 1,2%, IQR 0,55-4,8%) (p=0,07) (Fig. 4C) e T CD8⁺ FOXP3⁻ CD25⁻ (indivíduos não infectados: 70,2%, IQR 39,8-83,1%; ASS: 86,7%, IQR 76,5-92,7%; e HAM/TSP: 82,3%, IQR 70,8-92,9%) (p=0,18) (Fig. 4C).

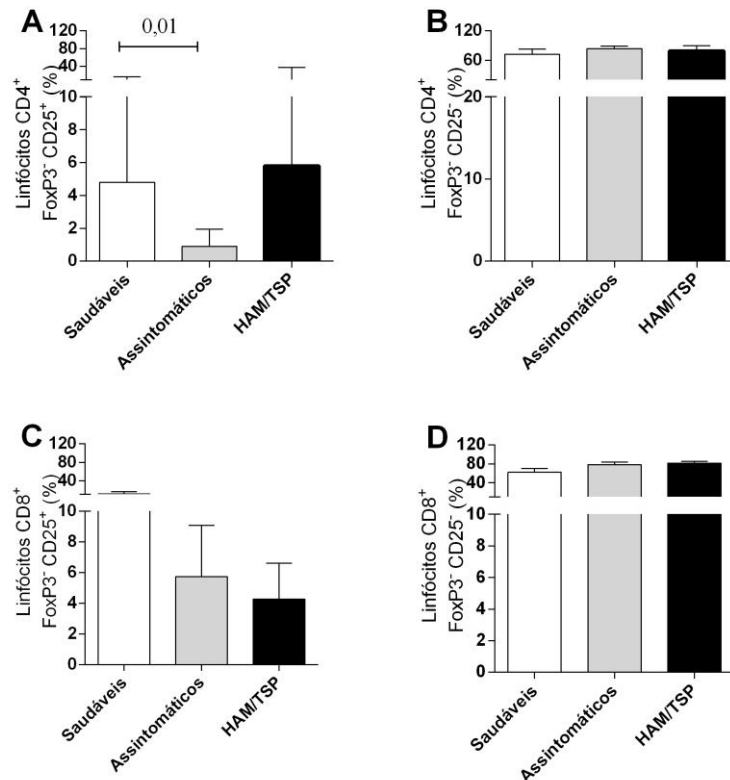


Figura 4 - Frequências das células T CD4⁺ e CD8⁺ FOXP3⁻ CD25⁺ e FOXP3⁻ CD25⁻ em indivíduos infectados e não infectados pelo HTLV-1

PBMC foram marcados com anticorpos monoclonais anti-CD3-APC-Cy7, anti-CD4-AlexaFluor-700, anti-CD8-PECy7, anti-CD25-PECy5, anti-FOXP3-PE. Todas as amostras foram analisadas por citometria de fluxo e para análise foram desconsideradas as marcações para FOXP3 e CD25 ou apenas para CD25. Frequências de células CD4⁺ em indivíduos assintomáticos para HTLV-1 (n=17) HAM/TSP (n=15) e controles saudáveis (n=15). Frequências de células regulatórias CD8⁺ estão mostradas nos mesmos grupos. As barras indicam a mediana das frequências com intervalos interquartis. As diferenças estatísticas foram calculadas pelo *Kruskal-Wallis* seguido do pós teste de *Dunn's* com múltiplas comparações.

6.5 Avaliação da produção intracelular de TGF- β e IL-10 em linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ FOXP3⁻ CD25⁺ e FOXP3⁻ CD25⁻

A frequência das citocinas regulatórias em linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ FOXP3⁻ CD25⁺ e FOXP3⁻ CD25⁻ foi observada em todos os grupos, não sendo significativa. Foi possível verificar que a frequência da produção de IL-10 tanto nos linfócitos CD4⁺ FOXP3⁻ CD25⁺ e FOXP3⁻ CD25⁻ quanto T CD8⁺ FOXP3⁻ CD25⁺ e FOXP3⁻ CD25⁻ foi menor no grupo com HAM/TSP quando comparados aos demais grupos estudados CD4 FOXP3⁻ CD25⁺ (HAM/TSP: 0,2%, IQR 0-3,2%; ASS: 1,6%, IQR 0-17,9%; e indivíduos saudáveis: 5,4%, IQR 1-15,4%) (p=0,17); CD4 FOXP3⁻ CD25⁻ (HAM/TSP:1%, IQR 0-2,9%; ASS: 4,8%, IQR 0,1-36,9%; e indivíduos saudáveis: 2,7%, IQR 0-37,2%) (p=0,19); CD8⁺ FOXP3⁻ CD25⁺ (HAM/TSP: 0%, IQR 0-3,8%; ASS: 0%, IQR 0-2,2%; e indivíduos saudáveis: 0%, IQR 0-4,1%) (p=0,9) e CD8 FOXP3⁻ CD25⁻ (HAM/TSP:0%, IQR 0,1-0,45% ; ASS: 2,4%, IQR 0,1-6,1%; e indivíduos saudáveis: 0,3%, IQR 0-4%) (p=0,18).

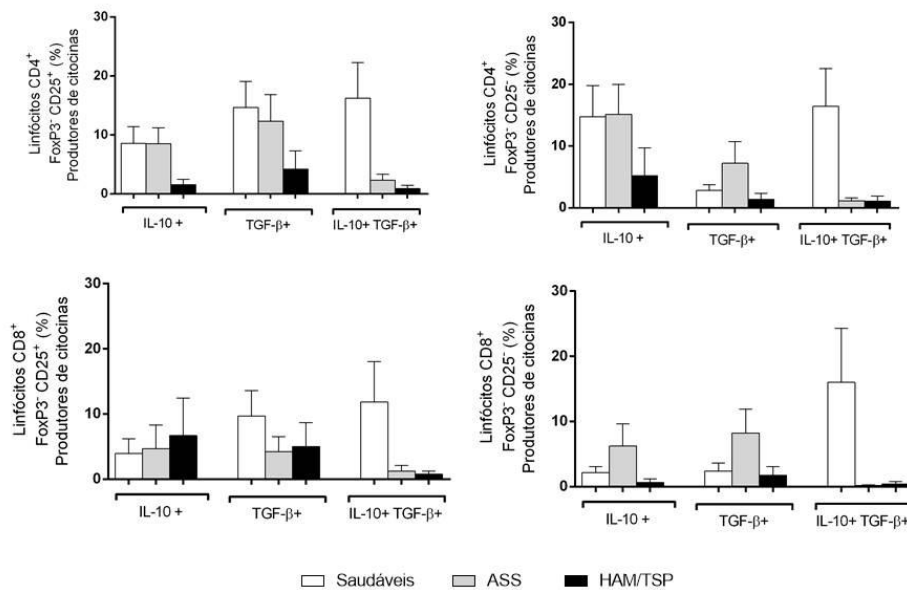


Figura 5 - Produção de IL-10 e TGF- β por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ FOXP3- CD25⁺ e FOXP3- CD25⁻ em indivíduos infectados pelo HTLV-1 e indivíduos não infectados. PBMCs foram marcadas com anti-CD3-APC-Cy7, anti-CD4-AlexaFluor-700, anti-CD8-PECy7, anti-CD25-PECy5, anti-TGF- β -FITC e anti-IL-10-APC por citometria de fluxo. (Frequências dos linfócitos T regulatórios CD4⁺ produzindo IL-10 e TGF- β nos grupos ASS (n=17), HAM/TSP (n=15) e controles não infectados (n=15). (C) Frequências de linfócitos T regulatórios CD8⁺ produtores de IL-10 and TGF- β nos mesmos grupos ASS, HAM/TSP e controles não infectados. As barras indicam a mediana das frequências e intervalos interquartis. Análise estatística realizada através do teste de *Kruskal-Wallis* seguido do pós-teste de *Dunn*.

6.6 Correlação entre a Carga proviral e Linfócitos T regulatórios produtores de IL-10

Uma forte correlação positiva entre a frequência de linfócitos regulatórios T CD4⁺ e T CD8⁺ produtores de IL-10⁺ e a PVL foi observada entre os indivíduos infectados pelo HTLV (r=0.69; p=0.004 e r=0.65; p=0.007, respectivamente). No grupo de indivíduos com HAM/TSP foi observada uma correlação positiva entre a frequência de linfócitos regulatórios T CD4⁺IL-10⁺ e a PVL (r=0,8; p=0,03), enquanto no grupo ASS foi observada uma correlação entre linfócitos regulatórios T CD8⁺IL-10⁺ e a PVL (r=0,7; p=0,02) (Figura 4A a 4D).

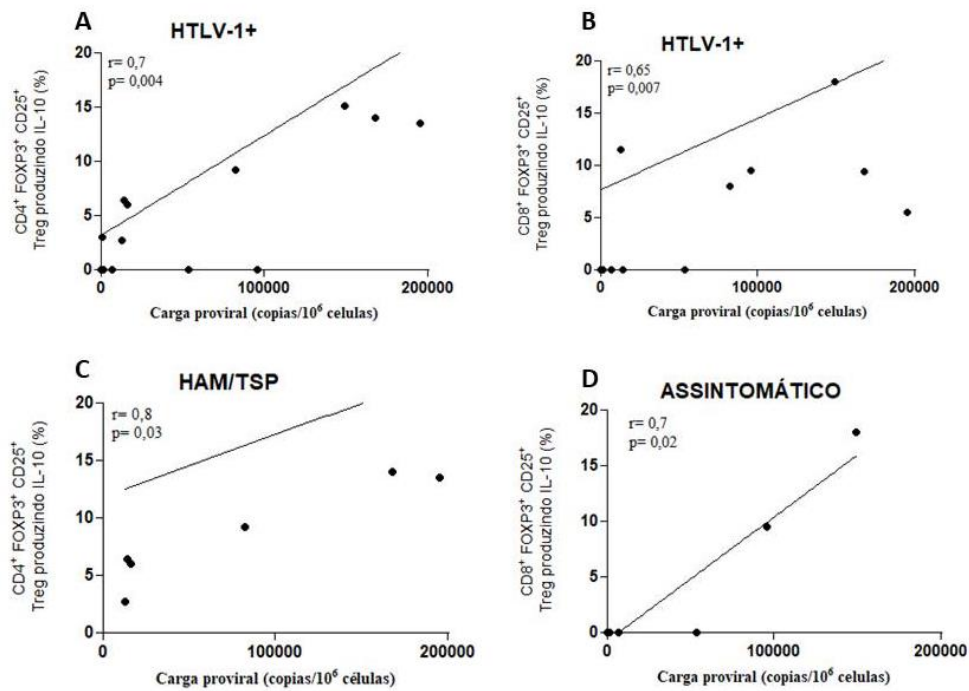


Figura 6 - Correlação entre a frequência de linfócitos T regulatórios que produzem IL-10 e a carga proviral.

Correlação entre a carga proviral e a frequência de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ regulatórios nos grupos de indivíduos infectados pelo HTLV-1, HAM/TSP e ASS. (A) Correlação entre a carga proviral e a frequência de linfócitos Treg CD4⁺ produtores de IL-10 no grupo HTLV-1 (n=16). (B) Correlação entre a carga proviral e a frequência de linfócitos Treg CD8⁺ produtores de IL-10 no grupo HTLV-1 (n=16). (C) Correlação entre a carga proviral e a frequência de linfócitos Treg CD4⁺ produtores de IL-10 no grupo HAM/TSP (n=07) (D); Correlação entre a carga proviral e a frequência de linfócitos Treg CD8⁺ produtores de IL-10 no grupo ASS (n=09). Análise estatística realizada através do teste de correlação de *Spearman*.

7 DISCUSSÃO

Os resultados apresentados aqui demonstram uma alta frequência de linfócitos T regulatórios, sobretudo na subpopulação com perfil $CD4^+$, em indivíduos com diagnóstico de HAM/TSP quando comparados aos indivíduos assintomáticos. Diferenças significativas em relação à frequência de linfócitos T regulatórios não foram observadas quando os grupos HAM/TSP ou assintomáticos foram comparados com o grupo de indivíduos não infectados. A alta frequência de linfócitos T regulatórios $CD4^+$ já foi previamente descrita em diversas outras populações de indivíduos infectados por HTLV-1, a exemplo do Peru ⁽¹⁸⁾, Japão ⁽²⁰⁾ e Inglaterra ⁽¹⁹⁾, corroborando os resultados aqui obtidos. O aumento na frequência linfócitos T regulatórios $CD4^+$ encontrado no grupo HAM/TSP corrobora estudos anteriores conduzidos por Best e colaboradores e Toulza e colaboradores^(18,19). Paradoxalmente, em um estudo anterior, foi descrita uma menor frequência de células $CD4^+FOXP3^+$ em pacientes com HAM/TSP comparados a indivíduos saudáveis^(16,17). Os resultados distintos encontrados por diversos autores podem ser devido a diferenças nos marcadores fenotípicos utilizados por cada estudo e diferentes estratégias metodológicas para avaliar a produção de citocinas. Nosso estudo caracterizou os linfócitos T regulatórios através dos marcadores FOXP3 e CD25 e a quantificou a frequência das subpopulações de Treg produtoras de citocinas reguladoras (IL-10 e TGF- β) por citometria de fluxo.

Dados prévios do nosso grupo de pesquisa demonstraram uma maior frequência de linfócitos T regulatórios $CD8^+$ no grupo de indivíduos infectados por HTLV-1 com ceratoconjuntivite seca em comparação aos indivíduos ASS e não infectados⁽¹⁰⁶⁾. Este mesmo estudo investigou pela primeira vez linfócitos T $CD8^+$ com perfil regulatório de indivíduos infectados pelo HTLV-1, exemplificando a diversidade de subpopulações de células regulatórias que podem estar envolvidas no desenvolvimento da resposta supressora na infecção pelo HTLV-1⁽¹⁰⁶⁾.

É bem estabelecido que células T regulatórias suprimem ou regulam a resposta imune através da interação célula a célula ou produção de IL-10 e TGF- β ⁽⁹⁸⁾. Para verificar qualidade funcional dos linfócitos T regulatórios nas subpopulações $CD4$ e $CD8$ foi avaliada a frequência destas células que eram capazes de produzir concomitantemente as duas citocinas regulatórias. Foi observado um predomínio de linfócitos T regulatórios ($CD4^+$ e $CD8^+$) produzindo unicamente IL-10 nos indivíduos com HAM/TSP. Por outro lado, linfócitos T regulatórios $CD4^+$ produzindo unicamente TGF- β estava reduzido neste mesmo grupo quando comparado com o grupo ASS. O aumento de linfócitos T regulatórios duplo-produtores foi

apenas observado na subpopulação CD8⁺ dos indivíduos com HAM/TSP. Estes dados mostram que os linfócitos T regulatórios de pacientes infectados pelo HTLV-1 com HAM/TSP apresentam uma modulação para maior produção de IL-10 comparados aos ASS. Por outro lado, os níveis de TGF- β nos indivíduos com HAM/TSP em relação aos ASS estavam reduzidos em 30 vezes, na subpopulação CD4⁺, e de 21 vezes, na subpopulação de CD8⁺, evidenciado pela menor razão entre TGF/IL-10.

As citocinas regulatórias IL-10 e TGF- β são capazes de mediar os mecanismos de supressão exercidos pelas Tregs. Estas citocinas suprimem respostas imunopatológicas no contexto dos transplantes, doenças autoimunes e alergias⁽⁹⁸⁾. TGF- β e IL-10, além da capacidade supressora, também estão relacionadas com a indução de células iTreg *in vivo* e *in vitro*⁽¹⁰⁷⁾. No contexto da infecção pelo HTLV-1 foi demonstrado que polimorfismos na região promotora da IL-10 parecem afetar a transcrição e a susceptibilidade induzidas por Tax para HAM / TSP, ratificando a importância desta citocina no desfecho da doença em pacientes infectados⁽⁹⁴⁾.

HAM/TSP é uma doença inflamatória crônica que causa um progressivo dano na medula espinhal levando a desmielinização. Os mecanismos que regulam este processo ainda permanecem desconhecidos. Os achados anatomopatológicos sugerem três principais hipóteses para explicar a patogênese da HAM/TSP: citotoxicidade direta, autoimunidade e dano colateral^(61,66,67). Porém, alguns autores sugerem que a ativação do sistema imune e a alta carga proviral podem ter um papel importante^(7, 108). A proliferação espontânea de células infectadas e não infectadas, o aumento de citocinas pró-inflamatórias (TNF, INF, IL-6) e quimiocinas (CXCL-9 e CXCL-10) no sangue periférico e fluido cérebro-espinhal é bem descrito em indivíduos com HAM/TSP em comparação aos indivíduos ASS^(109, 110).

Linfócitos T regulatórios sabidamente tem um papel fundamental na tolerância imunológica e no controle da resposta inflamatória⁽¹⁵⁾. A expansão de células regulatórias em outras infecções virais crônicas e persistentes como HIV e hepatite C tem sido associadas a supressão dos linfócitos T citotóxicos (CTL). Os CTL possuem memória específica e são capazes de migrar para os tecidos contribuindo para a eliminação do patógeno^(13,111). Adicionalmente, foi demonstrada uma correlação inversa da frequência de células Treg com a atividade citolítica dos CTLs⁽¹⁹⁾. Deste modo a partir da supressão dos CTL, os linfócitos T regulatórios poderiam impedir o *clearance* do microorganismo e contribuir para a cronicidade da infecção viral como demonstrado na infecção pelo HIV⁽¹¹²⁾.

Na infecção pelo HTLV-1, a proteína Tax é um antígeno alvo predominante para respostas CTL⁽¹¹³⁾. Porém, ensaios *in vitro* revelaram um efeito supressor da proteína viral

Tax na atividade citolítica dos CTLs⁽¹⁹⁾. Foi demonstrada por expressão gênica e citometria de fluxo a presença desta proteína em linfócitos T regulatórios, porém a frequência de células contendo este antígeno viral foi maior na subpopulação CD4⁺ quando comparada com a subpopulação CD8⁺. Ao analisar unicamente a subpopulação Treg CD4⁺ expressando FOXP3, notou-se que a frequência destas células positiva para Tax foi maior na população FOXP3⁺ que na população FOXP3⁻. Além disso, correlações entre a proteína Tax e linfócitos T regulatórios CD4⁺ foram descritas⁽²⁰⁾. Os autores sugerem que os linfócitos T regulatórios CD4⁺ podem funcionar como reservatório do vírus na infecção pelo HTLV-1⁽²⁰⁾. Os dados em conjunto podem indicar que na infecção pelo HTLV-1 o predomínio de linfócitos T regulatórios produzindo IL-10 nos indivíduos com HAM/TSP pode estar relacionado a uma menor eficiência dos CTL em destruir as células infectadas pelo HTLV-1. A citocina regulatória IL-10 quando adicionada em cultura *in vitro* de células de linhagem de pacientes com HAM/TSP parece potencializar a proliferação destas células⁽⁹⁹⁾. IL-10 é conhecida por regular a produção de IFN- γ *in vitro* em indivíduos com HAM/TSP⁽⁷⁶⁾ agindo como supressora da imunidade celular e podendo causar escape ao controle imune, resultando em infecções fatais ou crônicas⁽¹¹⁴⁾. De fato, tem sido demonstrado que a produção excessiva de IL-10 pode inibir a resposta pró-inflamatória ao *Plasmodium spp.*^(115, 116) *Leishmania spp.*⁽¹¹⁷⁻¹¹⁹⁾, *T. cruzi*⁽¹²⁰⁾ e *Mycobacterium spp.*⁽¹²¹⁾. Na infecção viral crônica pela hepatite C foi observado que indivíduos submetidos a terapia com doses diárias de IL-10 apresentaram aumento da carga viral, porém reduziram níveis de inflamação e fibrose hepática⁽¹²²⁾. Desta maneira, acredita-se que os efeitos da IL-10, parecem similares na maioria das infecções persistentes e/ou crônicas suprimindo a função macrofágica e das células dendríticas, limitando assim as respostas efetoras Th1 e Th2⁽¹¹⁴⁾.

A partir dos nossos achados sugerimos, que predomínio de IL-10 pode favorecer a proliferação dos linfócitos T regulatórios e por outro lado suprimir a função efetora das CTLs diminuindo assim a lise das células infectadas. Deste modo, os linfócitos T CD4⁺ permaneceriam infectados e em proliferação promovendo a manutenção das altas taxas de carga proviral (Figura 4).

A HAM/TSP é caracterizada por ser uma doença inflamatória crônica e progressiva do sistema nervoso. A ativação e inflamação exacerbada nesta patologia ocorrem mesmo em maior frequência dos linfócitos Treg. Nesse contexto, a função regulatória das células CD4⁺ e CD8⁺ parecem não ser suficientes para conter a intensa ativação e produção de citocinas pró-inflamatórias desencadeada pelo vírus. Além disso, uma correlação positiva entre a frequência da célula produtora de IL-10 com a carga proviral pode indicar que IL-10 modula fracamente

a produção de citocinas pró-inflamatórias em indivíduos com HAM/TSP, podendo assim contribuir para exacerbação da resposta inflamatória e consequente dano tecidual ⁽⁷⁶⁾.

Os pacientes infectados por HTLV-1 assintomáticos apresentaram menor frequência de linfócitos T regulatórios produtores apenas de IL-10 e maior frequência de linfócitos T regulatórios produtores apenas de TGF- β . A manutenção do quadro assintomático parece estar associada a uma redução dos níveis de IL-10 ou a um aumento de TGF- β . Uma produção equilibrada de TGF- β e IL-10 poderia contribuir para a manutenção de um ambiente inflamatório controlado e reduzir a supressão de CTL (Figura 5). Portanto nos indivíduos assintomáticos, as CTLs poderiam desempenhar com mais eficiência seu papel de controle das células infectadas pelo HTLV-1 mantendo reduzida carga proviral, que está diretamente relacionada com o risco de desenvolvimento de doenças associadas à infecção, como a HAM/TSP^(71,72). Além disso, TGF- β é capaz de promover uma redução da secreção dos níveis de IL-2, exercendo assim um efeito anti-proliferativo para os linfócitos T CD4⁺ ⁽⁹⁹⁾.

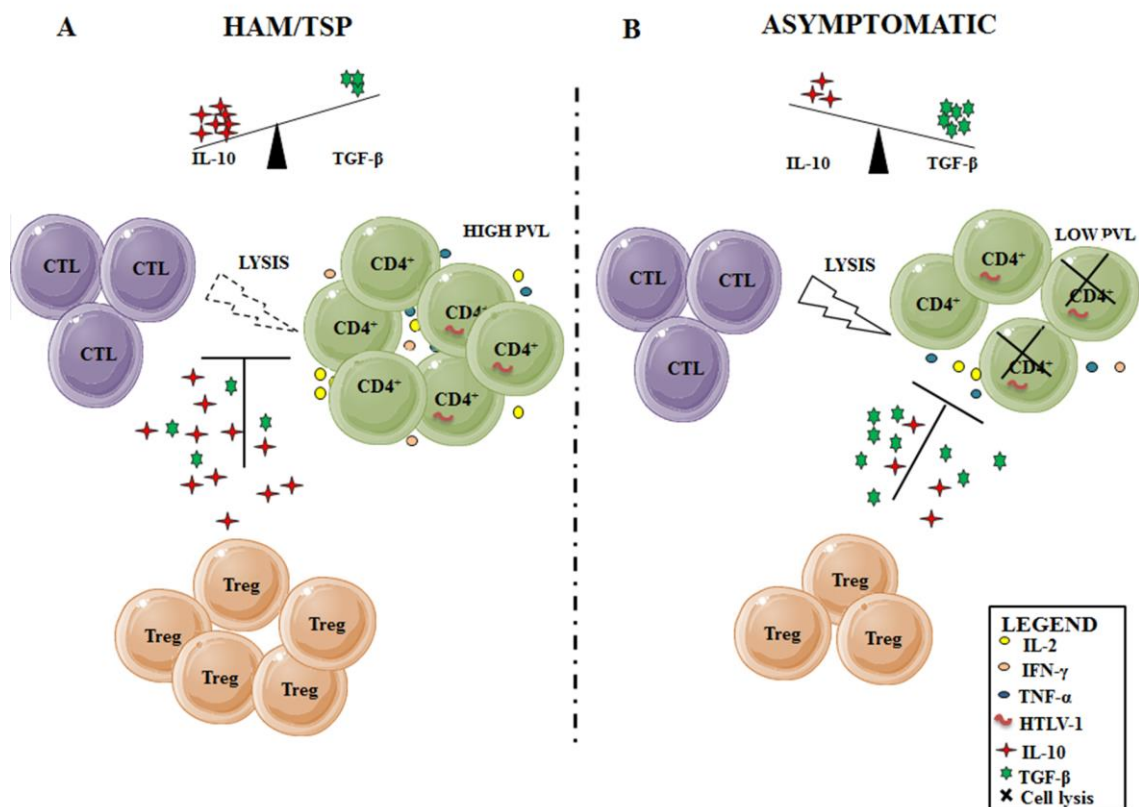


Figura 7 - Figura esquemática que representa a hipótese desta tese sobre as disfunções dos linfócitos T regulatórios podem contribuir para a HAM/TSP

Em indivíduos com HAM/TSP (A) ocorre o aumento da proliferação de linfócitos T regulatórios monoprodutores de IL-10 quando comparados com os linfócitos Tregs produtores TGF- β . IL-10 parece ser capaz de suprimir os linfócitos T citotóxicos TCD8 (CTL) na lise das células CD4⁺ promovendo a manutenção da carga proviral. Linfócitos com perfil Th1 produzem citocinas (IL-2) capazes de induzir a proliferação de

linfócitos TCD4 mantendo assim a infecção e produção de citocinas pró-inflamatórias (IFN e TNF) que contribuem para a degeneração de sistema nervoso. Por outro lado, os linfócitos T regulatórios de indivíduos assintomáticos (B) produzem predominantemente TGF- β , bloqueando a produção de IL-2, reduzindo a proliferação de linfócitos T CD4+ infectados. A lise efetiva dos linfócitos T CD4+ infectados pelos linfócitos T CD8+ contribui para a manutenção dos níveis reduzidos de carga proviral. A balança esquematizada na parte inferior da imagem demonstra a produção de citocinas regulatórias nos indivíduos com HAM/TSP e assintomáticos.

Sabidamente os linfócitos Treg exercem seu papel supressor pelo contato célula-célula ou via secreção de citocinas imunossupressoras, indicando uma estreita proximidade com a célula alvo⁽¹²³⁻¹²⁵⁾. Deste modo, a avaliação de linfócitos Treg em PBMCs e não no líquido pode caracterizar um fator limitante para este estudo por não reproduzir e que ocorre no sítio da lesão.

Em resumo, T regs em indivíduos HAM / TSP apresentam um desequilíbrio na produção de IL-10 e TGF- β , o que pode estar implicado na patogênese desta doença. Estudos adicionais devem ser conduzidos para uma avaliação mais completa dos perfis de citocinas dessas células.

8 CONCLUSÃO

Foi observado um perfil distinto na produção de citocinas pelos linfócitos T regulatórias entre os grupos de indivíduos infectados pelo HTLV-1⁺. Nos indivíduos com HAM/TSP ocorreu um predomínio de linfócitos T regulatórios produzindo IL-10, enquanto nos assintomáticos um predomínio TGF- β . Além do mais, constatamos que a produção de IL-10 nos indivíduos com HAM/TSP ocorre predominantemente pelos linfócitos T reg.

REFERÊNCIAS

1. Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1980;77(12):7415-9.
2. Gessain A, Cassar O. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. *Frontiers in microbiology*. 2012;3.
3. Proietti FA, Carneiro-Proietti ABF, Catalan-Soares BC, Murphy EL. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene*. 2005;24(39):6058-68.
4. Dourado I, Alcantara LC, Barreto ML, da Gloria Teixeira M, Galvao-Castro B. HTLV-I in the general population of Salvador, Brazil: a city with African ethnic and sociodemographic characteristics. *Journal of acquired immune deficiency syndromes*. 2003;34(5):527-31.
5. Mochizuki M, Watanabe T, Yamaguchi K, Takatsuki K, Yoshimura K, Shirao M, et al. HTLV-I uveitis: a distinct clinical entity caused by HTLV-I. *Jpn J Cancer Res*. 1992;83(3):236-9.
6. Gessain A, Vernant J, Maurs L, Barin F, Gout O, Calender Ad. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *The Lancet*. 1985;326(8452):407-10.
7. Grassi MF, Olavarria VN, Kruschewsky Rde A, Mascarenhas RE, Dourado I, Correia LC, et al. Human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) proviral load of HTLV-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) patients according to new diagnostic criteria of HAM/TSP. *Journal of medical virology*. 2011;83(7):1269-74.
8. Olindo S, Lezin A, Cabre P, Merle H, Saint-Vil M, Edimonana Kaptue M, et al. HTLV-1 proviral load in peripheral blood mononuclear cells quantified in 100 HAM/TSP patients: a marker of disease progression. *J Neurol Sci*. 2005;237(1-2):53-9.
9. Nagai M, Usuku K, Matsumoto W, Kodama D, Takenouchi N, Moritoyo T, et al. Analysis of HTLV-I proviral load in 202 HAM/TSP patients and 243 asymptomatic HTLV-I carriers: high proviral load strongly predisposes to HAM/TSP. *J Neurovirol*. 1998;4(6):586-93.
10. Primo J, Siqueira I, Nascimento MC, Oliveira MF, Farre L, Carvalho EM, et al. High HTLV-1 proviral load, a marker for HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis, is also detected in patients with infective dermatitis associated with HTLV-1. *Braz J Med Biol Res*. 2009;42(8):761-4.
11. Santos SB, Porto AF, Muniz AL, de Jesus AR, Magalhaes E, Melo A, et al. Exacerbated inflammatory cellular immune response characteristics of HAM/TSP is observed in a large proportion of HTLV-I asymptomatic carriers. *BMC infectious diseases*. 2004;4:7.

12. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular*. 6ª edição ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.
13. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchick MJ. *Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença*. 6ª edição ed. Porto Alegre: Artmed; 2006.
14. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003;299(5609):1057-61.
15. Mills KH. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nature reviews Immunology*. 2004;4(11):841-55.
16. Yamano Y, Takenouchi N, Li HC, Tomaru U, Yao K, Grant CW, et al. Virus-induced dysfunction of CD4+CD25+ T cells in patients with HTLV-I-associated neuroimmunological disease. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(5):1361-8.
17. Michaelsson J, Barbosa HM, Jordan KA, Chapman JM, Brunialti MK, Neto WK, et al. The frequency of CD127low expressing CD4+CD25high T regulatory cells is inversely correlated with human T lymphotropic virus type-1 (HTLV-1) proviral load in HTLV-1-infection and HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *BMC Immunol*. 2008;9(41):1471-2172.
18. Best I, Lopez G, Verdonck K, Gonzalez E, Tipismana M, Gotuzzo E, et al. IFN-gamma production in response to Tax 161-233, and frequency of CD4+ Foxp3+ and Lin HLA-DRhigh CD123+ cells, discriminate HAM/TSP patients from asymptomatic HTLV-1-carriers in a Peruvian population. *Immunology*. 2009;128(1 Suppl):1365-2567.
19. Toulza F, Heaps A, Tanaka Y, Taylor GP, Bangham CR. High frequency of CD4+FoxP3+ cells in HTLV-1 infection: inverse correlation with HTLV-1-specific CTL response. *Blood*. 2008;111(10):5047-53.
20. Satou Y, Utsunomiya A, Tanabe J, Nakagawa M, Nosaka K, Matsuoka M. HTLV-1 modulates the frequency and phenotype of FoxP3+CD4+ T cells in virus-infected individuals. *Retrovirology*. 2012;9(46):1742-4690.
21. de The G, Bomford R. An HTLV-I vaccine: why, how, for whom? *AIDS research and human retroviruses*. 1993;9(5):381-6.
22. Carneiro-Proietti ABF, Ribas JGR, Catalan-Soares BC, Martins ML, Brito-Melo GE, Martins-Filho OA, et al. Infection and disease caused by the human T cell lymphotropic viruses type I and II in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2002;35(5):499-508.
23. Catalan-Soares B, Carneiro-Proietti AB, Proietti FA. Human T-cell lymphotropic virus in family members of seropositive blood donors: silent dissemination. *Revista Panamericana de Salud Pública*. 2004;16(6):387-94.
24. Galvao-Castro B, Loures L, Rodrigues LG, Sereno A, Ferreira Junior OC, Franco LG, et al. Distribution of human T-lymphotropic virus type I among blood donors: a nationwide Brazilian study. *Transfusion*. 1997;2(37):242-3.

25. Dourado I, Andrade T, Galvao-Castro B. HTLV-I in Northeast Brazil: differences for male and female injecting drug users. *Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology : official publication of the International Retrovirology Association*. 1998;19(4):426-9. Epub 1998/12/02.
26. Kajiyama W, Kashiwagi S, Hayashi J, Nomura H, Ikematsu H, Noguchi A, et al. Study of seroconversion of antibody to human T-cell lymphotropic virus type-I in children of Okinawa, Japan. *Microbiol Immunol*. 1990;34(3):259-67.
27. Kaplan JE, Osame M, Kubota H, Igata A, Nishitani H, Maeda Y, et al. The risk of development of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis among persons infected with HTLV-I. *Journal of acquired immune deficiency syndromes*. 1990;3(11):1096-101.
28. Manns A, Wilks RJ, Murphy EL, Haynes G, Figueroa JP, Barnett M, et al. A prospective study of transmission by transfusion of HTLV-I and risk factors associated with seroconversion. *Int J Cancer*. 1992;51(6):886-91.
29. Saji F, Ohashi K, Tokugawa Y, Kamiura S, Azuma C, Tanizawa O. Perinatal infection of human T-lymphotropic virus type I, the etiologic virus of adult T-cell leukemia/lymphoma. DNA amplification of specific human T-lymphotropic virus type I sequences. *Cancer*. 1990;66(9):1933-7.
30. Popovic M, Lange-Wantzin G, Sarin PS, Mann D, Gallo RC. Transformation of human umbilical cord blood T cells by human T-cell leukemia/lymphoma virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983;80(17):5402-6.
31. Richardson JH, Edwards AJ, Cruickshank JK, Rudge P, Dalgleish AG. In vivo cellular tropism of human T-cell leukemia virus type 1. *Journal of virology*. 1990;64(11):5682-7.
32. Gallo D, Penning LM, Hanson CV. Detection and differentiation of antibodies to human T-cell lymphotropic virus types I and II by the immunofluorescence method. *J Clin Microbiol*. 1991;29(10):2345-7.
33. Macatonia SE, Cruickshank JK, Rudge P, Knight SC. Dendritic cells from patients with tropical spastic paraparesis are infected with HTLV-1 and stimulate autologous lymphocyte proliferation. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1992;8(9):1699-706.
34. Höllsberg P. Mechanisms of T-cell activation by human T-cell lymphotropic virus type I. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1999;63(2):308-33.
35. Manel N, Kim FJ, Kinet S, Taylor N, Sitbon M, Battini JL. The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV. *Cell*. 2003;115(4):449-59.
36. Seiki M, Eddy R, Shows TB, Yoshida M. Nonspecific integration of the HTLV provirus genome into adult T-cell leukaemia cells. *Nature*. 1984;309(5969):640-2.

37. Bangham CR. The immune control and cell-to-cell spread of human T-lymphotropic virus type 1. *J Gen Virol.* 2003;84(Pt 12):3177-89.
38. Pais-Correia AM, Sachse M, Guadagnini S, Robbiati V, Lasserre R, Gessain A, et al. Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses. *Nature medicine.* 2010;16(1):83-9.
39. Cimarelli A, Duclos CA, Gessain A, Casoli C, Bertazzoni U. Clonal expansion of human T-cell leukemia virus type II in patients with high proviral load. *Virology.* 1996;223(2):362-4.
40. Wattel E, Vartanian JP, Pannetier C, Wain-Hobson S. Clonal expansion of human T-cell leukemia virus type I-infected cells in asymptomatic and symptomatic carriers without malignancy. *Journal of virology.* 1995;69(5):2863-8.
41. Azran I, Schavinsky-Khrapunsky Y, Aboud M. Role of Tax protein in human T-cell leukemia virus type-I leukemogenicity. *Retrovirology.* 2004;1:20.
42. Norris PJ, Hirschhorn DF, DeVita DA, Lee TH, Murphy EL. Human T cell leukemia virus type 1 infection drives spontaneous proliferation of natural killer cells. *Virulence.* 2010;1(1):19-28.
43. Kramer A, Jacobson S, Reuben JF, Murphy EL, Wiktor SZ, Cranston B, et al. Spontaneous lymphocyte proliferation in symptom-free HTLV-I positive Jamaicans: *Lancet.* 1989 Oct 14;2(8668):923-4.
44. Asquith B, Bangham CR. Quantifying HTLV-I dynamics. *Immunology and cell biology.* 2007;85(4):280-6.
45. Osame M, Usuku K, Izumo S, Ijichi N, Amitani H, Igata A, et al. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *The Lancet.* 1986;327(8488):1031-2.
46. Murphy EL, Wang B, Sacher RA, Fridey J, Smith JW, Nass CC, et al. Respiratory and urinary tract infections, arthritis, and asthma associated with HTLV-I and HTLV-II infection. *Emerg Infect Dis.* 2004;10(1):109-16.
47. Nishioka K, Sumida T, Hasunuma T. Human T lymphotropic virus type I in arthropathy and autoimmune disorders. *Arthritis and rheumatism.* 1996;39(8):1410-8.
48. Osame M, Nakagawa M, Umehara F, Ijichi S, Moritoyo T, Higuchi I, et al. Recent studies on the epidemiology, clinical features and pathogenic mechanisms of HTLV-I associated myelopathy (HAM/TSP) and other diseases associated to HTLV. *J Neurovirool.* 1997;3 Suppl 1:S50-1.
49. Nakamura H, Eguchi K, Nakamura T, Mizokami A, Shirabe S, Kawakami A, et al. High prevalence of Sjogren's syndrome in patients with HTLV-I associated myelopathy. *Annals of the rheumatic diseases.* 1997;56(3):167-72.
50. Buggage RR. Ocular manifestations of human T-cell lymphotropic virus type 1 infection. *Curr Opin Ophthalmol.* 2003;14(6):420-5.

51. Bittencourt AL, Oliveira Mde F, Ferraz N, Vieira M, Muniz A, Brites C. Adult-onset infective dermatitis associated with HTLV-I. Clinical and immunopathological aspects of two cases. *Eur J Dermatol.* 2006;16(1):62-6.
52. Goncalves DU, Guedes AC, Proietti AB, Martins ML, Proietti FA, Lambertucci JR. Dermatologic lesions in asymptomatic blood donors seropositive for human T cell lymphotropic virus type-1. *The American journal of tropical medicine and hygiene.* 2003;68(5):562-5.
53. Murphy EL, Hanchard B, Figueroa JP, Gibbs WN, Lofters WS, Campbell M, et al. Modelling the risk of adult T-cell leukemia/lymphoma in persons infected with human T-lymphotropic virus type I. *Int J Cancer.* 1989;43(2):250-3.
54. Hinuma Y, Nagata K, Hanaoka M, Nakai M, Matsumoto T, Kinoshita K-I, et al. Adult T-cell leukemia: antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1981;78(10):6476-80.
55. Araujo AQ, Silva MT. The HTLV-1 neurological complex. *Lancet Neurol.* 2006;5(12):1068-76.
56. Lepoutre V, Jain P, Quann K, Wigdahl B, Khan ZK. Role of resident CNS cell populations in HTLV-1-associated neuroinflammatory disease. *Front Biosci.* 2009;14:1152-68.
57. Lima MA, Bica RB, Araujo AQ. Gender influence on the progression of HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2005 Feb;76(2):294-6.
58. Kira J, Koyanagi Y, Yamada T, Itoyama Y, Goto I, Yamamoto N, et al. Increased HTLV-I proviral DNA in HTLV-I-associated myelopathy: a quantitative polymerase chain reaction study. *Ann Neurol.* 1991;29(2):194-201.
59. Bangham CR, Araujo A, Yamano Y, Taylor GP. HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Nature reviews Disease primers.* 2015;1:15012. Epub 2015/01/01.
60. Nakamura T. Immunopathogenesis of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Ann Med.* 2000;32(9):600-7.
61. Osame M. Pathological mechanisms of human T-cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy (HAM/TSP). *J Neurovirool.* 2002;8(5):359-64.
62. Taylor GP. Pathogenesis and treatment of HTLV-I associated myelopathy. *Sexually transmitted infections.* 1998;74(5):316-22. Epub 1999/04/09.
63. zumo S. Neuropathology of HTLV-1-associated myelopathy (HAM/TSP). *Neuropathology.* 2010.

64. Iwasaki Y. Human T cell leukemia virus type I infection and chronic myelopathy. *Brain Pathol.* 1993;3(1):1-10.
65. Ijichi S, Izumo S, Eiraku N, Machigashira K, Kubota R, Nagai M, et al. An autoaggressive process against bystander tissues in HTLV-I-infected individuals: a possible pathomechanism of HAM/TSP. *Medical hypotheses.* 1993;41(6):542-7.
66. Jones KS, Fugo K, Petrow-Sadowski C, Huang Y, Bertolette DC, Lisinski I, et al. Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 use different receptor complexes to enter T cells. *Journal of virology.* 2006;80(17):8291-302.
67. Jacobson S. Cellular immune responses to HTLV-I: immunopathogenic role in HTLV-I-associated neurologic disease. *Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology : official publication of the International Retrovirology Association.* 1996;13(1):S100-6.
68. Levin MC, Krichavsky M, Berk J, Foley S, Rosenfeld M, Dalmau J, et al. Neuronal molecular mimicry in immune-mediated neurologic disease. *Ann Neurol.* 1998;44(1):87-98.
69. Jacobson S. Immunopathogenesis of human T cell lymphotropic virus type I-associated neurologic disease. *The Journal of infectious diseases.* 2002;186 Suppl 2:S187-92.
70. Asquith B, Mosley AJ, Barfield A, Marshall SE, Heaps A, Goon P, et al. A functional CD8+ cell assay reveals individual variation in CD8+ cell antiviral efficacy and explains differences in human T-lymphotropic virus type 1 proviral load. *J Gen Virol.* 2005;86(Pt 5):1515-23.
71. Bangham CR. HTLV-1 infections. *Journal of Clinical Pathology.* 2000;53(8):581-6.
72. Cavrois M, Gessain A, Wain-Hobson S, Wattel E. Proliferation of HTLV-1 infected circulating cells in vivo in all asymptomatic carriers and patients with TSP/HAM. *Oncogene.* 1996;12(11):2419-23.
73. Henkart P, Henkart M, Millard P, Frederikse P, Bluestone J, Blumenthal R, et al. The role of cytoplasmic granules in cytotoxicity by large granular lymphocytes and cytotoxic T lymphocytes. *Advances in experimental medicine and biology.* 1985;184:121-38.
74. Kubota R, Kawanishi T, Matsubara H, Manns A, Jacobson S. Demonstration of human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) tax-specific CD8+ lymphocytes directly in peripheral blood of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients by intracellular cytokine detection. *J Immunol.* 1998;161(1):482-8.
75. Nishiura Y, Nakamura T, Ichinose K, Shirabe S, Tsujino A, Goto H, et al. Increased production of inflammatory cytokines in cultured CD4+ cells from patients with HTLV-I-associated myelopathy. *Tohoku J Exp Med.* 1996;179(4):227-33.

76. Santos SB, Porto AF, Muniz AL, Luna T, Nascimento MC, Guerreiro JB, et al. Modulation of T cell responses in HTLV-1 carriers and in patients with myelopathy associated with HTLV-1. *Neuroimmunomodulation*. 2006;13(3):145-51.
77. Ng TH, Britton GJ, Hill EV, Verhagen J, Burton BR, Wraith DC. Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin-10. *Frontiers in immunology*. 2013;4:129. Epub 2013/06/12.
78. Brito-Melo GE, Peruhype-Magalhaes V, Teixeira-Carvalho A, Barbosa-Stancioli EF, Carneiro-Proietti AB, Catalan-Soares B, et al. IL-10 produced by CD4+ and CD8+ T cells emerge as a putative immunoregulatory mechanism to counterbalance the monocyte-derived TNF-alpha and guarantee asymptomatic clinical status during chronic HTLV-I infection. *Clinical and experimental immunology*. 2007;147(1):35-44.
79. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nature reviews Immunology*. 2010;10(7):490-500.
80. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*. 2008;133(5):775-87.
81. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. 1995;155(3):1151-64.
82. Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol*. 2001;167(3):1245-53.
83. Ochs HD, Ziegler SF, Torgerson TR. FOXP3 acts as a rheostat of the immune response. *Immunological reviews*. 2005;203:156-64. Epub 2005/01/22.
84. Araya N, Sato T, Yagishita N, Ando H, Utsunomiya A, Jacobson S, et al. Human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and regulatory T cells in HTLV-1-associated neuroinflammatory disease. *Viruses*. 2011;3(9):1532-48.
85. Chatila TA. Role of regulatory T cells in human diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;116(5):949-59.
86. Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nature immunology*. 2002;3(2):135-42.
87. Bacchetta R, Gambineri E, Roncarolo MG. Role of regulatory T cells and FOXP3 in human diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120(2):227-35.
88. Gupta S, Shang W, Sun Z. Mechanisms regulating the development and function of natural regulatory T cells. *Arch Immunol Ther Exp*. 2008;56(2):85-102.
89. Sharif S, Arreaza GA, Zucker P, Delovitch TL. Regulatory natural killer T cells protect against spontaneous and recurrent type 1 diabetes. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2002;958:77-88. Epub 2002/05/22.

90. Hayday A, Tigelaar R. Immunoregulation in the tissues by $\gamma\delta$ T cells. *Nature Reviews Immunology*. 2003;3(3):233-42.
91. Mizoguchi A, Mizoguchi E, Takedatsu H, Blumberg RS, Bhan AK. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. *Immunity*. 2002;16(2):219-30.
92. Apostolou I, Sarukhan A, Klein L, von Boehmer H. Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nature immunology*. 2002;3(8):756-63.
93. Papiernik M, Pontoux C, Joret A, Rocha B, Penit C, Dy M. T cell deletion induced by chronic infection with mouse mammary tumor virus spares a CD25-positive, IL-10-producing T cell population with infectious capacity. *The Journal of Immunology*. 1997;158(10):4642-53.
94. Bach J-F. Organ-specific autoimmunity. *Immunology today*. 1995;16(7):353-5.
95. Pearson C, McDevitt H. Redirecting Th1 and Th2 responses in autoimmune disease. *Redirection of Th1 and Th2 Responses: Springer; 1999. p. 79-122.*
96. Yudoh K, Matsuno H, Nakazawa F, Yonezawa T, Kimura T. Reduced expression of the regulatory CD4⁺ T cell subset is related to Th1/Th2 balance and disease severity in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2000;43(3):617-27. Epub 2000/03/23.
97. Chevalier MF, Weiss L. The split personality of regulatory T cells in HIV infection. *Blood*. 2013;121(1):29-37. Epub 2012/10/09.
98. Yoshida M. Multiple viral strategies of HTLV-1 for dysregulation of cell growth control. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:475-96.
99. Levings MK, Bacchetta R, Schulz U, Roncarolo MG. The role of IL-10 and TGF-beta in the differentiation and effector function of T regulatory cells. *International archives of allergy and immunology*. 2002;129(4):263-76. Epub 2002/12/17
100. Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *International immunology*. 2009;21(10):1105-11.
101. Simonetta F, Bourgeois C. CD4⁺FOXP3⁺ Regulatory T-Cell Subsets in Human Immunodeficiency Virus Infection. *Frontiers in immunology*. 2013;4:215. Epub 2013/08/03.
102. Eggena MP, Barugahare B, Jones N, Okello M, Mutalya S, Kityo C, et al. Depletion of regulatory T cells in HIV infection is associated with immune activation. *J Immunol*. 2005;174(7):4407-14. Epub 2005/03/22.
103. Shaw JM, Hunt PW, Critchfield JW, McConnell DH, Garcia JC, Pollard RB, et al. Increased frequency of regulatory T cells accompanies increased immune activation in

- rectal mucosae of HIV-positive noncontrollers. *Journal of virology*. 2011;85(21):11422-34. Epub 2011/09/02.
104. De Castro-Costa CM, Araujo AQ, Barreto MM, Takayanagui OM, Sohler MP, da Silva EL, et al. Proposal for diagnostic criteria of tropical spastic paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy (TSP/HAM). *AIDS research and human retroviruses*. 2006;22(10):931-5.
 105. Dehee A, Cesaire R, Desire N, Lezin A, Bourdonne O, Bera O, et al. Quantitation of HTLV-I proviral load by a TaqMan real-time PCR assay. *J Virol Methods*. 2002;102(1-2):37-51.
 106. Nascimento RS. Avaliação de células T regulatórias e perfil de ativação de linfócitos T na ceratoconjuntivite seca associada ao HTLV-1 [Internet]. Salvador: Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz; 2015 [citado 2017 jan 11]. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/12468>.
 107. Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *The Journal of experimental medicine*. 2001;194(5):629-44.
 108. Mosley AJ, Asquith B, Bangham CR. Cell-mediated immune response to human T-lymphotropic virus type I. *Viral Immunol*. 2005;18(2):293-305.
 109. Sato T, Coler-Reilly A, Utsunomiya A, Araya N, Yagishita N, Ando H, et al. CSF CXCL10, CXCL9, and neopterin as candidate prognostic biomarkers for HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *PLoS neglected tropical diseases*. 2013;7(10):e2479. Epub 2013/10/17.
 110. Montanheiro PA, Penalva de Oliveira AC, Smid J, Fukumori LM, Olah I, da S Duarte AJ, et al. The elevated interferon gamma production is an important immunological marker in HAM/TSP pathogenesis. *Scand J Immunol*. 2009;70(4):403-7.
 111. Goldsby TP, Kindt T, Osborn B. *KUBY IMUNOLOGIA 4ª edição ed*. Rio de Janeiro: Revinter; 2008. 662 p.
 112. Garba ML, Pilcher CD, Bingham AL, Eron J, Frelinger JA. HIV antigens can induce TGF-beta(1)-producing immunoregulatory CD8+ T cells. *J Immunol*. 2002;168(5):2247-54.
 113. Jacobson S, Shida H, McFarlin DE, Fauci AS, Koenig S. Circulating CD8+ cytotoxic T lymphocytes specific for HTLV-I pX in patients with HTLV-I associated neurological disease. *Nature*. 1990;348(6298):245-8.
 114. Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol*. 2008;180(9):5771-7. Epub 2008/04/22.
 115. Omer FM, de Souza JB, Riley EM. Differential induction of TGF-beta regulates proinflammatory cytokine production and determines the outcome of lethal and

- nonlethal *Plasmodium yoelii* infections. *J Immunol.* 2003;171(10):5430-6. Epub 2003/11/11.
116. Wu Y, Wang QH, Zheng L, Feng H, Liu J, Ma SH, et al. *Plasmodium yoelii*: distinct CD4(+)CD25(+) regulatory T cell responses during the early stages of infection in susceptible and resistant mice. *Experimental parasitology.* 2007;115(3):301-4. Epub 2006/11/07.
117. Anderson CF, Mendez S, Sacks DL. Nonhealing infection despite Th1 polarization produced by a strain of *Leishmania major* in C57BL/6 mice. *J Immunol.* 2005;174(5):2934-41. Epub 2005/02/25.
118. Belkaid Y, Hoffmann KF, Mendez S, Kamhawi S, Udey MC, Wynn TA, et al. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. *The Journal of experimental medicine.* 2001;194(10):1497-506. Epub 2001/11/21.
119. Murphy ML, Wille U, Villegas EN, Hunter CA, Farrell JP. IL-10 mediates susceptibility to *Leishmania donovani* infection. *European journal of immunology.* 2001;31(10):2848-56. Epub 2001/10/10.
120. Reed SG, Brownell CE, Russo DM, Silva JS, Grabstein KH, Morrissey PJ. IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol.* 1994;153(7):3135-40. Epub 1994/10/01.
121. Roque S, Nobrega C, Appelberg R, Correia-Neves M. IL-10 underlies distinct susceptibility of BALB/c and C57BL/6 mice to *Mycobacterium avium* infection and influences efficacy of antibiotic therapy. *J Immunol.* 2007;178(12):8028-35. Epub 2007/06/06.
122. Nelson DR, Tu Z, Soldevila-Pico C, Abdelmalek M, Zhu H, Xu YL, et al. Long-term interleukin 10 therapy in chronic hepatitis C patients has a proviral and anti-inflammatory effect. *Hepatology.* 2003;38(4):859-68. Epub 2003/09/27.
123. Cavassani KA, Campanelli AP, Moreira AP, Vancim JO, Vitali LH, Mamede RC, et al. Systemic and local characterization of regulatory T cells in a chronic fungal infection in humans. *J Immunol.* 2006;177(9):5811-8.
124. Filaci G, Fenoglio D, Fravega M, Ansaldo G, Borgonovo G, Traverso P, et al. CD8+ CD28- T regulatory lymphocytes inhibiting T cell proliferative and cytotoxic functions infiltrate human cancers. *J Immunol.* 2007;179(7):4323-34.
125. Ward SM, Fox BC, Brown PJ, Worthington J, Fox SB, Chapman RW, et al. Quantification and localisation of FOXP3+ T lymphocytes and relation to hepatic inflammation during chronic HCV infection. *J Hepatol.* 2007;47(3):316-24.

APÊNDICE

APÊNDICE 1 – Artigo: Investigating the role of regulatory T-lymphocytes in individuals infected with HTLV-1

Investigating the role of regulatory T-lymphocytes in individuals infected with HTLV-1

Bárbara Ribeiro Soares^{1,2}; Luana Leandro Gois^{1,2}; Carlos Gustavo Regis-da-Silva¹; Bernardo Galvão-Castro^{1,2}; Maria Fernanda Rios Grassi^{1,2}.

1 - Laboratório Avançado de Saúde Pública – Instituto Gonçalo Moniz - Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Salvador, Bahia, Brazil.

2 - Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública - Salvador, Bahia, Brazil.

† To whom correspondence should be addressed. E-mail: grassi@bahia.fiocruz.br.

Word count of the abstract: 200 words/ 1270 characters

Word count of the text: 1232 words/ 7279 characters

Abstract

Background: HTLV-1 induces a significant activation of the immune system, leading to the spontaneous proliferation of T-cells secreting proinflammatory cytokines in HAM/TSP individuals. Regulatory T-cells (Tregs) might be involved in the control of inflammation through the secretion of IL-10 and TGF- β .

Aim: This study aimed to compare the cytokine profiles of CD4⁺ and CD8⁺ Treg subsets in asymptomatic HTLV-1-infected individuals and HAM/TSP patients.

Methods: Asymptomatic HTLV-1-infected individuals and those with a diagnosis of HAM/TSP were matched by sex and age. A group of uninfected individuals were employed as controls. Peripheral blood mononuclear cells were cultivated and labeled with monoclonal antibodies (anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD25, anti-FOXP3, anti-IL-10 and anti-TGF- β). The frequency of Treg subsets producing or not IL-10 and/or TGF- β were quantified by flow cytometry.

Results: The frequency of CD4⁺ Tregs was statistically higher in HAM/TSP patients compared to asymptomatic HTLV-1-infected individuals. The frequencies of CD4⁺ and CD8⁺ Tregs subsets producing IL-10 alone were statistically higher in HAM/TSP compared to asymptomatic individuals. In addition, a positive correlation between CD4⁺IL-10⁺ Tregs and proviral load was observed in HAM/TSP.

Conclusion: The dysregulated production of IL-10 and TGF- β in Tregs of HAM/TSP individuals may contribute to the exacerbated inflammatory response that characterizes this disease.

Key words: HTLV-1, HAM/TSP, regulatory T-cells, TGF- β , IL-10

Background

Human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) causes a persistent state of infection, which has been associated with inflammatory diseases, such as HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) (1), uveitis (2), arthritis (3) and bronchiectasis (4). High proviral loads are often found in patients with HTLV-1-associated diseases, particularly those with HAM/TSP, infectious dermatitis and uveitis (5-8). The CD4⁺ regulatory T-cell subset (Treg) is responsible for maintaining homeostasis in the immune system, suppressing the inflammatory response and preventing autoimmunity (9). Treg function is determined by the expression of forkhead transcription factor 3 (FoxP3) and by the production of the regulatory cytokines interleukin-10 (IL-10) and transforming growth factor β (TFG- β) (10). In addition, a subset of CD8⁺ T-cells expressing FoxP3 was reported as having a potent regulatory function (11). It has been posited that CD4⁺ and CD8⁺ Treg cells may play an important role in HTLV-1-associated diseases, especially in the pathogenesis of HAM/TSP, due to an exacerbated inflammatory milieu in the spinal cord and the presence of an autoimmune response (12). The literature is controversial regarding the frequency of CD4⁺ Treg cells in the context of HAM/TSP, as higher frequencies of CD4⁺ Treg cells have been reported in some HAM/TSP patients (13, 14) in contrast to other reports showing lower frequencies of CD4⁺ Treg cells in comparison to healthy individuals (15, 16). In addition, both CD4⁺ and CD8⁺ Treg function and cytokine production profiles remain unclear in HAM/TSP.

Objective

This study aimed to compare the cytokine profiles of CD4⁺ and CD8⁺ T-reg subsets in asymptomatic HTLV-1-infected individuals and HAM/TSP patients.

Study Design

HTLV-1-infected individuals were recruited at the Integrated and Multidisciplinary HTLV Center (CHTLV) of the Bahiana School of Medicine and Public Health (EBMSP-Bahia, Brazil) and classified by a neurologist as asymptomatic (n=17) or definite-HAM/TSP (n=15) (17). A healthy group consisted of 15 uninfected individuals. The percentage of females was 60%, 70% and 60% in the HAM/TSP, asymptomatic and non-infected groups, respectively, with corresponding mean ages of 51.3 ± 12.1 , 56.7 ± 14.1 , 40.7 ± 12.2 years. This study was approved by the Institutional Review Board of the Gonçalo Moniz Institute and all participants signed a term of informed consent.

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC), obtained by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), were cultured for 24 hours at 37°C under 5% CO_2 . After 19 hours of incubation, Brefladin A ($4 \mu\text{g/mL}$) (Sigma) and Monesin ($4 \mu\text{g/mL}$) (Sigma) were added to cultures. Five hours later, cells were stained for 30 minutes with anti-CD3-APC-Cy7, anti-CD4-AlexaFluor-700, anti-CD8-PECy7- and anti-CD25-PECy5 (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) (Fig.1A). Cells were then fixed using 1x Fix/Perm buffer (Biolegend, San Diego, CA, EUA) and 1x FOXP3 perm buffer (Biolegend) in accordance with manufacturer instructions. Next, cells were stained for 30 minutes with anti-FOXP3-PE (BD Biosciences, San Diego, CA, USA), anti-TGF- β -FITC (Biolegend) and anti-IL-10-APC (Biolegend). Finally, Treg subsets were acquired and cytokine profiles were characterized in both $\text{CD4}^+\text{CD3}^+\text{CD25}^+\text{FOXP3}^+$ ($\text{CD4}^+\text{Treg}$) and $\text{CD8}^+\text{CD3}^+\text{CD25}^+\text{FOXP3}^+$ ($\text{CD8}^+\text{Treg}$) cells using a FACS FORTESSA flow cytometer (BD Biosciences) with FlowJo software (FlowJo LLC, Ashland, OR, USA).

Statistical significance was tested by the non-parametric Kruskal-Wallis test with Dunn's posttest. Significance was considered when $P < 0.05$. All data were analyzed using GraphPad Prism (v5.0, La Jolla, CA, USA).

Results

The frequency of CD4⁺ Treg cells was 3.4x higher in the HAM/TSP group compared to asymptomatic individuals (p=0.02) (Fig. 1B). The frequency of CD4⁺IL10⁺TGF-β⁺ Treg cells was higher in the HAM/TSP group than in asymptomatic individuals (p=0.003) (Fig. 2B), yet 3.87 times fewer CD4⁺IL10⁻TGF β⁺ cells were found in the HAM/TSP group versus asymptomatic individuals (p=0.04) (Fig. 2B).

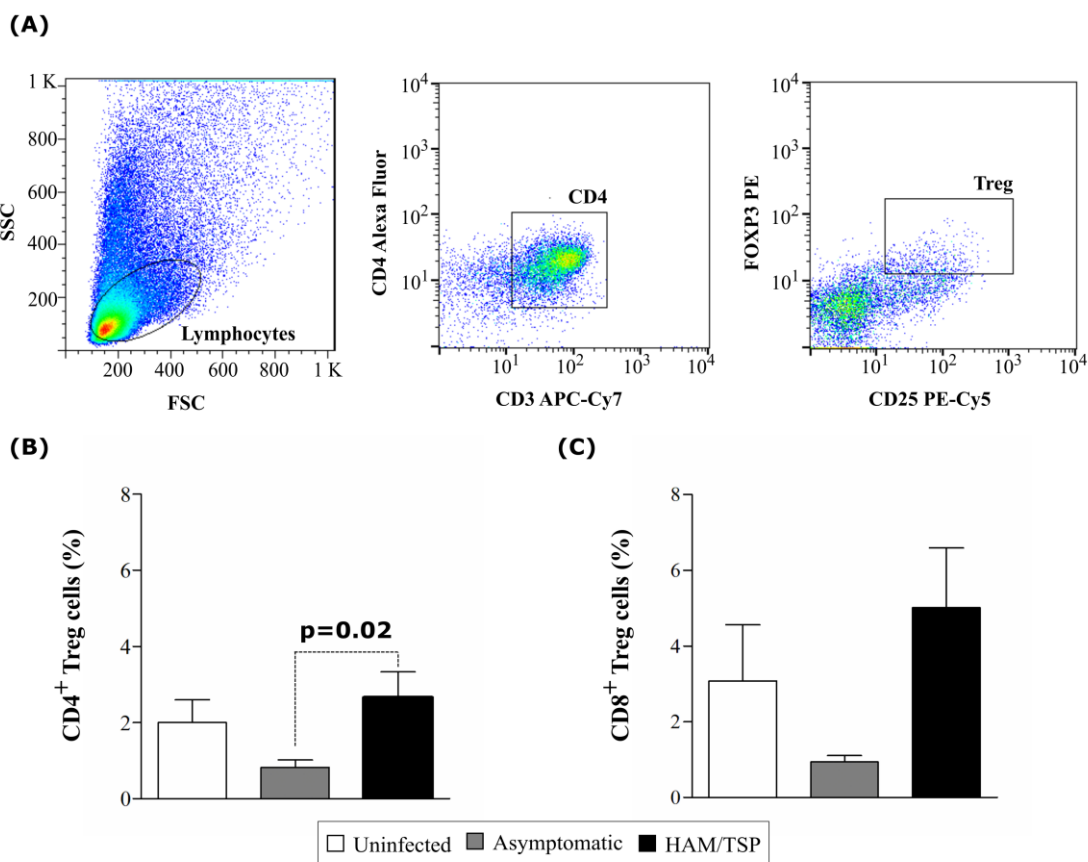


Figure 1. Frequencies of CD4⁺ and CD8⁺ Treg subsets in HTLV-1-infected and uninfected individuals. PBMC were labeled to anti-CD3-APC-Cy7, anti-CD4-AlexaFluor-700, anti-CD8-PECy7, anti-CD25-PECy5, anti-FOXP3-PE. Analysis was performed by flow cytometer. (A) Representative scatter plots depicting total lymphocytes, a gate of CD4⁺ or CD8⁺ T cells, followed by a gate of FoxP3 and CD25 T cells. (B) Frequencies of CD4⁺ Treg cells in asymptomatic HTLV-1 (n=17) and HAM/TSP (n=15) individuals, as well as

uninfected controls (n=15), (C) Frequencies of CD8⁺ Treg cells in these same groups. Bars are indicative of median cell frequencies and interquartile ranges. Asterisks denote significant differences as calculated by Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison post-test

The frequencies of CD8⁺ Treg cells were similar among the three evaluated groups (Fig. 1C). However, a higher frequency of CD8⁺IL10⁺TGF- β ⁺ Treg cells was found in the HAM/TSP group compared to asymptomatic individuals (p=0.01) (Fig. 2C), while the frequency of CD8⁺IL10⁺TGF- β ⁺ Treg cells was 31.3x higher in the HAM/TSP group compared to healthy controls (p=0.001). The frequencies of CD8⁺IL10⁻TGF- β ⁺ Treg cells were found to be similar among all groups (Fig. 2C). With regard to the pattern of cytokine production in CD4⁺ and CD8⁺ subsets, HTLV-1-infected individuals (asymptomatic and HAM/TSP) had higher frequencies of cells expressing both IL-10 and TGF- β compared to uninfected controls (Fig 2B, 2C). In addition, a higher frequency of CD4⁺ and CD8⁺ Treg cells expressing IL-10 alone was found in HAM/TSP compared with asymptomatic individuals.

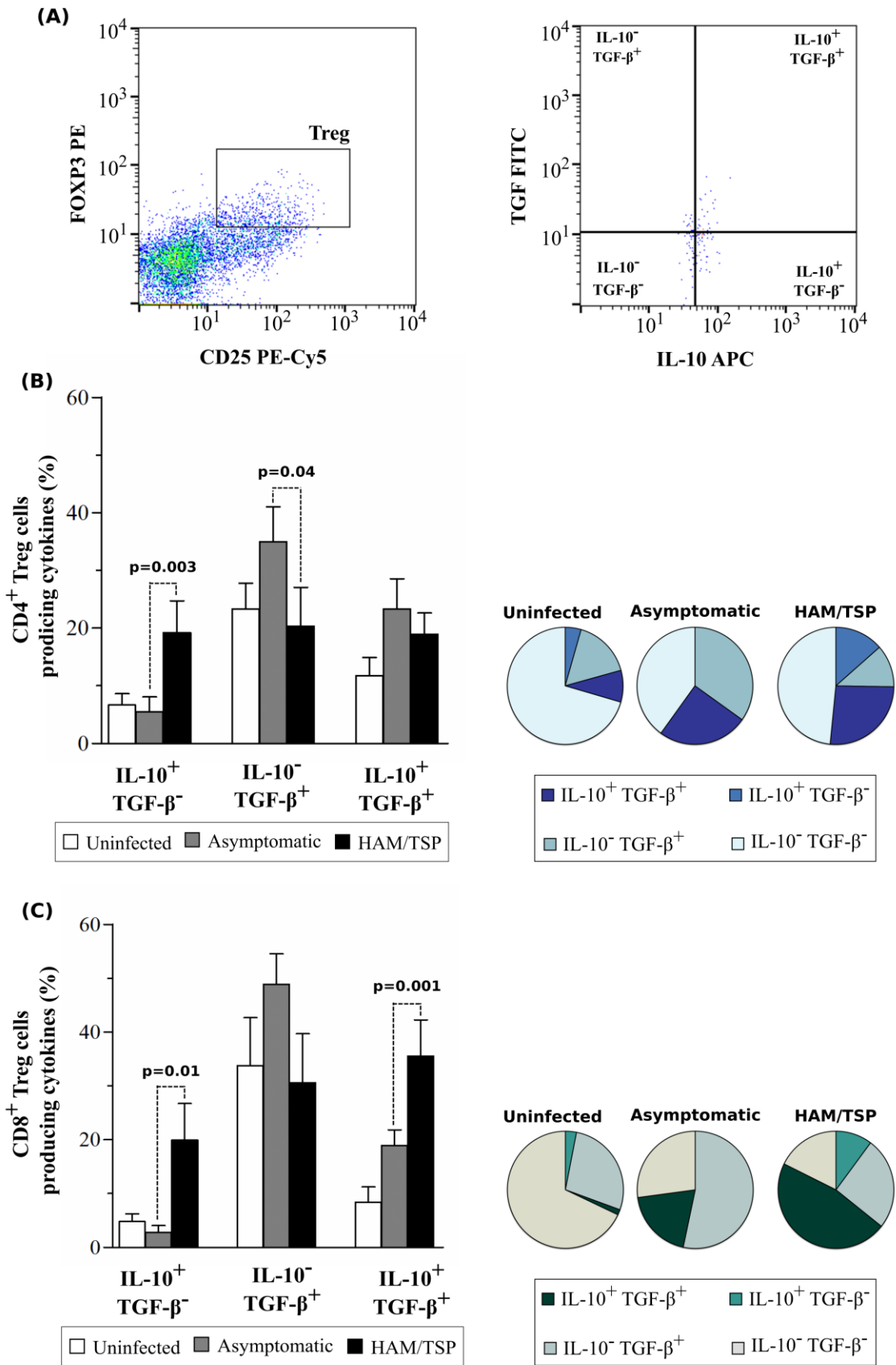


Figure 2. Profile of IL-10 and TGF- β production by CD4⁺ and CD8⁺ Treg subsets in HTLV-1-infected and uninfected individuals. PBMCs were labeled with anti-CD3-APC-Cy7, anti-CD4-AlexaFluor-700, anti-CD8-PECy7, anti-CD25-PECy5, anti-FOXP3-PE, anti-TGF- β -FITC and anti-IL-10-APC for flow cytometry. (A) Representative scatter plots depicting total lymphocytes, a gate of FoxP3⁺CD25⁺CD4⁺ or FoxP3⁺CD25⁺CD8⁺ Tcell subsets, followed by a gate of IL-10 and CD25 Treg cells. (B) Frequencies of CD4⁺ Treg cells producing IL-10 and TGF- β in asymptomatic HTLV-1 (n=17) and HAM/TSP (n=15) individuals, as well as uninfected controls (n=15). (C) Frequencies of CD8⁺ Treg cells producing IL-10 and TGF- β in these same groups. Bars are indicative of median cell frequencies and interquartile ranges. Patterns of frequency distribution of CD4⁺ and CD8⁺Treg cells producing IL-10 and TGF- β or not. Pie Chart percentiles were calculated using the median frequencies of IL10⁺TGF- β ⁻, IL10⁻TGF- β ⁺, IL10⁺TGF- β ⁺ producing and non-producing IL10⁻TGF- β ⁻ in CD4⁺ and CD8⁺ respectively. Treg cells in uninfected (n=15), asymptomatic HTLV-1 (n=17) and HAM/TSP (n=15) individuals.

Positive correlations between proviral load and the frequencies of both CD4⁺ (r=0.6; p=0.004) and CD8⁺ (r=0.6; p=0.007) Tregs producing IL-10 were found in HTLV-1-infected individuals. Moreover, in HAM/TSP individuals, a positive correlation between proviral load and CD4⁺ IL-10⁺ (r=0.8; p=0.03) was also found.

Discussion

The results presented herein demonstrate that a higher frequency of Tregs is found in individuals with HAM/TSP, especially with respect to the CD4⁺ Treg subset. Moreover, the CD4⁺ and CD8⁺ Treg subsets in these individuals predominantly expressed more IL-10 than TGF- β . In fact, the TGF- β /IL-10 ratios in both CD4⁺ and CD8⁺ T-reg subsets were lower (30 and 21 times, respectively) in HAM/TSP patients in comparison to asymptomatic individuals. Higher frequencies of CD4⁺ Tregs have been previously described in individuals with HAM/TSP evaluated in Peru (14), Japan (18) and the United Kingdom (13), corroborating the results obtained herein.

HAM/TSP is a chronic inflammatory disease that causes progressive spinal cord demyelination. While the mechanism that regulates progression to HAM/TSP remains unclear, some authors have speculated that immune system activation and a high proviral load could play important roles (5, 12). A spontaneous proliferation of infected and uninfected cells, in addition to the increased production of proinflammatory cytokines (TNF, IFN- α , IL-6) and chemokines (CXCL-9 and CXCL-10) in peripheral blood and cerebrospinal fluid, has been observed in HAM/TSP in comparison to asymptomatic carriers (19, 20). In addition, Tregs are known to play a pivotal role in immunological tolerance and in the control of inflammatory responses (21). The expansion of Treg cells in other chronic and persistent viral infections, such as HIV and hepatitis C virus, has also been associated with suppressed CTL function (21, 22). In addition, it has been suggested that Treg-cells may also serve as a virus reservoir (18). Accordingly, it is possible that altered Treg function might contribute to the immunopathogenesis of HAM/TSP. The high frequency of Treg cells producing IL-10 seen herein may inhibit the function of cytotoxic CD8⁺ T-lymphocytes (CTL), thereby impairing the lysing of infected cells, which in turn serves to maintain an elevated proviral load. Indeed, a positive correlation between the frequency of CD4⁺IL-10⁺ Treg cells and proviral load in

individuals with HAM/TSP was found in the present study. It has been proposed that IL-10 poorly modulates the production of proinflammatory cytokines in HAM/TSP individuals, which could contribute to an exacerbated inflammatory response and tissue damage (22).

Conversely, Tregs expressing TGF- β were more frequent in HTLV-1-asymptomatic individuals. TGF- β exerts a potent antiproliferative effect on CD4⁺ T-cells, mainly by downregulating IL-2 production (23). It follows that, in asymptomatic HTLV-1-infected individuals, Tregs might downmodulate the inflammatory response via a balanced production of TGF- β and IL-10. This stands in contrast to the scenario observed in HAM/TSP as these cells produce more IL-10 and less TGF- β , which seems to lessen the suppressive effect on the clearance of the virus and reduces the control of the inflammatory response.

In summary, in HAM/TSP individuals, Tregs present dysregulated production of IL-10 and TGF- β , which may be implicated in the pathogenesis of HAM/TSP. Further studies should be conducted to more comprehensively assess the cytokine profiles in these cells in the cerebral spinal fluid.

Conflict of interest

The authors have no competing interests to declare.

Author contributions:

BGC and MFRG designed research; BRS, CGRS and LLG performed experiments; BGC and MFRG contributed new reagents/analytic tools; BRS, CGRS, LLG, BGC and MFRG analyzed data; and BRS, CGRS, LLG and MFRG wrote the paper. All authors approved the final version.

Acknowledgments

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. We thank Dr. Raymond Césarie for providing HTLV/Albumina clones, Ms. Raphaela Lisboa, Dr. Fred Luciano Santos and Mr. Noilson Lazaro for technical assistance. The authors would like to thank Andris K. Walter for English revision/editing services.

References

1. Gessain A, Vernant J, Maurs L, Barin F, Gout O, Calender Ad. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *The Lancet*. 1985;326(8452):407-10.
2. Mochizuki M, Watanabe T, Yamaguchi K, Takatsuki K, Yoshimura K, Shirao M, et al. HTLV-I uveitis: a distinct clinical entity caused by HTLV-I. *Jpn J Cancer Res*. 1992;83(3):236-9.
3. Murphy EL, Wang B, Sacher RA, Fridey J, Smith JW, Nass CC, et al. Respiratory and urinary tract infections, arthritis, and asthma associated with HTLV-I and HTLV-II infection. *Emerg Infect Dis*. 2004;10(1):109-16.
4. Honarbakhsh S, Taylor GP. High prevalence of bronchiectasis is linked to HTLV-1-associated inflammatory disease. *BMC infectious diseases*. 2015;15:258. Epub 2015/07/06.
5. Grassi MF, Olavarria VN, Kruschewsky Rde A, Mascarenhas RE, Dourado I, Correia LC, et al. Human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) proviral load of HTLV-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) patients according to new diagnostic criteria of HAM/TSP. *J Med Virol*. 2011;83(7):1269-74.
6. Olindo S, Lezin A, Cabre P, Merle H, Saint-Vil M, Edimonana Kaptue M, et al. HTLV-1 proviral load in peripheral blood mononuclear cells quantified in 100 HAM/TSP patients: a marker of disease progression. *J Neurol Sci*. 2005;237(1-2):53-9.
7. Nagai M, Usuku K, Matsumoto W, Kodama D, Takenouchi N, Moritoyo T, et al. Analysis of HTLV-I proviral load in 202 HAM/TSP patients and 243 asymptomatic HTLV-I carriers: high proviral load strongly predisposes to HAM/TSP. *J Neurovirol*. 1998;4(6):586-93.
8. Primo J, Siqueira I, Nascimento MC, Oliveira MF, Farre L, Carvalho EM, et al. High HTLV-1 proviral load, a marker for HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis, is also detected in patients with infective dermatitis associated with HTLV-1. *Braz J Med Biol Res*. 2009;42(8):761-4.
9. Richardson JH, Edwards AJ, Cruickshank JK, Rudge P, Dalgleish AG. In vivo cellular tropism of human T-cell leukemia virus type 1. *Journal of virology*. 1990;64(11):5682-7.
10. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003;299(5609):1057-61.
11. Kim H-J, Verbinnen B, Tang X, Lu L, Cantor H. Inhibition of follicular T-helper cells by CD8+ regulatory T cells is essential for self tolerance. *Nature*. 2010;467:328.
12. Mosley AJ, Asquith B, Bangham CR. Cell-mediated immune response to human T-lymphotropic virus type I. *Viral Immunol*. 2005;18(2):293-305.

13. Toulza F, Heaps A, Tanaka Y, Taylor GP, Bangham CR. High frequency of CD4⁺FoxP3⁺ cells in HTLV-1 infection: inverse correlation with HTLV-1-specific CTL response. *Blood*. 2008;111(10):5047-53.
14. Best I, Lopez G, Verdonck K, Gonzalez E, Tipismana M, Gotuzzo E, et al. IFN-gamma production in response to Tax 161-233, and frequency of CD4⁺ Foxp3⁺ and Lin HLA-DR^{high} CD123⁺ cells, discriminate HAM/TSP patients from asymptomatic HTLV-1-carriers in a Peruvian population. *Immunology*. 2009;128(1 Suppl):1365-2567.
15. Michaelsson J, Barbosa HM, Jordan KA, Chapman JM, Brunialti MK, Neto WK, et al. The frequency of CD127^{low} expressing CD4⁺CD25^{high} T regulatory cells is inversely correlated with human T lymphotropic virus type-1 (HTLV-1) proviral load in HTLV-1-infection and HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *BMC Immunol*. 2008;9(41):1471-2172.
16. Yamano Y, Takenouchi N, Li HC, Tomaru U, Yao K, Grant CW, et al. Virus-induced dysfunction of CD4⁺CD25⁺ T cells in patients with HTLV-I-associated neuroimmunological disease. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(5):1361-8.
17. Castro-Costa CMd. Tropical spastic paraparesis: a necessary re-definition. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*. 1996;54(1):131-5.
18. Satou Y, Utsunomiya A, Tanabe J, Nakagawa M, Nosaka K, Matsuoka M. HTLV-1 modulates the frequency and phenotype of FoxP3⁺CD4⁺ T cells in virus-infected individuals. *Retrovirology*. 2012;9(46):1742-4690.
19. Sato T, Coler-Reilly A, Utsunomiya A, Araya N, Yagishita N, Ando H, et al. CSF CXCL10, CXCL9, and neopterin as candidate prognostic biomarkers for HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *PLoS neglected tropical diseases*. 2013;7(10):e2479. Epub 2013/10/17.
20. Montanheiro PA, Penalva de Oliveira AC, Smid J, Fukumori LM, Olah I, da S Duarte AJ, et al. The elevated interferon gamma production is an important immunological marker in HAM/TSP pathogenesis. *Scand J Immunol*. 2009;70(4):403-7.
21. Mills KH. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nature reviews Immunology*. 2004;4(11):841-55.
22. Santos SB, Porto AF, Muniz AL, Luna T, Nascimento MC, Guerreiro JB, et al. Modulation of T cell responses in HTLV-1 carriers and in patients with myelopathy associated with HTLV-1. *Neuroimmunomodulation*. 2006;13(3):145-51.
23. Levings MK, Bacchetta R, Schulz U, Roncarolo MG. The role of IL-10 and TGF-beta in the differentiation and effector function of T regulatory cells. *International archives of allergy and immunology*. 2002;129(4):263-76. Epub 2002/12/17.

APÊNDICE 2 – Artigo: *Strongyloides stercoralis* hyperinfection in a patient with HTLV-1: a case report of an infection with rhabditoid and filarioid larvae, eggs and free-living adult female output Running head: *Strongyloides stercoralis* hyperinfection in a HTLV-1 patient

***Strongyloides stercoralis* hyperinfection in a patient with HTLV-1: a case report of an infection with rhabditoid and filarioid larvae, eggs and free-living adult female output**

Running head: *Strongyloides stercoralis* hyperinfection in a HTLV-1 patient

De Souza, Joelma Nascimento¹; Soares, Barbara Nascimento Rocha Ribeiro³; Goes, Luana Leandro³; Lima, Cintia de Souza¹; Barreto, Nilo Manoel Pereira Vieira¹; Gonçalves, Noilson²; Teixeira, Marcia Cristina Aquino¹; Galvão-Castro, Bernardo ²; Grassi, Maria Fernanda Rios²; Soares, Neci Matos^{1*}.

¹Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia (UFBA); ²Centro Integrativo e Multidisciplinar de atendimento ao portador de HTLV da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (CHTLV/EBMSP), Salvador, Bahia, Brazil; ³Laboratório de Saúde Pública (LASP), Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (Fiocruz), Salvador, Bahia, Brazil.

Key words: *Strongyloides stercoralis*; HTLV; free living female; IL-17

Word Count

- Abstract – 215 words
- Text – 1311 words

This manuscript has 2 figures and 1 table.

1 Abstract

2 *Strongyloides stercoralis* is the main etiological agent of human strongyloidiasis. Severe
3 strongyloidiasis is commonly associated to alcoholism, corticosteroid use and HTLV-1
4 coinfection. Herein, we report a case of a 13-yr-old boy coinfecting with *S. stercoralis* and
5 HTLV-1, excreting several parasitic forms in the stool. The parasitological examination of his
6 feces, showed a large amount of filariform (about 3,000 larvae per gram of feces) and
7 rhabditiform larvae (about 2,000 larvae per gram of feces). In addition, free-living adult
8 female (about 50 parasites per gram of feces) and eggs (about 60 eggs per gram of feces) were
9 detected. The main laboratory findings pointed to high IgE levels (228 UI/mL) and
10 eosinophilia (11.6%). The patient was treated with three courses of ivermectin (200 µg/Kg
11 twice, two weeks apart), achieving the parasitological cure. An increase of about 19 times in
12 IL-17 level was observed following the parasitological cure, in addition to a decrease in the
13 white blood cell, eosinophil counts and IgE levels. This is the first case report, to our
14 knowledge, in which *S. stercoralis* adult free-living female was described in human feces and
15 where an increase in IL-17 levels after *Strongyloides* treatment in a HTLV-1 coinfecting
16 individual was observed. This finding raises the need for further studies about IL-17
17 immunomodulation in *S. stercoralis* and HTLV-1 coinfecting patients.

18

19 Introduction

20 *Strongyloides stercoralis* is the main etiological agent of human strongyloidiasis¹. The
21 host can develop severe forms of strongyloidiasis, as hyperinfection and/or disseminated
22 disease, depending of alterations in the immune status and is commonly associated to
23 alcoholism, corticosteroid use and HTLV-1 coinfection².

24 Human T Cell Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1) is a retrovirus highly prevalent
25 in some areas of Japan, Papua New Guinea, South America and West Africa³. It is transmitted
26 through mother-to-child (mainly through breastfeeding), sexual intercourse, blood
27 transfusions, contaminated blood products and by needle sharing⁴. Infected individuals are at
28 risk of developing a rapidly progressive malignancy, adult T-cell leukemia (ATL), and a
29 debilitating and sometimes fatal neurologic condition, myelopathy/tropical spastic paraparesis
30 (HAM/TSP)⁴. Moreover, HTLV-1 acts to reduce the ability of the infected host to develop an
31 adequate immune response to organisms that require a T-helper 2 (Th2) response^{5,6}. This
32 phenomenon is likely to be associated with an elevation in the inflammatory and regulatory
33 cytokine levels⁷. As a result, patients infected with HTLV exhibit increased susceptibility to
34 infection with *S. stercoralis* and progression to severe forms of strongyloidiasis. Herein, we
35 describe a case report of an individual coinfecting with *S. stercoralis* and HTLV-1, excreting
36 several parasitic forms in the stool.

37

38 **Case report**

39 The patient, a 13-yr-old boy, lives with his 16 membered family in a precarious rural
40 settlement, in the Baía de Camamú, located 300 Km of Salvador (Bahia, Brazil). His mother
41 was diagnosed with HAM/TSP in July, 2013 and has been treated at the Reference Center for
42 HTLV. Subsequently, an active search was conducted in the settlement for evaluating the
43 family (May, 2015). The family lived in a precarious condition with an outside adapted
44 kitchen and no bathroom, sewage or potable water. The peridomicile was used for bodily
45 functions. Blood and feces samples were collected from 14 individuals (except for two
46 children under two years old). Thirteen members of the family were tested positive to HTLV-
47 1 by ELISA and confirmed by Western Blotting.

48 The 13-year-old boy reported alternating diarrhea and intestinal constipation, in
49 addition to abdominal pain and dyspnea. He was in a regular general condition, his height and
50 weight were compatible with age. The main laboratory findings were as follows: white blood
51 cell count of 6,100/ μ L (neutrophils: 28.4%, lymphocytes: 50.6%, eosinophils: 11.6%),
52 hemoglobin of 13.9 g/dL, platelet count of 2.2×10^4 / μ L and total IgE of 228 UI/mL. The
53 patient tested negative for hepatitis, Chagas' disease, syphilis and HIV serologies.

54 The parasitological examination was performed using Baermann-Moraes⁸,
55 spontaneous sedimentation and agar plate culture methods. It showed a large amount of
56 filariform (about 3,000 larvae/gram of feces) and rhabditiform larvae (about 2,000
57 larvae/gram of feces). Free-living adult female (about 50 parasites/gram of feces) identified as
58 presenting rhabdoid esophagus, uterus filled with eggs and vulva, about one micrometer wide,
59 were also found in the direct smear. In addition, *Strongyloides*-like eggs (about 60 /gram of
60 feces) (Figure 2), and eggs of *Ascaris lumbricoides* and *Trichuris trichiura* were present. The
61 boy was then diagnosed with *S. stercoralis* hyperinfection as a manifestation of HTLV-1. He
62 was then treated with ivermectin 200 μ g/Kg (twice, two weeks apart), and albendazole 600
63 mg (single dose).

64 After two months of treatment (July, 2015), he no longer complained of dyspnea. The
65 parasitological examination of feces revealed a large amount of *S. stercoralis* rhabditiform
66 and filariform larvae (above 1,000 larvae/ gram of feaces). The patient then was treated with a
67 new course of ivermectin and Albendazol, at the same therapeutic regimen.

68 One year later (July, 2016), a new parasitological examination was performed and a
69 large amount of *S. stercoralis* larvae, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, Hookworm
70 and *Enterobius vermicularis* eggs as well as *Endolimax nana* cysts was present in feces. A
71 new course of ivermectin and albendazole was given, at the same regimen. Parasitological

72 examinations of feces performed in October, 2016 and November, 2017 showed no parasites,
73 indicating the parasitological cure (Figure 1).

74 The levels of cytokines in sera were measured by Cytometric Bead Array (CBA)
75 during *S. stercoralis* infection (mean of the three points before cure), and following the
76 parasitological cure in October, 2016. Th1 (IL-2, IL-6 and INF- γ), Th-2 (IL-4) and Treg (IL-
77 10 and TNF- α) cytokine levels were similar before and after parasitological cure. IL-17 level
78 presented a nineteen fold elevation following parasitological cure (Table 1). In addition, a
79 decrease in the white blood cell and eosinophil counts as well as in the total and specific IgE
80 and specific IgG1 levels were observed after parasitological cure (Table 1).

81 The Committee of Ethics in Research of the Nursing School, Federal University of
82 Bahia, Brazil, approved the study and a written informed consent for this case report
83 publication was assigned by the child legal guardian.

84

85 **Discussion**

86 The case reported herein presents a typical *S. stercoralis* hyperinfection syndrome,
87 with a high parasite load, gastrointestinal and pulmonary symptoms, in a HTLV-1 coinfecting
88 individual. However, a very unusual presentation appeared when filariform larvae, eggs and
89 free-living adult female in feces were found. Indeed, this is the first case report, to our
90 knowledge, presenting *S. stercoralis* free-living adult females in human stool. The presence of
91 a free-living form in the individual feces is probably due to the intestinal constipation and
92 could indicate that both parthenogenetic and sexual reproduction may be occurring in the
93 host, which could enhance the parasite load, as was observed in the infected individual before
94 the treatment.

95 HTLV-1 induces a spontaneous cell proliferation, generating an exacerbated Th1
96 response, with high levels of INF- γ , TNF- β , and IL-2, along with a decline in IL-4, IL-5, and
97 IL-10 production, which could leave the coinfecting host more susceptible to severe
98 strongyloidiasis^{9,10}. Although, increased IgE levels and a high eosinophil count have been
99 associated with the host immune response against *S. stercoralis*, they are usually decreased in
100 coinfecting *S. stercoralis* and HTLV-1 individuals^{6,9,11-13}. However, in this case report, the
101 levels of Th1, Th2 and Treg cytokines were similar before and after the parasitological cure.
102 Along with the elevated IgE levels and eosinophils count before the treatment, it may indicate
103 a T-cell balance and preserved immune response, which could prevent *Strongyloides*
104 dissemination to other organs and a fatal outcome.

105 IL-17 is a pro-inflammatory cytokine associated with the induction and maintenance
106 of inflammation, resulting in the recruitment of neutrophils to the tissue¹⁴. HTLV-1 tax
107 protein induces IL-17 gene expression in HTLV-1 infected T-cell lines, which could
108 contribute to the pathogenesis of neurological disease related to HTLV-1 infection¹⁵⁻¹⁷. On
109 the other hand, in *S. stercoralis* infection, CD4+ Th17 cells frequency are decreased in an Ag-
110 specific manner¹⁸. In this case report, an increase in IL-17 level following strongyloidiasis
111 treatment in a HTLV-1 coinfecting individual was observed for the first time, to our
112 knowledge, which could reflect an inhibition of HTLV-1 inflammation response by
113 *Strongyloides*. This could indicate a protection against inflammatory complications caused by
114 HTLV-1, like HAM/TSP. This finding raises the need for further studies.

115 The recommended treatment for *Strongyloides* hyperinfection syndrome is ivermectin
116 200 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ in two doses, two weeks apart¹⁹⁻²³. However, studies reported successive failure in
117 the treatment of patients coinfecting with HTLV-1²⁴. In the current case, the patient was
118 treated three times with ivermectin before achieving a parasitological cure. Since the patient
119 lived in a high-risk condition – without basic sanitation, and with the habit of walking

120 barefoot – it is difficult to establish whether there was a treatment failure or a reinfection. In
121 addition to the absence of larvae in the feces, after the last treatment, a decrease in specific
122 IgG1 and IgE levels was observed, which could indicate a reduction and/or elimination of the
123 parasite. In summary, this is the first case report, to our knowledge, where it was possible to
124 observe an adult free-living female elimination in human feces and where an increase in IL-17
125 levels following *Strongyloides* treatment was observed in a HTLV-1 coinfecting patient.

126 **Acknowledgments**

127 This work was supported by Ministério da Saúde/Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado
128 da Bahia (PPSUS/FAPESB), Brazil.

129

130 **Co-Authors Contact Information**

131 Joelma Nascimento de Souza

132 Institution: Universidade Federal da Bahia

133 E-mail address: joelmandesouza@gmail.com

134

135 Barbara Nascimento Rocha Ribeiro Soares

136 Institution: Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (Fiocruz)

137 E-mail address: barbarasoares@bahiana.edu.br

138

139 Luana Leandro Goes

140 Institution: Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (Fiocruz)

- 141 E-mail address: lualeandro1@hotmail.com
- 142
- 143 Cintia de Souza Lima
- 144 Institution: Universidade Federal da Bahia
- 145 E-mail address: cintia.lima@bol.com.br
- 146
- 147 Nilo Manoel Barreto
- 148 Institution: Universidade Federal da Bahia
- 149 E-mail address: nilomanoel@gmail.com
- 150
- 151 Noilson Gonçalves
- 152 Institution: Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP)
- 153 E-mail address: noilsonlazarobahiana.edu.br
- 154
- 155 Marcia Cristina Aquino Teixeira
- 156 Institution: Universidade Federal da Bahia
- 157 E-mail address: marciaquino2009@hotmail.com
- 158
- 159 Bernardo Galvão-Castro

160 Institution: Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP)

161 E-mail address: bgalvao@bahiana.edu.br

162

163 Maria Fernanda Rios Grassi

164 Institution: Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (Fiocruz)

165 E-mail address: grassi@bahia.fiocruz.br

REFERENCES

1. Nutman TB, 2017. Human infection with *Strongyloides stercoralis* and other related *Strongyloides* species. *Parasitology* 144: 263-273.
2. De Souza JN, Machado PR, Teixeira MC, Soares NM, 2014. Recurrence of *Strongyloides stercoralis* infection in a patient with Hansen's disease: a case report. *Lepr Rev* 85: 58-62.
3. Zammarchi L, Montagnani F, Tordini G, Gotuzzo E, Bisoffi Z, Bartoloni A, Luca AD, 2015. Persistent Strongyloidiasis Complicated by Recurrent Meningitis in an HTLV Seropositive Peruvian Migrant Resettled in Italy. *Am J Trop Med Hyg* 92: 1257-1260.
4. Willems L et al, 2017. Reducing the global burden of HTLV-1 infection: An agenda for research and action. *Antiviral Res* 137: 41-48.
5. Carvalho EM, Porto A da F, 2004. Epidemiological and clinical interaction between HTLV-1 and *Strongyloides stercoralis*. *Parasite Immunol* 26: 487-497.
6. Porto MAF, Muniz A, Oliveira Júnior J, Carvalho EM, 2002. Clinical and immunological consequences of the association between HTLV-1 and strongyloidiasis. *Rev Soc Bras Med Trop* 35: 641-649.
7. Cabral AC, Iñiguez AM, Moreno T, Bóia MN, Carvalho-Costa FA, Cabral AC, Iñiguez AM, Moreno T, Bóia MN, Carvalho-Costa FA, 2015. Clinical conditions associated with intestinal strongyloidiasis in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 48: 321-325.
8. Silva MLS, de J. Inês E, da S. Souza AB, dos S. Dias VM, Guimarães CM, Menezes ER, Barbosa LG, Del Carmen M. Alves M, Teixeira MCA, Soares NM, 2016. Association between *Strongyloides stercoralis* infection and cortisol secretion in alcoholic patients. *Acta Trop* 154: 133-138.
10. Porto AF, Neva FA, Bittencourt H, Lisboa W, Thompson R, Alcântara L, Carvalho EM, 2001. HTLV-1 decreases Th2 type of immune response in patients with strongyloidiasis. *Parasite Immunol* 23: 503-507.
11. Weatherhead JE, Mejia R, 2014. Immune Response to Infection with *Strongyloides stercoralis* in Patients with Infection and Hyperinfection. *Curr Trop Med Rep* 1: 229-233.

12. de Souza JN, Teixeira MCA, Soares NM, 2015. Associação entre hiperinfecção por *Strongyloides stercoralis* e HTLV-1: um relato de caso. Rev Ciênc Médicas E Biológicas 13: 427-430.
13. Negrão-Corrêa D, 2001. Importance of immunoglobulin E (IgE) in the protective mechanism against gastrointestinal nematode infection: looking at the intestinal mucosae. Rev Inst Med Trop São Paulo 43: 291-299.
14. Silva MLS, Inês EJ, Souza JN, Souza ABS, Dias VMS, Oliveira LN, Guimarães CM, Menezes ER, Barbosa LG, Alves MCM, Teixeira MCA, Soares NM, 2017. Influence of parasite load on the diagnosis and occurrence of eosinophilia in alcoholic patients infected with *Strongyloides stercoralis*. J Helminthol November: 1-5.
15. Domingos JA, Soares LS, Bandeira LM, Bonin CM, Vicente ACP, Zanella L, Puga MAM, Tozetti IA, Motta-Castro ARC, Cunha RV, 2017. Cytokine profile and proviral load among Japanese immigrants and non-Japanese infected with HTLV-1 in a non-endemic area of Brazil. PLOS ONE 12: e0174869.
16. Dodon MD, Li Z, Hamaia S, Gazzolo L, 2004. Tax protein of human T-cell leukaemia virus type 1 induces interleukin 17 gene expression in T cells. J Gen Virol 85:1921-1932.
17. Santos SB, Oliveira P, Luna T, Souza A, Nascimento M, Siqueira I, Tanajura D, Muniz AL, Glesby MJ, Carvalho EM, 2012. Immunological and viral features in patients with overactive bladder associated with human T-cell lymphotropic virus type 1 infection. J Med Virol 84: 1809-1817.
18. Leal FE et al, 2013. Expansion in CD39⁺ CD4⁺ immunoregulatory t cells and rarity of Th17 cells in HTLV-1 infected patients is associated with neurological complications. PLoS Negl Trop Dis 7:e2028.
19. Anuradha R, Munisankar S, Dolla C, Kumaran P, Nutman TB, Babu S, 2015. Parasite Antigen-Specific Regulation of Th1, Th2, and Th17 Responses in *Strongyloides stercoralis* Infection. J Immunol 195: 2241-2250.
20. Barrett J, Broderick C, Soulsby H, Wade P, Newsholme W, 2016. Subcutaneous ivermectin use in the treatment of severe *Strongyloides stercoralis* infection: two case reports and a discussion of the literature. J Antimicrob Chemother 71: 220-225.

21. Bisoffi Z, Buonfrate D, Angheben A, Boscolo M, Anselmi M, Marocco S, Monteiro G, Gobbo M, Bisoffi G, Gobbi F, 2011. Randomized Clinical Trial on Ivermectin versus Thiabendazole for the Treatment of Strongyloidiasis. *PLoS Negl Trop Dis* 5: e1254.
22. Suputtamongkol Y, Premasathian N, Bhumimuang K, Waywa D, Nilganuwong S, Karuphong E, Anekthananon T, Wanachiwanawin D, Silpasakorn S, 2011. Efficacy and Safety of Single and Double Doses of Ivermectin versus 7-Day High Dose Albendazole for Chronic Strongyloidiasis. *PLoS Negl Trop Dis* 5.
23. Zaha O, Hirata T, Kinjo F, Saito A, Fukuhara H, 2002. Efficacy of ivermectin for chronic strongyloidiasis: two single doses given 2 weeks apart. *J Infect Chemother* 8: 94-98.
24. Zaha O, Hirata T, Uchima N, Kinjo F, Saito A, 2004. Comparison of anthelmintic effects of two doses of ivermectin on intestinal strongyloidiasis in patients negative or positive for anti-HTLV-1 antibody. *J Infect Chemother* 10: 348-351.
25. Kinjo T, Nabeya D, Nakamura H, Haranaga S, Hirata T, Nakamoto T, Atsumi E, Fuchigami T, Aoki Y, Fujita J, 2015. Acute respiratory distress syndrome due to *Strongyloides stercoralis* infection in a patient with cervical cancer. *Intern Med Tokyo Jpn* 54: 83-87.

Figure 1. A timeline of parasitological examination and treatment course of a 13-year-old boy with *Strongyloides stercoralis* hyperinfection as a manifestation of HTLV-1.

Figure 2. Photomicrographies of *Strongyloides stercoralis* stages in fecal smear stained with iodine showing rhabditiform and filariform larva (A), rhabditiform oesophagus (B) and uterus with eggs (C) of a free-living female, and an embrionated egg (D).

ANEXO

Anexo 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Projeto de Investigação:

Biomarcadores imunológicos no monitoramento da infecção pelo HTLV-1

Pesquisadores Responsáveis: Dra Maria Fernanda Rios Grassi

Médico Responsável: Dr. Bernardo Galvão

Prezado paciente:

O Sr(a) está sendo convidado para participar desta pesquisa que pretende verificar se pacientes infectados pelo HTLV apresentam alguma diferença na atividade das células do sangue. A infecção pelo vírus chamado HTLV-1 pode causar dois tipos de doença: uma leucemia (câncer de glóbulos brancos do sangue) ou uma doença do sistema nervoso, que causa paralisia, porém muitas pessoas não apresentam nenhuma doença. Este estudo pretende buscar diferenças nos exames das pessoas que são infectadas por esse vírus e tem manifestações diferentes (tem doença ou não tem nenhum sintoma). Nesse sentido, acreditamos que esse estudo poderá ser contribuir para que no futuro os pacientes possam ser tratados antes de manifestarem a doença.

Para que isso seja possível realizar esta pesquisa pedimos a doação de uma amostra de sangue para realizar exames de laboratório, sorologia (HIV, vírus das hepatites C e B) e para ensaios de pesquisa das células de defesa. Essas amostras serão obtidas no momento em que exames de sangue forem necessários para o seu próprio acompanhamento clínico. Aproveitaremos o pedido de coleta de sangue para o exame de rotina, e solicitaremos ao laboratório que retire um pouco a mais (25ml, cerca de 5 colheres de sopa) para esta pesquisa. Esta doação ocorrerá apenas uma vez. Assim sendo, o número de vezes que o sangue será retirado não será maior do que o realmente necessário para o acompanhamento de rotina e não será necessário vir ao Centro médico apenas com o objetivo de participar da pesquisa.

A coleta de sangue será realizada por um profissional treinado, entretanto pode ocorrer uma dor ligeira e um pequeno sangramento no local da picada, ficando o braço roxo. Esta mancha desaparece dentro de 1 a 2 dias. Será realizada igualmente a coleta do líquido da coluna por um médico experiente. Para o exame, o Sr (a) estará deitado (a) de lado, com o pescoço para baixo e as pernas encolhidas. O médico limpa a coluna e anestesia o local e coloca a agulha de punção entre a quarta e a quinta

vértebras lombares. O líquido drenado é colocado nos tubos de ensaio e enviado para o laboratório para análise. Após o exame, o médico comprime o local com as mãos e coloca um bandaid. Depois do exame a pessoa pode ter dor de cabeça, 12 horas a 2 dias depois. Pode haver também dor na nuca e coluna, dormência nas pernas, rigidez do pescoço, vômitos e náuseas, visão turva, tonturas, vertigem ou zumbido. TODOS esses sintomas melhoram com medidas simples como ficar em deitar e beber muito líquido. Este exame só será realizado se o médico detectar alterações no sistema nervoso que precise ser diagnosticada com este exame.

A sua participação neste estudo é voluntária e espontânea. A sua assistência médica não será modificada em função da sua aceitação ou não em participar deste estudo. Também não envolverá nenhum custo adicional. Caso necessite regressar ao hospital por razões ligadas ao estudo, suas despesas com transporte e alimentação serão pagas pelos responsáveis pela pesquisa.

Além disso, você poderá desistir de participar a qualquer momento sem que isto interfira no tratamento futuro neste hospital. O material obtido de sua amostra de sangue (plasma e células) será utilizado apenas neste estudo. Toda a informação obtida ou disponibilizada neste estudo será considerada como sigilosa de modo a garantir confidencialidade e não será divulgada sem a sua permissão.

Para que outros médicos possam no futuro ampliar seus conhecimentos sobre esta doença, gostaríamos de mostrar os resultados obtidos neste projeto em congressos (pôster ou apresentação oral) e em publicações em revistas científicas.

Por outro lado, nos comprometemos a não dizer seu nome e a utilizar os resultados obtidos apenas com finalidade científica.

A equipe de pesquisadores (Dr Bernardo Galvão, Dra Fernanda Grassi) está disponível a qualquer momento para qualquer esclarecimento no número 3176-2213.

Caso queira, o Sr (a) poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisas da Fiocruz pelo telefone 3176-2285.

Eu _____ aceito fazer parte do grupo de estudo
“Biomarcadores imunológicos no monitoramento da infecção pelo HTLV-1”

Recebi todas as orientações sobre este trabalho. Entendi o propósito do estudo, e compreendo que o objetivo deste estudo é uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na infecção causada pelo vírus HTLV-1. Sei que este trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana.

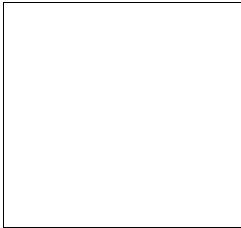
Estou recebendo uma cópia deste documento datada e assinada, e não estou abdicando de nenhum dos meus direitos legais.

Salvador, ____ / ____ / ____.

Assinatura: _____

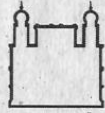
Assinatura da

Testemunha: _____



Impressão datiloscópica

Anexo 2 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
 Fundação Oswaldo Cruz
 Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

Comitê de Ética em Pesquisas



Comitê de Ética em Pesquisa – CPqGM/FIOCRUZ

PARECER Nº 207/2009

Protocolo: 309

Projeto de Pesquisa: “**Biomarcadores imunológicos no monitoramento da infecção pelo HTLV-1**”.

Pesquisador(a) Responsável: **Dr^a Maria Fernanda Rios Grassi**

Instituição ou Departamento: **LASP/CPqGM-FIOCRUZ**

Considerações:

Após análise ética do projeto e realização dos esclarecimentos solicitados ao responsável, o CEP considera que o projeto atende aos princípios éticos de autonomia, beneficência, não maleficência, equidade e justiça.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisas do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (CEP-CPqGM/FIOCRUZ), conforme atribuições conferidas pela CONEP/CNS/MS (Carta Doc.32-04/97), com base na Resolução 196/96 e suas complementares, julga **aprovado** o projeto supracitado.

O CEP/CPqGM-FIOCRUZ especifica, abaixo, o período de vigência, bem como, determina as datas para o envio dos relatórios semestral e final, referentes ao desenvolvimento do protocolo de pesquisa aprovado.

Vigência: **06/11/2009 a 06/11/2011**

Envio de Relatório Anual em: **06/11/2010**

Relatório Final: **06/12/2011**

*The present study, entitled “**Biomarcadores imunológicos no monitoramento da infecção pelo HTLV-1**” (protocol number 309) has been approved by the Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - FIOCRUZ (IORG00002090 / IRB000026120) in November 6th 2009 meeting. The protocol and procedures presented in the project are in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human subject (institutional) and with the Helsinki Declaration of 1964, as revised in 2008. In the present version, this project is licensed and valid until November 6th 2011.*

Salvador, 06 de novembro de 2009.

Dr^a Claudia Ida Brodskyn

Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
 CPqGM/FIOCRUZ
 IORG-0002090 / IRB-00002612