

Anderson Santos da Rocha

**AVALIAÇÃO LONGITUDINAL DOS ANTICORPOS ANTI-TAX EM INDIVÍDUOS  
ASSINTOMÁTICOS E SINTOMÁTICOS PORTADORES DO HTLV-1**

Belo Horizonte

2024

Anderson Santos da Rocha

**AVALIAÇÃO LONGITUDINAL DOS ANTICORPOS ANTI-TAX EM INDIVÍDUOS  
ASSINTOMÁTICOS E SINTOMÁTICOS PORTADORES DO HTLV-1**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Edel Figueiredo  
Barbosa Stancioli

Co-orientadora: Dr<sup>a</sup>. Marina Lobato Martins

Belo Horizonte  
2024

043

Rocha, Anderson Santos da.

Avaliação longitudinal dos anticorpos anti-tax em indivíduos assintomáticos e sintomáticos portadores do HTLV-1 [manuscrito] / Anderson Santos da Rocha. – 2024.

130 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa . Dr<sup>a</sup>. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli. Co-orientadora: Dr<sup>a</sup>. Marina Lobato Martins.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Genes pX. 3. Anticorpos Anti-HTLV-I. 4. Ensaio de Imunoadsorção Enzimática. I. Stancioli, Edel Figueiredo Barbosa. II. Oliveira, Marina Lobato Martins. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

## ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE **ANDERSON SANTOS DA ROCHA**

Nº REGISTRO: **2022660077**

Às 14:30 horas do dia **27 de março de 2024**, reuniu-se, presencialmente no Centro de Atividades Didáticas (CAD 1), a Comissão Examinadora composta pelas Dras. Thaís de Fátima Silva Moraes (Pós-doutoranda do Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Maria Clara Fernandes da Silva Malta (HEMOMINAS), Profa. Dra. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli (Orientadora) e Dra Marina Lobato Martins Oliveira (Coorientadora), para julgar o trabalho final "**Avaliação longitudinal dos anticorpos anti-Tax em indivíduos assintomáticos e sintomáticos portadores do HTLV-1**", do aluno **Anderson Santos da Rocha**, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, a Presidenta da Comissão, Profa. Dra. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli - Orientadora, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. O candidato foi considerado **APROVADO**. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidenta da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidenta encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. O candidato tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da dissertação ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Belo Horizonte, 27 de março de 2024

Membros da banca:

Dra. Thaís de Fátima Silva Moraes

Dra. Maria Clara Fernandes da Silva Malta

De acordo:

Profa. Dra. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli  
(Orientador)

Dra Marina Lobato Martins Oliveira  
(Coorientadora)

Prof. Dr. Daniel de Assis Santos  
(Coordenador do Programa de Pós-graduação  
em Microbiologia)



Documento assinado eletronicamente por **Daniel de Assis Santos, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 28/03/2024, às 10:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marina Lobato Martins de Oliveira, Usuário Externo**, em 31/03/2024, às 15:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thais de Fatima Silva Moraes, Usuária Externa**, em 01/04/2024, às 13:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Edel Figueiredo Barbosa Stancioli, Professora do Magistério Superior**, em 01/04/2024, às 18:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Clara Fernandes da Silva Malta, Usuária Externa**, em 02/04/2024, às 14:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3123729** e o código CRC **6692D95C**.

## **AGRADECIMENTOS**

Meu primeiro agradecimento vai para as pessoas que são as mais relevantes, em minha opinião, para o propósito deste trabalho: aquelas que vivem com o HTLV-1 e a todos os voluntários do GIPH. Agradeço sinceramente por me proporcionarem a oportunidade de cultivar empatia e alcançar um nível mínimo de compreensão ao enfrentar uma doença tão negligenciada e que causa tanta dor e sofrimento às famílias. Tenho a esperança de que este trabalho, assim como todos os esforços do nosso grupo, possa oferecer algum conforto ao mostrar que não estão solitários nesta luta.

Agradeço a essa caminhada, tal como ela se desdobrou, com todos os avanços e percalços. Hoje, sou muito grato a essa experiência, a tudo que vivi e a todas as pessoas que conheci.

Tenho muita gratidão a todos os professores que fizeram parte da minha jornada acadêmica. Dedico um agradecimento especial aos professores da UFMG que lutam com seus alunos diariamente na construção do conhecimento científico. Especialmente minha orientadora, Edel, cujos ensinamentos transcenderam a sala de aula marcando a vida de muitos estudantes, uma grande mestra para a vida.

Agradeço também a minha co-orientadora Marina, por ter nos ajudado e participado desse trabalho e também pelo incentivo. E a todos os funcionários, voluntários e doadores da Fundação HEMOMINAS.

Agradeço à Gaby, por ter me ajudado em todos os momentos possíveis, pela amizade e companhia. Obrigado por tudo que compartilhamos.

Aos professores do departamento de Microbiologia, em especial ao Flávio e Jordana pelas discussões e apoio à equipe do Laboratório de Virologia Básica e Aplicada. Agradeço também aos funcionários do departamento, principalmente os da secretaria de Pós-graduação.

Agradeço aos meus amigos e colegas do LVBA, da equipe antiga à equipe nova, pela amizade, os momentos de descontração e desabaços. Em especial à Laura e Thaiza, pelas discussões e conversas sobre o HTLV.

A minha família e meus amigos do departamento de Genética, Ecologia e Evolução por me apoiarem na pós-graduação, pelo incentivo e carinho. Bem como, todos os colegas funcionários do ICB e UFMG que mantém a estrutura para pesquisa.

Aos órgãos de fomento por terem permitido que esse trabalho fosse desenvolvido, CNPq, CAPES e FAPEMIG.

Ao SUS e a todas as redes de pesquisadores, médicos, funcionários e voluntários que apoiam a luta pelo controle da infecção pelo HTLV.

## RESUMO

A infecção pelo *Human T-lymphotropic virus 1* (HTLV-1) está associada à Mielopatia Associada ao HTLV/Paraparesia Espástica Tropical associada ao HTLV (HAM/TSP), que afeta entre 5% a 10% dos portadores. As proteínas Tax e HBZ desempenham um papel importante no contexto da patogênese de HAM/TSP a partir da indução da proliferação celular e resposta dos linfócitos T citotóxicos. Os anticorpos anti-Tax estão associados ao risco de transmissão e desenvolvimento de patologias neoplásicas, sendo poucos os estudos que mostram associação desses anticorpos com outras comorbidades. O presente estudo teve por objetivo avaliar a resposta IgG, IgG1 e IgM anti-Tax no soro de portadores do HTLV-1 ao longo do tempo. As amostras foram provenientes de candidatos a doação de sangue, diagnosticados e acompanhados pela equipe multidisciplinar da coorte GIPH (Grupo Interdisciplinar de Pesquisa em HTLV), permanecendo eles assintomáticos (AS, n=78), com o diagnóstico de HAM/TSP ao longo do estudo – HAM incidente (iHAM, n=6) ou com HAM/TSP já estabelecida (n=10). Foram desenvolvidos três ELISAs indiretos para avaliação de cada anticorpo utilizando como antígeno a porção C-terminal de Tax expressada em vetor procarioto. A resposta IgG, IgG1 e IgM anti-Tax foi observada em 52,56% / 44,87% / 43,58% dos AS; 100%, 83,3% / 83,3% dos pacientes iHAM e 90% / 80% / 80% / dos pacientes com HAM/TSP, respectivamente. Em relação à reatividade anti-Tax houve diferença estatisticamente significativa entre AS e HAM/TSP ( $p=0,002$ ,  $p=0,016$  e  $p=0,024$ ) para IgG, IgG1 e IgM, respectivamente. Somente a IgG apontou diferença entre o grupo AS e iHAM assintomático e com HAM/TSP estabelecida ( $p=0,0015$  e  $p=0,006$ , respectivamente). Houve uma associação da reatividade anti-Tax medida por IgG, IgG1 e IgM com o sexo feminino ( $p=0,012$ ,  $p=0,017$  e  $p=0,019$ , respectivamente) e IgG com a carga proviral ( $p=0,025$ ), mas não com a idade dos pacientes. Importante destacar que o nível dos anticorpos avaliados permaneceu estável ao longo do acompanhamento, sendo maior no grupo de HAM/TSP e iHAM em comparação aos portadores assintomáticos, com baixo coeficiente de variação intraindividual. Ao se avaliar somente os AS, não se encontrou relação entre a frequência de sintomas com a reatividade anti-Tax para as três imunoglobulinas. Destaca-se que nas mulheres a presença de sinais e sintomas foi mais alta naquelas apresentando reatividade anti-Tax comparada àquelas que não apresentaram. Os dados em conjunto permitem hipotetizar que a resposta humoral contra a proteína Tax pode ser utilizada como um marcador prognóstico, juntamente com aqueles já classicamente apontados, e apontam uma relação entre o nível da resposta anti-Tax e o risco de desenvolvimento da HAM/TSP.

**Palavras-chave:** anti-Tax, ELISA, anticorpos, acompanhamento

## ABSTRACT

*Human T-lymphotropic virus 1* (HTLV-1) infection is associated with HTLV-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP), which affects approximately 5% of carriers. Despite the pathogenesis of HAM/TSP not being fully elucidated, the proteins Tax and HBZ play an important role in the process by inducing cell proliferation and affecting the response of cytotoxic T lymphocytes. Anti-Tax antibodies are associated with the risk of transmission and development of neoplastic pathologies, with few studies showing an association of these antibodies with other comorbidities. Thus, the present study aimed to evaluate the IgG, IgG1, and IgM anti-Tax response in the serum of HTLV-1 carriers. Samples were obtained from blood donor candidates diagnosed and monitored by the multidisciplinary team of the GIPH cohort (HTLV Interdisciplinary HTLV Research Group), including asymptomatic carriers (AS, n=78), those diagnosed with HAM/TSP during the study – incident HAM (iHAM, n=6), or enrolled in the study with established HAM/TSP (n=10). Three indirect ELISAs were developed to assess each antibody using the C-terminal portion of Tax expressed in a prokaryotic vector as the antigen. The IgG, IgG1 and IgM anti-Tax response was observed in 52.56% / 44.87% / 43.58% of AS carriers; 100%, 83.3% / 83.3% of iHAM patients and 90% / 80% / 80% of HAM/TSP patients, respectively. With regard to anti-Tax reactivity, there was a statistically significant difference between AS and HAM/TSP ( $p=0.002$ ,  $p=0.016$  and  $p=0.024$ ) for IgG, IgG1 and IgM, respectively. However, only IgG showed a difference between the AS group and asymptomatic iHAM and those with established HAM/TSP ( $p=0.005$  and  $p=0.006$ , respectively). There was an association between anti-Tax reactivity measured by IgG, IgG1 and IgM with female gender ( $p=0.012$ ,  $p=0.017$  and  $p=0.019$ , respectively) and IgG with proviral load ( $p=0.025$ ), but not with patient age. The level of the antibodies evaluated remained stable throughout follow-up, being higher in the HAM/TSP and iHAM group than in asymptomatic carriers, with a low intra-individual coefficient of variation. When evaluating AS alone, no relationship was found between the frequency of symptoms and anti-Tax reactivity for the three immunoglobulins. It is noteworthy that in women, the presence of signs and symptoms was higher in those with anti-Tax reactivity compared to those without. Taken together, these data allow us to hypothesize that the humoral response against the Tax protein can be used as a prognostic marker, along with those already classically pointed out, and indicate a relationship between the level of anti-Tax response and the risk of developing HAM/TSP.

**Keywords:** anti-Tax, ELISA, antibodies, follow-up

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Distribuição geográfica mundial dos focos de infecção por HTLV-1.....	18
FIGURA 2- Prevalência estimada do HTLV-1/2 no Brasil .....	21
FIGURA 3- Estrutura esquemática da partícula viral do HTLV-1/2 .....	22
FIGURA 4- Organização genômica do HTLV-1.....	23
FIGURA 5- Região esquemática da região pX do HTLV-1, mostrando as proteínas codificadas pelas ORFs I ao IV .....	24
FIGURA 6- Domínios estruturais e funcionais da proteína Tax .....	27
FIGURA 7- Etapas da multiplicação viral .....	32
FIGURA 8- Formas de transmissão célula-célula do HTLV-1 .....	34
FIGURA 9- Possíveis mecanismos para o desenvolvimento da HAM/TSP .....	39
FIGURA 10- Representação esquemática do vetor utilizado para a expressão da proteína Tax e caracterização do vetor .....	52
FIGURA 11- Sequência proteica da Tax C-terminal .....	61
FIGURA 12- Perfil Hidrofóbico da proteína recombinante Tax C-terminal. ....	62
FIGURA 13- Ausência de região transmembrana da proteína recombinante Tax C-terminal .....	62
FIGURA 14- Restrição do plasmídeo pET21-a(+).....	63
FIGURA 15- Produção da Tax recombinante em <i>Escherichia coli</i> . ....	64
FIGURA 16- Otimização da Expressão .....	64
FIGURA 17- Ensaio de Solubilidade da proteína Tax recombinante.....	65
FIGURA 18- Purificação da Proteína Tax recombinante .....	67
FIGURA 19- Reatividade da proteína por WB .....	68
FIGURA 20- Padronização da fase sólida do teste de ELISA usando a proteína Tax recombinante .....	69
FIGURA 21- Padronização do bloqueio e diluições para IgG .....	70
FIGURA 22- Padronização do bloqueio e diluições para IgG1 .....	70
FIGURA 23- Padronização do ELISA para IgM .....	71

FIGURA 24- Curva ROC .....	72
FIGURA 25- Avaliação da resposta IgG anti-Tax.....	73
FIGURA 26- Avaliação da resposta IgM anti-Tax .....	74
FIGURA 27- Avaliação da resposta IgG1 anti-Tax .....	76
FIGURA 28- Reatividade anti-Tax de acordo com o sexo.....	78
FIGURA 29- Reatividade anti-Tax de acordo com o tempo .....	79
FIGURA 30- Avaliação longitudinal do perfil de reatividade anti-Tax .....	80
FIGURA 31- Coeficiente de variação do índice de reatividade anti-Tax .....	84
FIGURA 32- Correlação da Carga Proviral do HTLV-1 e índice de reatividade anti-Tax.....	86
FIGURA 33- Índice de reatividade anti-Tax em assintomáticos .....	88
FIGURA 34- Índice de reatividade anti-Tax de acordo com o sexo em assintomáticos .....	89
FIGURA 35- Correlação da Reatividade anti-Tax com o tempo de adoecimento .....	92

## **LISTA DE TABELAS**

TABELA 1 - Características dos indivíduos soropositivos para HTLV-1 e níveis de carga proviral de acordo com o estado clínico .....	50
TABELA 2 - Características dos indivíduos iHAM relativas ao tempo de instalação da HAM/TSP (escala ASIA) .....	83
TABELA 3 – Frequência de sinais e sintomas entre a reatividade dos anticorpos....	91

## LISTA DE SIGLAS

- AMPC- Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
- APC- Célula Apresentadora de Antígeno
- ATF- Fator ativador transcricional
- ATL - Leucemia/Linfoma de Células T do Adulto (*Adult T-cell leukemia virus*)
- BSA – Albumina Bovina Sérica
- CA – Capsídeo
- CD - *Cluster* de diferenciação
- CDS - Sequencia codificante – (do inglês, *coding sequence*)
- cDNA – Ácido desoxirribonucléico complementar
- CRE - Elemento de resposta a cAMP
- CREB - Elemento de Ligação ao CRE
- CTL- Linfócito T Citotóxico
- CPV- Carga proviral
- DAB - 3,3'-diaminobenzidina
- DNA - Ácido Desoxirribonucléico
- DO – Densidade óptica
- DP – Desvio Padrão
- DTT - Ditioneitol
- ECL - Quimioluminescência Aperfeiçoada (do inglês *Enhanced Chemiluminescence*)
- ELISA - Ensaio Imunoenzimático (do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)
- Env - Proteína de Envelope
- GIPH - Grupo Interdisciplinar de Pesquisa em HTLV
- GLUT-1 - Transportador de Glicose-1
- GLMM - Modelo Linear Generalizado Misto
- GM-CSF – Fator estimulante de citocina de macrófago granulócito
- HAM/TSP - Mielopatia Associada ao HTLV-1/Paraparesia Espástica Tropical
- HCl – Ácido Clorídrico
- HBZ - Fator bZIP do HTLV-1
- HSPGs - Receptores proteoglicanos de heparan-sulfato
- HTLV - *Human T-lymphotropic virus*
- ICAM – Molécula de adesão intercelular
- Ig – Imunoglobulina

iHAM – HAM/TSP incidente

IL- Interleucina

IN – Integrase

IPTG - isopropil-1-thio- $\beta$ -D-galactopiranosídeo

IST – Infecções sexualmente transmissíveis

kDa – Quilo-Dalton

LB- Luria Bertani

LCR – Líquido cefalorraquidiano

LIA- Imunoensaio de linha (do inglês, *Innogenetics line immunoassay*)

LIPS- Luciferase Immunoprecipitation System

LTR - Terminações Longas Repetidas

M - Molar

mA - miliAmper

MA – Matriz

MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de Magnésio

MHC- Complexo Principal de Histocompatibilidade

mRNA – RNA mensageiro

MTOC- Centro de Organização de Microtúbulos

NaCl –Cloreto de Sódio

NC – Nucleocapsídeo

NF- $\kappa$ B - Fator Nuclear - kappa B

NLS- Sequência de Localização Nuclear

NRP-1 - Neuropilina-1

ORF - Fase aberta de leitura

OPAS - Organização Panamericana da Saúde

PBMC – Células mononucleares do sangue periférico

PBS - Tampão fosfato-salino

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

pH - Potencial Hidrogeniônico

PTLV - *Primate T-lymphotropic virus*

PTM- Modificação pós-traducional

RNA - Ácido ribonucleico

RNA<sub>m</sub> - Ácido ribonucleico mensageiro

SDS - Sulfato de Dodecil Sódio

SNC – Sistema Nervoso Central  
SS - Síndrome de *Sjögren*  
SRE- Elemento Responsivo ao Soro  
SRF - Fator de Resposta Sérica  
SS - Síndrome de *Sjögren*  
STLV - *Simian T-lymphotropic virus*  
SU - Proteínas de Superfície  
TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido  
TEMED - Tetrametiletilenodiamina  
TBS - Salina Tamponada de Tris  
Th – T *helper*  
TNF – Fator de necrose tumoral  
TM – Transmembrana  
TMB - 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina  
TR - Transcriptase Reversa  
TRE - Elementos de Resposta a Tax  
TSS- Estruturas Pontilhadas de Tax  
U 3' - Região Única 3'  
U 5' - Região Única 5'  
UDIs – Usuário de Drogas Injetáveis  
V - Volts  
WB - *Western Blot*

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	16
1.1 Histórico.....	16
1.2 Epidemiologia do HTLV .....	17
1.2.1 Epidemiologia no Brasil.....	19
1.3 HTLV-1 .....	21
1.3.1 <i>Estrutura genômica e proteínas estruturais</i> .....	23
1.3.2 <i>Proteínas regulatórias</i> .....	25
1.3.2.1 <b>Tax</b> .....	26
1.3.2.1.1 Localização e Distribuição Intracelular .....	26
1.3.2.1.2 Localização extracelular .....	27
1.3.2.1.3 Expressão de Tax.....	29
1.3.2.1.4 A proteína Tax de outros HTLV .....	29
1.3.2.2 <b>HBZ</b> .....	30
1.4 Ciclo de Multiplicação do HTLV-1 .....	31
1.4.1 <i>Receptores e penetração viral</i> .....	31
1.4.2 <i>Ciclo de multiplicação</i> .....	32
1.5 Transmissão .....	33
1.6 Diagnóstico.....	34
1.7 Doenças Associadas ao HTLV .....	36
1.7.1 <i>ATL</i> .....	36
1.7.2 <i>HAM/TSP</i> .....	37
1.7.3 <i>Síndrome Intermediária associada ao HTLV</i> .....	39
1.8 Resposta imune.....	40
1.9 Carga proviral e HAM/TSP .....	41
1.10 Anticorpos anti-Tax.....	42
2. JUSTIFICATIVA.....	46
3. OBJETIVO .....	48
3.1 Objetivo geral .....	48
3.2 Objetivos específicos.....	48
4. METODOLOGIA .....	49
4.1 População de Estudo .....	49
4.2 Quantificação da carga proviral do HTLV-1 .....	50
4.3 Elaboração do plasmídeo recombinante de Tax .....	50
4.4 Competência e Transformação bacteriana .....	52
4.5 Extração e restrição do DNA plasmidial.....	53
4.6 Teste de indução da Expressão de Proteínas .....	54
4.7 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida .....	54
4.8 Teste de Solubilidade.....	55
4.9 Purificação em sistema <i>Äkta Start</i> .....	55
4.10 SDS-PAGE.....	56
4.11 <i>Western Blot</i> .....	56

4.12 Ensaio Imunoenzimático indireto (ELISA) .....	57
4.12.1 Protocolos otimizados para ELISA anti-C-Tax .....	58
4.12.2 Análise dos resultados de ELISA.....	59
4.13 Análise Estatística.....	59
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>61</b>
5.1 Análise <i>in silico</i> da proteína Tax C-terminal .....	61
5.1.1 Construção do Plasmídeo .....	61
5.1.2 Perfil de Hidrofobicidade .....	61
5.1.3 Tendência Transmembrana.....	62
5.1.4 Perfil de Solubilidade.....	63
5.2 Restrição Plasmidial .....	63
5.3 Produção de Tax recombinante .....	63
5.4 Teste de Solubilidade .....	65
5.5 Purificação em sistema <i>Äkta Start</i> .....	66
5.6 <i>Western Blot</i> .....	67
5.7 Padronização do ELISA .....	69
5.7.1 Padronização do ELISA IgG .....	69
5.7.2 Padronização do ELISA IgG1 .....	70
5.7.3 Padronização do ELISA IgM .....	71
5.8 Curva ROC .....	71
5.9 Reatividade dos anticorpos anti-Tax .....	72
5.10 Associação da reatividade anti-Tax com sexo e idade.....	77
5.11 A reatividade anti-Tax na avaliação longitudinal.....	79
5.12 A reatividade anti-Tax e a Carga Proviral.....	85
5.13 A reatividade anti-tax e os assintomáticos.....	87
5.13.1 Avaliação clínica dos indivíduos HTLV-1 positivos assintomáticos .....	90
5.14 A reatividade anti-tax e o adoecimento .....	92
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>93</b>
<b>7. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>94</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>95</b>
<b>9. ANEXOS .....</b>	<b>116</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Histórico

O *Human T-lymphotropic virus 1* (HTLV-1 – vírus linfotrópico das células T humanas) foi o primeiro retrovírus humano descrito e associado a doenças humanas e pertence ao domínio *Riboviria*, reino *Pararnavirae*, filo *Artverviricota*, classe *Revtraviricetes*, ordem *Ortervirales*, família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae* e gênero *Deltaretrovirus* (GALLO, 2011; ICTV, 2024). Dentro deste gênero se agrupam vírus que infectam seres humanos (HTLV) e símios (STLV- *Simian T-lymphotropic virus*) que são denominados de PTLV (*Primate T-lymphotropic virus* - Vírus T-Linfotrópicos de Primatas) e se dividem em três grupos principais: PTLV-1, PTLV-2 e PTLV-3 compostos pelos STLV-1/HTLV-1, STLV-2/HTLV-2 e STLV-3/HTLV-3, respectivamente (ICTV, 2024).

Alguns estudos sugerem que o HTLV possa ter emergido do contato de seres humanos e primatas não humanos infectados (SALEMI *et al.*, 2000). Apesar das amostras de PTLV-1 e PTLV-2 serem extensivamente estudadas desde a década de 1980, os estudos sobre PTLV-3 têm aumentado em número desde a descoberta do HTLV-3 em 2005 (MAHIEUX *et al.*, 2011), mesmo ano da descoberta do quarto HTLV, o HTLV-4, que ainda permanece sem um equivalente símio viral oficialmente estabelecido (LeBRETON *et al.*, 2014). Um quinto tipo viral teve somente sua variante símia descrita, o STLV-5 (LIÉGEOIS *et al.*, 2007). A similaridade do genoma de HTLV-1 com STLV-1 é maior do que entre o HTLV-1 e o HTLV-2, indicando que esses dois vírus humanos se originaram independentemente e estão relacionados ao STLV-1 e STLV-2, respectivamente (SALEMI *et al.*, 2000).

O HTLV-1 foi isolado pela primeira vez no final da década de 1970, nos Estados Unidos (EUA), a partir de células T do sangue periférico e do linfonodo de um paciente com linfoma cutâneo de células T, doença que foi classificada como leucemia/linfoma de células T do adulto (ATL) (POIESZ *et al.*, 1980). Entretanto, a Leucemia de Células T do Adulto (ATL) foi descrita em Kyoto, Japão, como entidade clínica em 1977 por Uchiyama *et al.* e sua carcinogênese associada a um retrovírus denominado ATLV (*Adult T-cell leukemia virus*), de forma simultânea e independente do estudo nos EUA (YOSHIDA *et al.*, 1982). Posteriormente, análises de ambos os isolados comprovaram que o HTLV e o ATLV se tratavam do mesmo vírus, sendo então nomeado como HTLV-1 (GALLO, 2011).

Em 1982, um segundo tipo de retrovírus humano foi descrito, o HTLV-2 (KALYANARAMAN *et al.*, 1982), a partir de uma linhagem de células T imortalizadas de um paciente com leucemia de células pilosas, sendo relacionado, mas com perfil antigênico divergente do HTLV-1. Apesar do HTLV-2 não ter sido associado a doenças de maneira muito clara quando descoberto, alguns relatos na literatura, em sua maioria estudos de casos, associam esse tipo viral com doenças neurodegenerativas crônicas e a um aumento na taxa de doenças infecciosas (ARAUJO & HALL, 2004; ROSADAS *et al.*, 2014; BRASIL, 2021).

O HTLV-3 e HTLV-4 foram identificados somente em populações de caçadores de primatas não humanos no sul de Camarões, no continente africano (CALATTINI *et al.*, 2005; WOLFE *et al.*, 2005). Até hoje não se sabe se esses dois vírus podem ser transmitidos entre seres humanos e se são capazes de desenvolver doenças em seus portadores, seja porque a infecção é rara ou por serem subestimados, uma vez que não existem testes confirmatórios que possam ser utilizados para esses vírus, o que gera resultados inconclusivos (WOLFE *et al.*, 2005; YOUNIS *et al.*, 2005; MAHIEUX *et al.*, 2011).

## 1.2 Epidemiologia do HTLV

Desde quando foi descrito, o HTLV-1 foi identificado em todos os cinco continentes, tendo sido reportada uma estimativa de 5 a 10 milhões de pessoas infectadas no mundo (GESSAIN, 2012), enquanto que outros estudos mais antigos estimam cerca de 10 a 20 milhões de infectados pelo HTLV-1 (De THÉ & BOMFORD, 1993). As áreas são caracterizadas como endêmicas quando a prevalência varia de 0,5 a 20% da população, dependendo da idade e do gênero, ou não endêmicas onde a prevalência é inferior a 0,1% (MARTINS *et al.*, 2012).

As regiões consideradas endêmicas são: Japão com taxas de prevalência muito altas (30 a 40%), diversos países do Caribe, incluindo Jamaica e Trinidad (aproximadamente 6,1%), países africanos como Benin e Camarões (5,5%), Ilhas Melanésias e nordeste do Iran (0,77 a 3%) (GESSAIN, 2012). Taxas de prevalência menos elevadas são encontradas em países da América do Sul (CARNEIRO-PROIETTI, 2012). Os dados da Argentina, Brasil, Colômbia e Peru, são em sua maior parte, restritos aos doadores de sangue (em torno de 1-2% de soropositividade para o HTLV-1/2) (GESSAIN, 2012).

Em regiões não endêmicas, como a Europa (prevalência de 0,4% ou menos em doadores de sangue) (ECDC, 2015) e América do Norte (0,02%) a infecção pelo HTLV-1 é encontrada principalmente entre os imigrantes de áreas de alta endemicidade e seus familiares, profissionais do sexo e usuários de drogas injetáveis (UDIs) (GESSAIN, 2012). A figura 1 mostra as áreas endêmicas do HTLV-1 no mundo.



**Figura 1: Distribuição geográfica mundial dos focos de infecção por HTLV-1.** Os dados foram obtidos a partir de mulheres grávidas e candidatos à doação de sangue. Os círculos indicam o número estimado de pessoas. Adaptado de GESSAIN & CASSAR, 2012.

Apesar da prevalência do HTLV-1 em determinadas áreas ser pouco conhecida, sabe-se que existe uma variação de acordo com a idade (podendo alcançar 20 a 40% nos infectados com idade acima de 50 anos em alguns grupos específicos), sexo (maior em mulheres), níveis socioeconômicos e educacionais mais baixos, afro-descendência, histórico de transfusões sanguíneas e uso de drogas ilegais intravenosas (DINIZ *et al*, 2009; WATANABE, 2011; GESSAIN, 2012; ROMANELLI *et al.*, 2013a).

A distribuição mundial da prevalência do HTLV-1, com estimativas globais e regionais, ainda hoje permanece pouco conhecida devido a muitos fatores. Diversas regiões não possuem programas de saúde para investigação da infecção pelo HTLV-1, e os ensaios sorológicos para HTLV-1, em especial nas décadas de 1980 e 1990, tiveram pouca especificidade levando a uma superestimação da prevalência

(GESSAIN, 2012). Além disso, a maioria dos estudos é realizada com grupos de doadores de sangue, gestantes ou pacientes hospitalizados. Um ponto importante que esses autores enfatizam é a distribuição heterogênea do HTLV-1, que está presente geralmente em pequenos focos ou aglomerados com alta prevalência de infecção e áreas próximas de baixa prevalência, como exemplificado na Austrália, que possuem comunidades indígenas remotas com prevalência de 70% (EINSIEDEL *et al.*, 2016; GESSAIN, 2012).

Em 2021, durante o Fórum de Políticas Internacionais para a Eliminação do HTLV-1, foi destacado o fato de que os números estimados de 5 a 10 milhões de pessoas vivendo com o HTLV no mundo são certamente subestimados, especialmente pela dificuldade de se obter dados robustos em países muito populosos. Apontou-se a região das Américas como uma das regiões da OMS com a maior disponibilidade de dados publicados sobre a prevalência do HTLV. Na região coberta pela Organização Panamericana de Saúde (OPAS) a maior prevalência do HTLV-1 ocorre em populações com alto risco para infecções sexualmente transmissíveis (IST), destacando-se profissionais do sexo e homens que fazem sexo com homens. A taxa de prevalência do HTLV-1 (mínima – máxima %) desses estudos nas Américas foi de 0,001-2,4 para doadores de sangue, 0,1 – 5,7 para mulheres grávidas e 0,26 – 6,7 para a população em geral (PAHO, 2021).

### **1.2.1 Epidemiologia no Brasil**

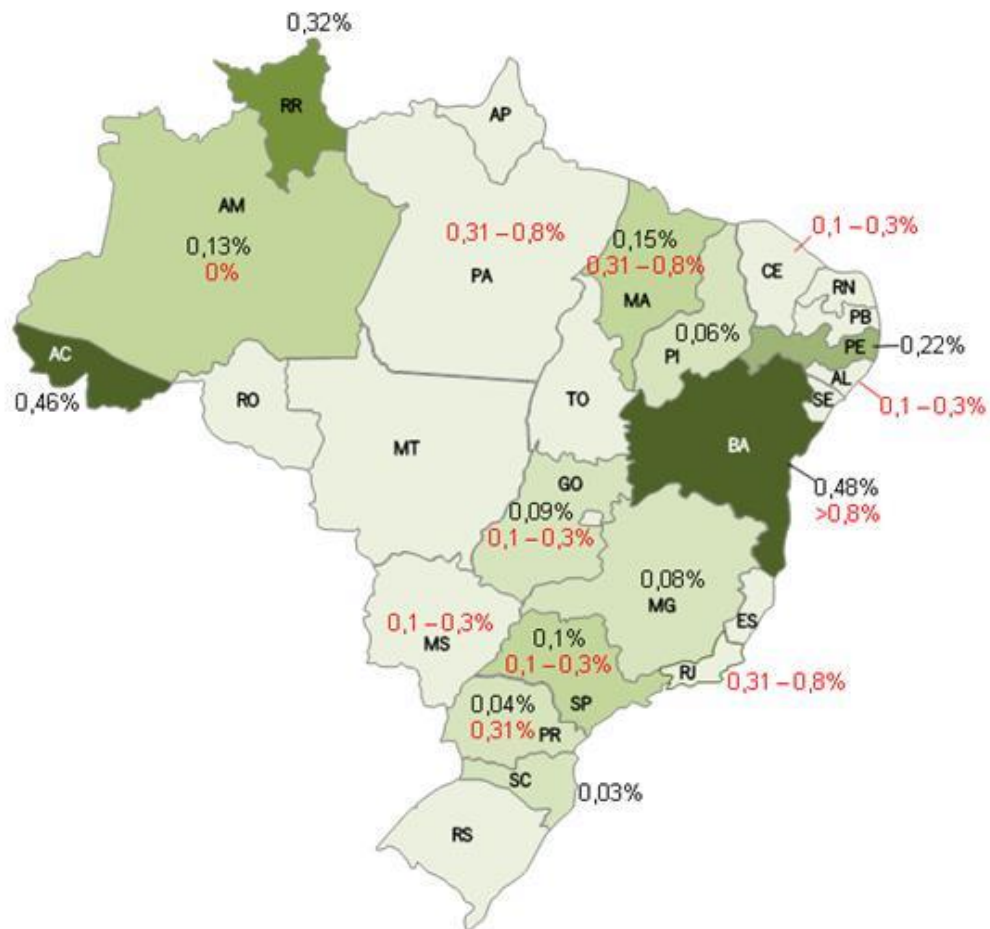
No Brasil a soroprevalência média encontrada, entre doadores aptos à doação de sangue e avaliados por ELISA, é cerca de 20 a 100 vezes mais alta do que a relatada para os Estados Unidos e Europa, com uma prevalência de HTLV-1/2 de 48/10.000 candidatos à doação de sangue e aproximadamente 2,5 milhões de pessoas infectadas, variando conforme a região geográfica, grupo populacional pesquisado e o tamanho da amostra avaliada (CATALAN-SOARES *et al.*, 2005; PROIETTI *et al.*, 2011). Esse fato, aliado à extensão territorial e ao tamanho da população é um indicio que o Brasil abriga o maior número absoluto de indivíduos soropositivos para HTLV-1/2 entre todos os países endêmicos.

Dentre os estados, a prevalência em bancos de sangue do HTLV-1/2 varia entre 0,04% em Florianópolis, Santa Catarina, a 0,9% no estado do Pará, 1% no Maranhão e 1,3% em Salvador, Bahia, a cidade com maior prevalência no país (DIAS-BASTOS *et al.*, 2010; GESSAIN & CASSAR, 2012). No estado de Minas

Gerais, um estudo retrospectivo efetuado pela Fundação HEMOMINAS testando mais de 2 milhões de amostras de candidatos à doação de sangue coletadas entre janeiro de 2006 e dezembro de 2012, mostrou uma positividade de 0,086% para o HTLV-1/2 (SILVA *et al.*, 2016).

Existe no Brasil uma heterogeneidade em relação à distribuição da soroprevalência, sendo mais elevada nos estados das regiões Norte e Nordeste do que na região Sul do país. Uma possível hipótese para esse dado é o grande contingente de africanos escravizados trazidos para essas regiões, na época do Brasil colonial, uma vez que se reconhece a origem africana deste vírus (CATALAN-SOARES *et al.*, 2005).

Informações epidemiológicas sobre o HTLV no Brasil foram publicadas no Boletim Epidemiológico 48 (2020) pela Coordenação Geral de Vigilância das Infecções Sexualmente Transmissíveis do Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis (CGIST/DCCI/SVS), com o objetivo de promover o conhecimento sobre a infecção pelo HTLV, como parte das ações do dia 10 de novembro, instituído pela Associação Internacional de Retrovirologia (IRVA) como o Dia Mundial de conscientização do HTLV. Todos os dados inseridos no mapa abaixo (Figura 2) foram retirados de estudos publicados a partir da triagem, seguida de testes confirmatórios, embora nem todos os estudos já publicados referente aos dados brasileiros foram contemplados nesse artigo. Para os candidatos à doação de sangue a prevalência variou de 0,03% (Santa Catarina) a 0,48% (Salvador), com os maiores números relacionados às regiões Norte e Nordeste. Na análise do grupo gestantes observou-se prevalências de 0% (Amazonas) a > 0,8% (Bahia). As altas percentagens observadas, bem como a já destacada heterogeneidade regional e entre grupos reforça a necessidade de expansão da testagem ampla no território brasileiro, como forma de subsidiar as políticas públicas de saúde.

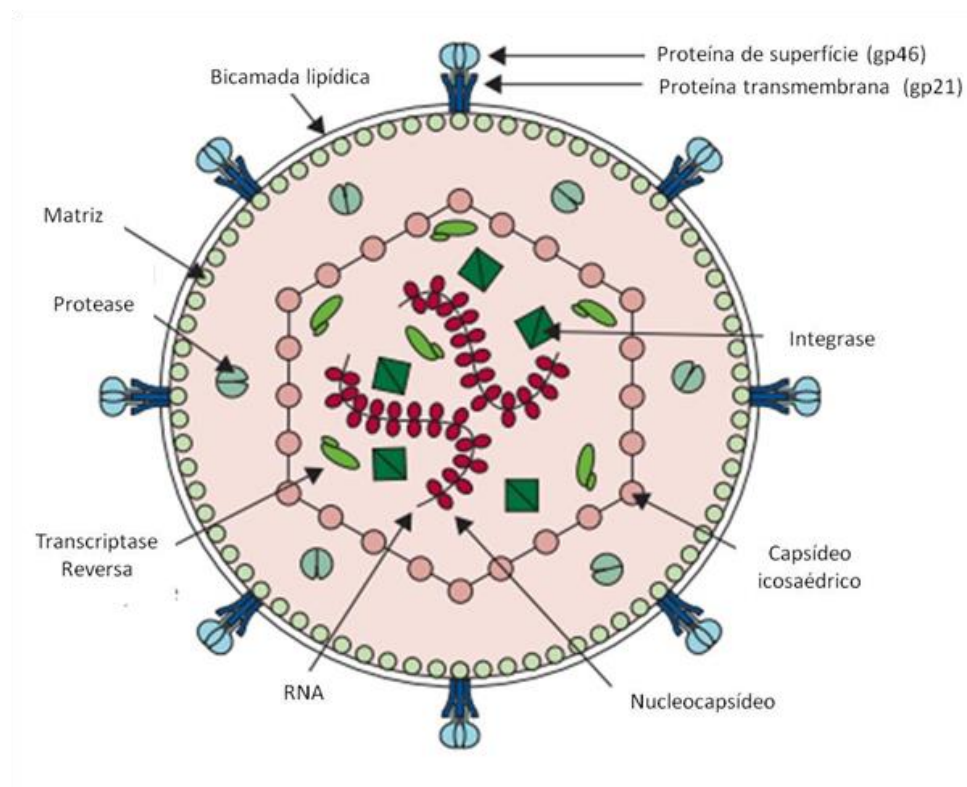


**Figura 2: Prevalência estimada do HTLV-1/2 no Brasil.** Dados em porcentagem baseados em estudos diversos de 17 dos 26 (65,4%) estados brasileiros, a partir de candidatos a doação de sangue (porcentagem em preto) e gestantes (porcentagem em vermelho) (Adaptado de: Boletim Epidemiológico 48, V. 51, p. 25 – 33, dez 2020).

### 1.3 HTLV-1

A partícula viral do HTLV-1 é estruturalmente complexa com morfologia do tipo C (a montagem ocorre na membrana plasmática e contém um cerne viral esférico localizado simetricamente no centro da partícula), sendo formada por um envelope, um nucleocapsídeo (NC), e um nucleóide (Figura 3; GOFF, 2007). A morfologia dos vírions é de esférica a pleomórfica medindo cerca de 80 a 100 nm. As partículas virais são circundadas por um envelope (Env) derivado da membrana plasmática do hospedeiro, de bicamada lipídica que é adquirido no processo de liberação da partícula e possui um capsídeo icosaédrico que protege o RNA e as enzimas virais (GOFF, 2007; CANN *et al.*, 1996).

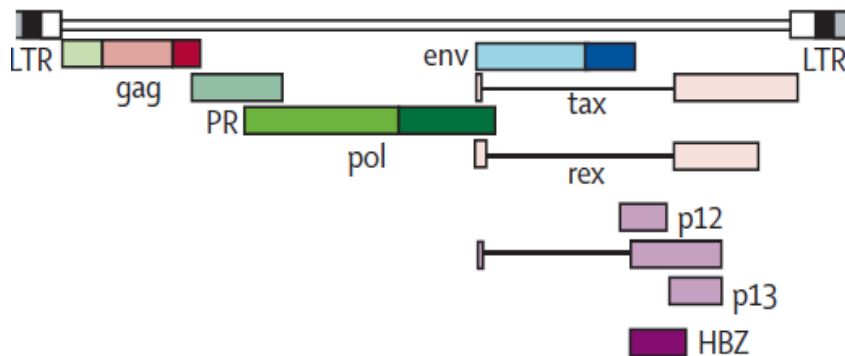
O envelope é composto por proteínas que se projetam para o exterior, chamadas proteínas transmembrana (TM), que são densamente dispersas cobrindo toda superfície viral e que ancoram as proteínas de superfície (SU) da partícula viral (JASSAL *et al.*, 2001). Unida à proteína do envelope, encontra-se a proteína da matriz (MA), Gag, que está adicionada a um ácido graxo na região amino terminal, sendo uma alteração característica de proteínas que se encontram na face interna da membrana celular. O nucleocapsídeo é composto em sua maioria de proteínas codificadas pelo gene *gag*, apresentando estruturas secundária e terciária altamente conservadas e estrutura quaternária esférica na montagem do cerne (CORNILESCU *et al.*, 2003; GOFF, 2007;). Esta estrutura abriga, no seu interior, o genoma viral composto por duas fitas simples de RNA senso positivo, que carregam a informação genética para proteínas estruturais, acessórias e enzimas virais, como a transcriptase reversa (TR) e a integrase (IN), essenciais no processo de replicação viral e integração do DNA no genoma da célula hospedeira (OHTSUKI *et al.*, 1982; CANN, 1996; GOFF, 2007).



**Figura 3: Estrutura esquemática da partícula viral do HTLV-1/2.** As proteínas estruturais são representadas pela gp46 (superfície), gp21 (transmembrana), p19 (matriz) e p24 (capsídeo). No cerne estão as enzimas protease, integrase e transcriptase reversa, além do RNA fita simples diplóide. Adaptado: VERDONCK *et al.*, 2007.

### 1.3.1 Estrutura genômica e proteínas estruturais

O DNA proviral do HTLV-1 possui 9032 pares de base (SEIKI *et al.*, 1983) e o do HTLV-2 8952 pares de base (SHIMOTHONO *et al.*, 1985). O genoma do HTLV é composto por um dímero de RNA fita simples, que apresenta os genes comuns a todos os retrovírus *gag*, *pol* e *env*, além da região pX. Cada extremidade do genoma é flanqueada por duas regiões de repetição menos conservadas, chamadas de Terminações Longas Repetidas (LTRs - *long terminal repeats*) compostas por três regiões: região única 3' (U3'), região repetida (R) e região única (U5') (Figura 4; GOFF, 2013).

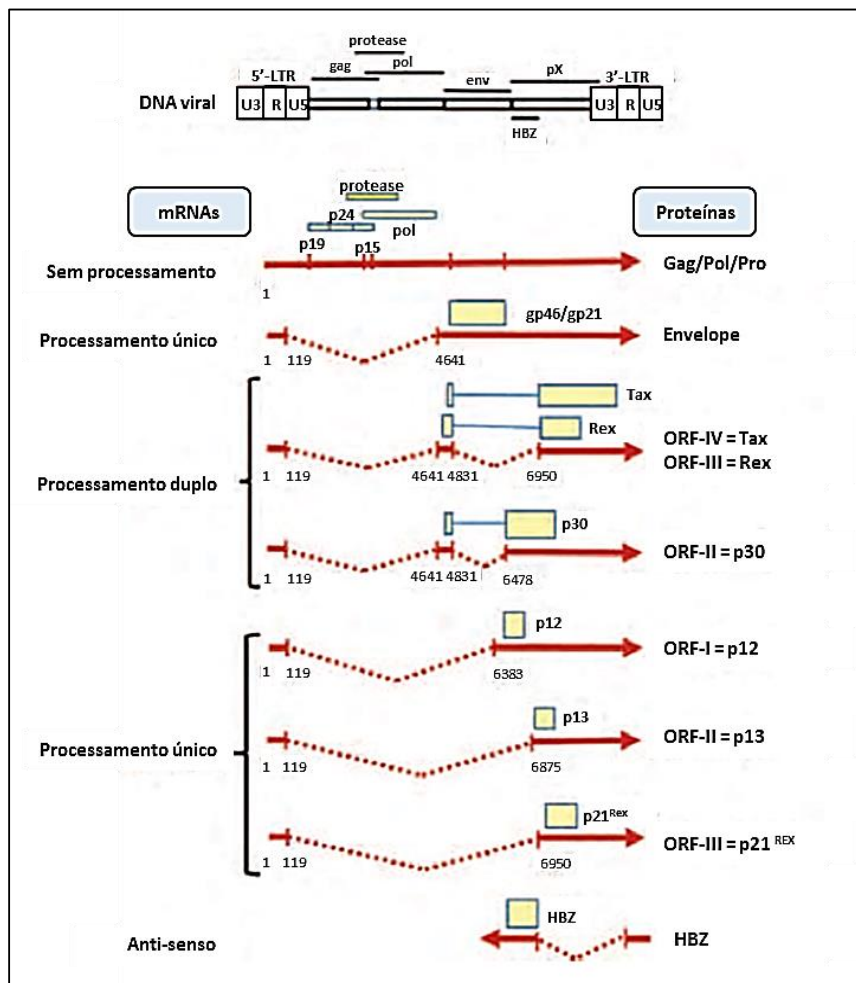


**Figura 4: Organização genômica do HTLV-1.** O genoma proviral é representado com as indicações das posições dos genes conhecidos e seus produtos proteicos. Adaptado: VERDONCK *et al.*, 2007.

A região denominada pX é composta por quatro fases abertas de leitura (ORFs I, II, III e IV) que codificam as proteínas regulatórias e acessórias do vírus (CIMINALE *et al.*, 1992; PRINCLER *et al.*, 2003). As ORFs III e IV codificam para as proteínas regulatórias Tax e Rex, respectivamente, através de um único RNAm policistrônico, e são essenciais para a expressão e multiplicação viral; a ORF I codifica um RNAm de processamento único ou duplo que traduz a proteína acessória p12; a ORF II codifica o RNAm duplamente processado para a proteína p30 e o RNAm de processamento único para a proteína p13; por processamento alternativo, a ORF III também codifica o RNAm para a proteína p21 (CIMINALE *et al.*, 1992; PRINCLER *et al.*, 2003) (Figura 5).

O gene *gag* do HTLV-1 abrange os nucleotídeos 802 a 2019 no genoma. Esta região é inicialmente traduzida como um precursor poliprotéico, que, ao ser clivado, dá origem às proteínas Gag maduras: p19, p24 e p15 (HATTORI *et al.*, 1981; LEE *et*

*al.*, 1984). As proteínas do capsídeo formam o cerne do vírion, protegendo o RNA e as proteínas virais; as do núcleocapsídeo interagem com o RNA genômico, condensando-se em um complexo ribonucleoprotéico no cerne viral; e as da matriz associam-se à membrana celular, contribuindo para a organização dos componentes virais, o brotamento viral e a transmissão célula-célula. A montagem, brotamento e maturação de partículas virais infectivas dependem da expressão adequada do gene *gag* e das interações Gag-Gag (VERDONCK *et al.*, 2007; FOGARTY *et al.*, 2011; LAIRMORE *et al.*, 2011).



**Figura 5: Região esquemática da região pX do HTLV-1, mostrando as proteínas codificadas pelas ORFs I ao IV.** As múltiplas espécies de RNAs geradas por processamentos (*splicing*) alternativos geram proteínas: as do envelope são produzidas por um único processamento pós-transcricional, enquanto Tax e Rex, ambas regulatórias, são sintetizadas por processamento duplo do RNAm. O RNAm para as proteínas acessórias p12, p13 e p21 sofre um único processamento; para a p30 ocorre um processamento duplo; e o transcrito HBZ é sintetizado de forma anti-senso na fita molde. Adaptado de FUJII *et al.*, 2013 e modificado por FRANCO, 2015.

O gene *pro* codifica a protease, enquanto o gene *pol* codifica a transcriptase reversa (TR) e a integrase (IN) (NAM *et al.*, 1993; TRENTIN *et al.*, 1998). A protease realiza sua própria clivagem e processa os produtos da Gag madura durante a montagem do vírion. Os produtos gênicos estão inicialmente na forma poliprotéica Gag-Pol ou Gag-Pro-Pol e sofrem clivagem proteolítica pela protease durante a maturação viral, liberando as proteínas no cerne viral (NAM *et al.*, 1988; MÜLLER & KRÄUSSLICH, 1999; LAIRMORE *et al.*, 2011).

O gene *pol*, polimerase, compreende os nucleotídeos 2457 a 5187 no genoma viral, codificando a transcriptase reversa e a integrase. A transcriptase reversa (TR) é essencial para a síntese do DNA viral a partir do genoma RNA, sendo fundamental para a fase inicial do ciclo de replicação. A TR também possui atividade de RNase H, removendo seletivamente o RNA da molécula híbrida DNA-RNA (TRENTIN *et al.*, 1998; LAIRMORE & FRANCHINI, 2007).

O gene *env* codifica as proteínas do envelope viral (Env) na sequência de nucleotídeos 5180 a 6647 no genoma viral. A proteína precursora é clivada, gerando a glicoproteína de superfície (gp46-SU) de 46 kDa e a proteína transmembrana (TM-p21) de 21kDa. A proteína de superfície e a proteína transmembrana associam-se, não covalentemente, ancorando a proteína SU no envelope da partícula viral (LEE *et al.*, 1984; SODROSKI *et al.*, 1984; SCHNEIDER *et al.*, 1984; DELAMARRE *et al.*, 1996).

A LTR desempenha um papel crucial na integração do provírus no DNA da célula hospedeira e regula a transcrição dos RNAs mensageiros virais. A região U3 é fundamental para a regulação da expressão gênica do provírus, contendo elementos de resposta da Tax-1 ou 2 (TRE-1 ou TRE-2) para ativação transcricional por Tax, além de sequências responsáveis pela terminação e poliadenilação dos RNAs mensageiros (SEIKI *et al.*, 1983; FEUER & GREEN, 2005; LAIRMORE, 2011; CURRER *et al.*, 2012).

### **1.3.2 Proteínas regulatórias**

As proteínas regulatórias virais codificadas pela região pX do genoma viral, são a Tax e a Rex. Estas são importantes na infecção e replicação viral por influenciar a sinalização celular e a expressão gênica. A região também codifica proteínas acessórias como a p12, p13, p30 e p21, proteínas que também são

responsáveis pela transcrição, apoptose, ativação e proliferação celular, transmissão viral e resposta do hospedeiro (VERDONCK *et al.*, 2007; EDWARDS *et al.*, 2011).

### 1.3.2.1 Tax

A proteína Tax é uma fosfoproteína regulatória de 40 kDa do HTLV-1 (intitulada Tax-1) de 353 aminoácidos (LEE *et al.*, 1984) e contém vários domínios que permitem interagir com diversos fatores celulares e com processos virais, interferindo em um grande número de funções e de produtos celulares, especialmente recrutando a maquinaria de transcrição celular para a região 5' LTR, sendo essencial para a expressão de genes virais e do controle do ciclo celular (VERDONCK *et al.*, 2007; CURRER *et al.*, 2012). Tax pode interagir com mais de 100 proteínas celulares pertencentes a vários grupos funcionais, regulando ou desregulando uma série de genes celulares, cerca de 300 de 2000 genes examinados por microarrays de cDNA (LODEWICK *et al.*, 2011).

#### 1.3.2.1.1 Localização e Distribuição Intracelular

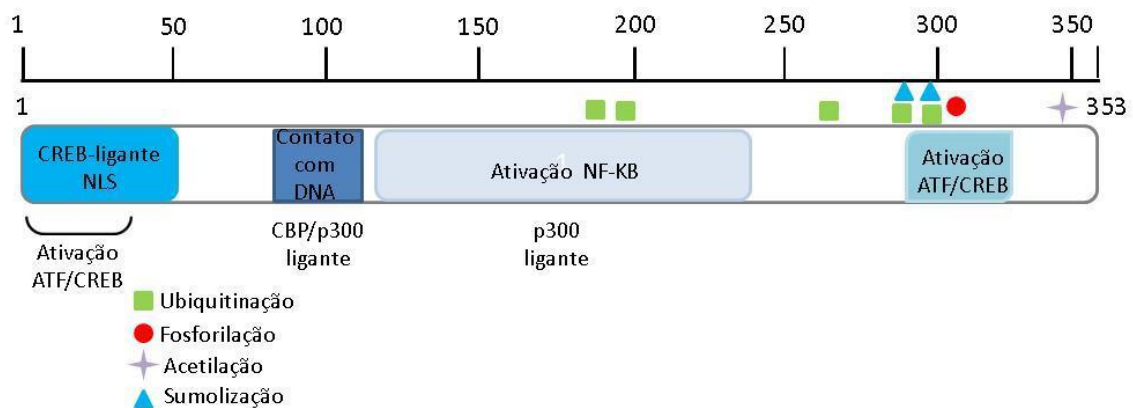
A Tax é predominantemente uma proteína nuclear. A localização nuclear de Tax é conferida pela sequência de localização nuclear (NLS) presente na porção amino terminal (aminoácidos 18 a 52) (GITLIN *et al.*, 1991), sobrepondo-se a interação de um domínio de *zinc finger* nos aminoácidos 23 a 62 (TSUJI *et al.*, 2007). A NLS é longa, sugerindo que a estrutura terciária da proteína é importante para a sua movimentação nas regiões subnucleares (BOXUS *et al.*, 2008).

Quando Tax é super-expressada sua distribuição é heterogênea, sendo encontrada no núcleo, citoplasma ou em ambos os locais (LAMSOUL *et al.*, 2005). No núcleo, a distribuição pontuada da Tax foi identificada pela primeira vez como estruturas pontilhadas de Tax (TSS) por microscopia óptica. Após uma maior caracterização da morfologia dessas estruturas nucleares por microscopia eletrônica, eles foram nomeados como corpos nucleares de Tax (Tax NB). A distribuição pode ser difusa ou pontual no citoplasma ou concentrada em estruturas associadas ao aparelho de Golgi (LODEWICK *et al.*, 2011).

Alefantis e colaboradores, por sua vez, apontam que modificações conformacionais de Tax e/ou interação com outras proteínas podem ser necessárias para expor alguns domínios de Tax para o maquinário de exportação celular. O

*status* das modificações pós-traducionais (PTM) pode resultar em um resultado significativo na sua funcionalidade e localização. A sumoilação e a ubiquitinação competem pelos mesmos resíduos de lisina sobrepostos que resultam em efeitos regulatórios opostos (LAMSOUK *et al.*, 2005; GATZA *et al.*, 2007). Acredita-se que a ubiquitinação controle a retenção de Tax no citoplasma e a sumoilação controle a retenção no núcleo (LAMSOUK *et al.*, 2005). Outras modificações pós-traducionais associadas à Tax citoplasmática incluem a fosforilação de Tax como pré-requisito para a ubiquitinação citoplasmática da proteína, além da acetilação e sumoilação (LODEWICK *et al.*, 2011).

A variação no balanço da movimentação de Tax entre o citoplasma e o núcleo, causado por estresse celular e genotóxico, resulta em aumento de NF-κB e diminuição da atividade de Tax mediada por CREB (Proteína de Ligação de Elemento de Resposta ao AMP cíclico), e é capaz de desencadear alterações nas vias de sinalizações indutíveis por Tax, podendo ter efeitos no desenvolvimento e agravamento das doenças associadas ao HTLV-1 (GATZA & MARRIOT, 2006; ALEFANTIS *et al.*, 2007; LODEWICK *et al.*, 2011; ROMANELLI *et al.*, 2013) (Figura 6).



**Figura 6: Domínios estruturais e funcionais da proteína Tax.** A região N-terminal de Tax-1 contém uma região de ligação CREB que abrange aa 1-60. Esta região está envolvida na interação com fatores de transcrição ATF/CREB e representa um domínio de ligação necessário para a interação com proteínas envolvidas na transcrição, progressão do ciclo celular e regulação da sinalização celular. As proteínas Tax, dos quatro tipos virais, contêm o domínio de ligação CREB dentro do seu N' terminal. Fonte: Modificado de ROMANELLI *et al.*, 2013b.

#### 1.3.2.1.2 Localização extracelular

Os mecanismos que a proteína Tax utiliza para sair da célula não estão totalmente elucidados. Teoricamente, esta proteína pode sair da célula por três

maneiras distintas: necrose, apoptose ou via secretória celular, apesar de que a lise ou necrose celular não são a rota primária de liberação da Tax no meio celular (ALEFANTIS *et al.*, 2005).

A Tax se co-localiza com várias organelas citoplasmáticas associadas à exocitose, incluindo o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi, sugerindo migração através destas duas organelas durante a secreção (ALEFANTIS *et al.*, 2005). A proteína Tax possui um sinal de exportação nuclear e dois sinais secretores putativos na porção C-terminal, sendo segregada de células transformadas *in vitro* por meio de vesículas secretoras através da via do retículo endoplasmático, complexo de Golgi e pós-Golgi, e posteriormente pela membrana celular de células mononucleares periféricas do sangue (PBMCs) de indivíduos infectados pelo HTLV-1 (ALEFANTIS *et al.*, 2005; MEDINA *et al.*, 2014).

A expressão de Tax para o ambiente extracelular está associada ao desencadeamento ou agravamento de doenças relacionadas com a infecção do HTLV-1 como a HAM/TSP (MEDINA *et al.*, 2016) e a artrite reumatóide (AONO *et al.*, 1998). Em pacientes diagnosticados com HAM/TSP, a Tax demonstrou hiperestimular o sistema imunológico e os anticorpos anti-Tax demonstraram reações cruzadas com a proteína ribonuclear nuclear A1, um tipo de proteína neuronal (KUBOTA *et al.*, 2000; LEVIN *et al.*, 2002).

A proteína Tax na forma livre age nas células dendríticas, induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (Th1) e quimiocinas responsáveis pela maturação e alterações funcionais nos monócitos derivados destas. Além disso, promove a expressão de marcadores de ativação (CD40, CD80, CD86) e maturação (CD83) das células dendríticas. As células apresentadoras de antígenos (APC) fagocitam Tax extracelular e a apresentam através do complexo principal de histocompatibilidade de classe 1 (MHC-I), resultando na lise das células que expressam Tax, pela ação dos linfócitos T CD8+ específicos. Pacientes com a síndrome HAM/TSP possuem uma persistente e elevada resposta imune, caracterizada principalmente por linfócitos T citotóxicos CD8+ específicos para Tax presentes no fluído cefalorraquidiano e no sangue periférico, indicando a relevância de Tax extracelular para o desenvolvimento desta doença (ALEFANTIS *et al.*, 2005; JAIN *et al.*, 2007).

#### 1.3.2.1.3 Expressão de Tax

O HTLV-1 expressa duas proteínas oncogênicas, a Tax e fator bZIP do *Human T lymphotropic virus 1* (HTLV-1), sendo que ambas se neutralizam em muitas vias de sinalização (MATSUOKA & YASUNAGA, 2013). A Tax não é apenas uma das oncoproteínas mais potentes já descritas (BOXUS *et al.*, 2008), mas também um transativador eficiente da replicação viral, o que significa que ela é necessária para a infecção *de novo*. No entanto, a expressão de Tax é geralmente suprimida em células infectadas *in vivo* (HANON *et al.*, 2000). Esses fatos sugerem que o HTLV-1 ajusta a expressão e a função desses fatores virais neutralizantes para estabelecer infecção persistente em indivíduos infectados. Como Tax é altamente imunogênica, o vírus parece minimizar a expressão deste antígeno para escapar da imunidade do hospedeiro com apenas uma pequena fração (0,05 a 3%) das células expressando transitoriamente a Tax (KANNAGI *et al.*, 1991; MAHGOUB *et al.*, 2018).

A expressão intermitente de Tax é uma estratégia inteligente do HTLV-1 para escapar da resposta imune do hospedeiro na maioria das vezes, mas mantendo a capacidade de causar infecção *de novo* sob certas condições. Kulkarni e colaboradores (2017), relataram que a Tax por ser induzida por hipóxia, o que corrobora achados anteriores que detectam alta expressão de *tax* na medula óssea, que é fisiologicamente hipóxica (LEVIN *et al.*, 1997). Outro exemplo é a transmissão do HTLV-1 através da amamentação – um processo no qual as células infectadas pelo HTLV-1 passam pelo sistema digestivo com condições ácidas e pelos ácidos biliares e a expressão de Tax é induzida pelo estresse nessas condições. Sabe-se que o pH baixo e a hipóxia no ambiente fisiológico suprimem a imunidade adaptativa, sugerindo que as células infectadas podem ser capazes de expressar Tax e não serem reconhecidas (TAYLOR *et al.*, 2017; MAHGOUB *et al.*, 2018).

#### 1.3.2.1.4 A proteína Tax de outros HTLV

A proteína Tax-2, proteína transativadora do HTLV-2, caracteriza-se como uma fosfoproteína de 37 kDa que apresenta aproximadamente 77-85% de homologia nucleotídica com a Tax-1 dependendo da parte estudada, sendo que a porção N-terminal possui a região mais conservada entre as duas proteínas (KONDO *et al.*, 2006). Existem quatro subtipos do HTLV-2 e as proteínas Tax-2, apesar de apresentarem similaridade, possuem tamanhos distintos entre eles. A

fosfoproteína Tax-2, assim como a Tax-1, possui potencial de ativação similar *in vitro* (NIINUMA *et al.*, 2005). É demarcada a habilidade de Tax-2 em ativar a via transativadora transcricional via NF-κB e CREB/ATF, entretanto as regiões funcionais dessas vias de sinalização não são idênticas (ROSS *et al.*, 1997; LEWIS *et al.*, 2002).

Ambas as proteínas, Tax-1 e Tax-2, protegem as células infectadas da morte celular programada, porém apenas a Tax-1 possui esta atividade reforçada, protegendo inclusive células que mostram acúmulo de mutações e danos no DNA, o que é importante para o processo oncogênico (YANG *et al.*, 2011). Outras diferenças entre a Tax-1 e Tax-2 poderiam ser uma explicação possível para a diferença de patogenicidade entre o HTLV-1 e o HTLV-2.

Ainda, menos estudadas existem a Tax-3 e a Tax-4, do HTLV-3 e HTLV-4, respectivamente. As duas proteínas podem desempenhar papéis importantes na immortalização de células T e na persistência da infecção viral (CALATTINI *et al.*, 2006; SWITZER *et al.*, 2009). As comparações de aminoácidos das Tax-3 e Tax-4 mostram que essas proteínas têm mais homologia com a Tax-2 do que com a Tax-1 em regiões importantes para a ativação da via não-canônica do NF-κB. No entanto, não foi verificado se Tax-3 e/ou Tax-4 ativam a via NF-κB não canônica (HIGUCHI & FUJII, 2009).

### **1.3.2.2 HBZ**

A HBZ (*HTLV-1 basic leucine zipper factor*) é encontrada em todas as células infectadas por HTLV-1, inibe a transativação da transcrição viral mediada por Tax a partir da 5' LTR, por se heterodimerizar com CREB2, Elemento de Ligação ao CREB, o que impede o recrutamento para as regiões TRE (Elemento de Resposta a Tax) e CRE (Elemento de Resposta a AMPc) transcricional, indicando que HBZ pode ser um regulador negativo da transcrição viral (THEBAULT *et al.*, 2004).

De maneira interessante, o RNAm de HBZ também apresenta algumas funções que contribuem para o estabelecimento da patogênese, que apesar de ser persistentemente expresso é em baixo nível. Foi demonstrado que a expressão da proteína HBZ induz tanto o linfoma quanto a doença de caráter inflamatório, sendo ainda responsável pela manutenção da persistência do HTLV-1 (SATOU *et al.*, 2006).

Estudos demonstram que pacientes com Leucemia de células T do Adulto expressam persistentemente HBZ, mas não Tax, e que tanto o RNAm de HBZ quanto a proteína demonstraram estimular a proliferação de células T (GIAM & SEMMES *et al.*, 2016). O RNAm de HBZ é capaz de interagir com E3F1 e assim contribuir para a proliferação celular. Além disso, o RNAm também aumenta a taxa de transcrição do gene *survivin*, que é um gene antiapoptótico. Assim essas funções do RNAm de HBZ estão associadas com a indução da proliferação e com a inibição da apoptose contribuindo para as patologias associadas ao HTLV-1 (MA *et al.*; 2016).

#### **1.4 Ciclo de multiplicação do HTLV-1**

O HTLV-1 infecta principalmente células T CD4+, mas os linfócitos T CD8+, linfócitos B, células dendríticas e células da glia (astrócitos e células da microglia) são também utilizadas como reservatórios pelo vírus *in vivo* (GRANT *et al.*, 2002).

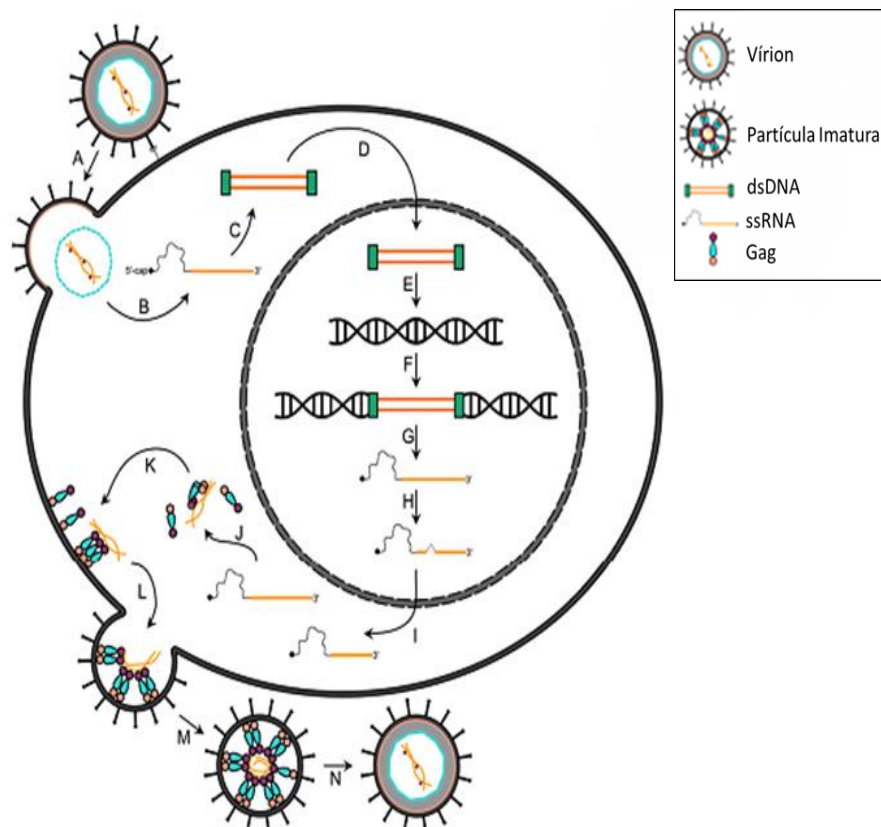
##### **1.4.1 Receptores e penetração viral**

Os retrovírus penetram nas células através da interação entre as glicoproteínas do envelope (Env), glicoproteína de superfície (SU) e glicoproteínas transmembrana (TM) com os receptores celulares (OVERBAUGH *et al.*, 2001). Manel e colaboradores em 2003 identificaram o Transportador de Glicose GLUT-1 como sendo o receptor do HTLV, mediando a sua penetração na célula, além de participar da formação de sincício e fusão celular mediada por Env (LAMBERT *et al.*, 2009). No processo de penetração do HTLV-1 na célula, a proteína de superfície do vírus (gp46) se associa aos receptores proteoglicanos de heparan-sulfato (HSPGs), presentes na superfície das células alvo (JONES *et al.*, 2005). Lambert e colaboradores (2009) demonstraram que os HSPGs aumentam a formação de complexos entre o HTLV-1 e a neuropilina-1 (NRP-1), que é necessária para a ligação do vírus à célula alvo. A NRP-1 também age como um intermediário, apresentando as partículas virais associadas ao HSPG ao transportador de glicose-1 (GLUT-1), formando o complexo HSPG/NRP-1/GLUT-1 e favorecendo a fusão do envelope viral (LAMBERT *et al.*, 2009).

### 1.4.2 Ciclo de multiplicação

O ciclo de multiplicação do HTLV é semelhante ao de outros retrovírus. A penetração ocorre pela interação entre o receptor celular GLUT-1 e a glicoproteína gp46 do envelope viral, levando a uma mudança conformacional que expõe a proteína transmembrana gp21, permitindo assim a fusão entre a membrana celular e o envelope viral e a entrada do vírus no citoplasma, que em seguida sofre desnudamento parcial. A transcrição do RNA em cDNA é mediada pela enzima transcriptase reversa, originando uma fita simples de DNA. Esta é posteriormente duplicada e transportada para o núcleo celular, integrando-se aleatoriamente ao genoma da célula, pela ação da enzima integrase, formando o provírus. Uma vez no genoma da célula, o DNA proviral fica permanentemente integrado ao mesmo (MARTIN *et al.*, 2016).

A fase tardia da multiplicação viral tem início na transcrição de RNAs mensageiros a partir do DNA viral. O RNA é sintetizado como um longo transcrito primário, que após processamento se transforma em vários transcritos estáveis e somente após essa etapa os RNAm são transportados para o citoplasma, onde serão traduzidos (GOFF, 2013) (Figura 7).



**Figura 7: Etapas da multiplicação viral.** (A): ligação entre receptores virais e celulares; (B) penetração e desnudamento; (C) transcrição reversa; (D) entrada do DNA proviral no núcleo da célula; (E, F) integração do DNA proviral no DNA genômico; (G) transcrição do provírus; (H) processamento dos RNAs mensageiros virais; (I) exportação do mRNA viral para o citoplasma; (J) tradução; (K) proteínas e o material genético viral são transportados para próximo da membrana; (L) montagem da partícula viral; (M) liberação do vírus; (N) maturação. Adaptado de MARTIN *et al.*, 2016

## 1.5 Transmissão

O HTLV pode ser transmitido pela via vertical, principalmente através da amamentação, mas também através de intercuro sexual e pela via parenteral por transfusões sanguíneas, compartilhamento de agulhas e seringas contaminadas com o vírus (CATALAN-SOARES *et al.*, 2005).

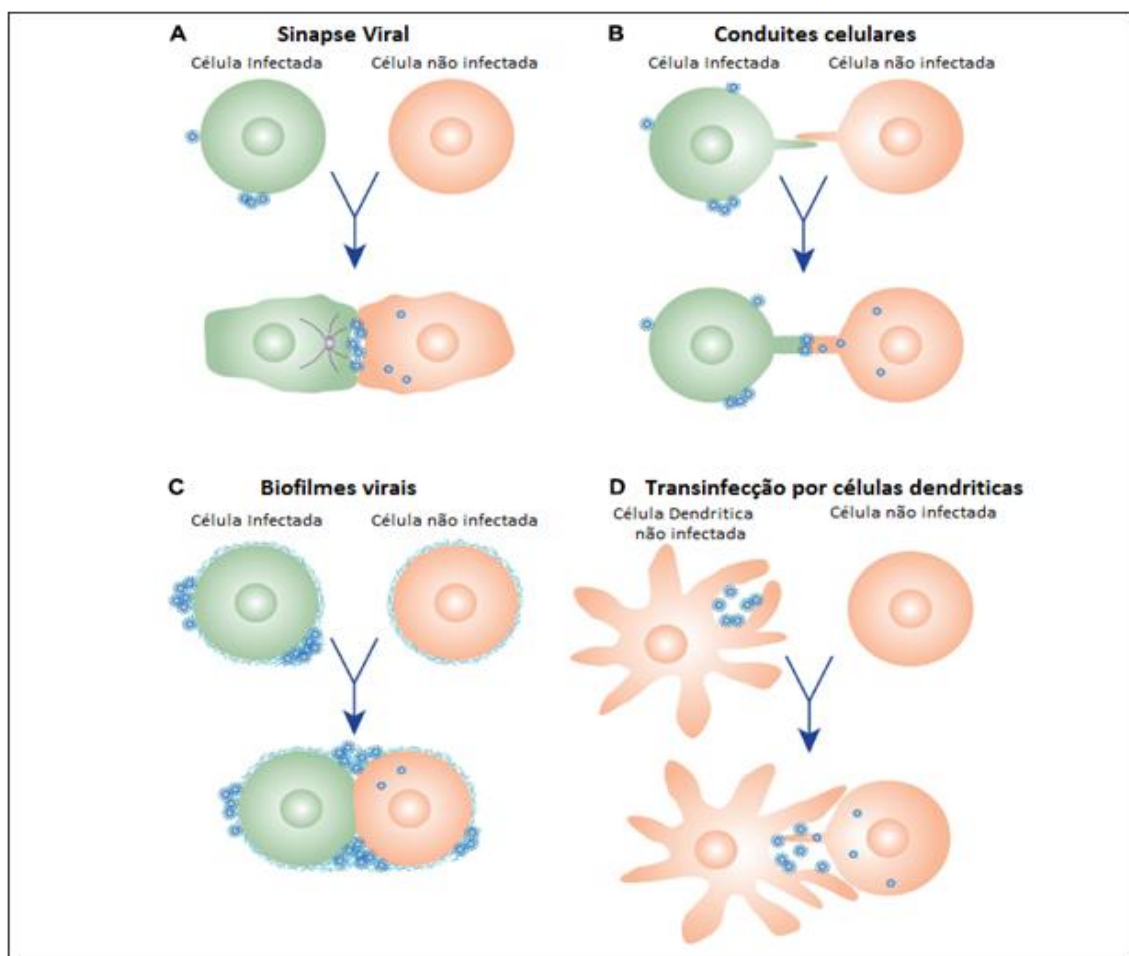
Os eventos de transmissão zoonótica do vírus linfotrópico de células T simeas 1 (STLV-1) para seres humanos ocorrem após o contato com primatas não humanos através de mordidas ou abate de carne de caça nas regiões que ainda praticam a caça na África, estabelecendo o surgimento de novas infecções por HTLV-1 em seres humanos. Um estudo recente relatou que mais de 8% dos indivíduos mordidos por primatas não-humanos na África estão infectados com HTLV-1 (FILIPPONE *et al.*, 2015; MARTIN *et al.*, 2016).

O HTLV no organismo do portador é transmitido célula-célula por expansão clonal, que ocorre durante a divisão da célula infectada, através da replicação do provírus integrado no genoma da célula hospedeira. A transmissão célula-célula pode ocorrer de quatro formas: sinapse virológica, formação de condúites celulares, presença de estruturas adesivas extracelulares durante a montagem do vírus (formação de biofilme) e propagação por células dendríticas (CARPENTIER *et al.*, 2015).

A transmissão célula-célula via sinapse virológica ocorre através da interação entre a proteína Tax e ICAM-1 (molécula de adesão intracelular 1), que aumenta a polarização do MTOC (centro de organização dos microtúbulos) no ponto de contato entre as células e facilita a interação entre o ICAM-1 e o LFA-1 (antígeno associado ao linfócito 1), regulando positivamente a transmissão do vírus (IGAKURA *et al.*, 2003).

A proteína p8 está relacionada à disseminação viral, uma vez que forma uma rede entre as células T infectadas e não infectadas, induzindo a formação de estruturas denominadas condúites (VAN-PROOYEN *et al.*, 2010).

A transmissão de partículas célula-célula também ocorre a partir da formação de uma estrutura extracelular rica em carboidratos, semelhante a um biofilme na superfície das células. Essas estruturas são compostas por colágeno, agrina, tetherina e galectina-3 e aparentemente concentram as partículas de HTLV-1 em um único local para aumentar a probabilidade de infecção de uma célula alvo permissiva (PAIS-CORREIA *et al.*, 2010). Nesses biofilmes também se encontra, além das partículas virais, proteínas estruturais, os antígenos CD4, CD150, CD25, CD70 e CD80 e a proteína Tax, que possivelmente modula o nível desses antígenos no biofilme viral (TARASEVICH *et al.*, 2015; MARTIN *et al.*, 2016) (Figura 8).



**Figura 8: Formas de transmissão célula-célula do HTLV-1.** (A) Sinapse viral. (B) Formação de conduítes. (C) Estruturas adesivas e montagem extracelular. (D) Células dendríticas. Adaptado de: PIQUE & JONES, 2012; Modificado por: FRANCO, 2015.

## 1.6 Diagnóstico

O diagnóstico da infecção pelo HTLV-1 inclui testes sorológicos de triagem, que detectam anticorpos específicos para os antígenos do vírus, como o ELISA

(Ensaio Imunoenzimático), teste de quimioluminescência e o ensaio de aglutinação de partículas, este último não utilizado no Brasil. Os testes confirmatórios são ensaios de *Western Blot*, imunofluorescência, LIA (*Line Immunoassay*) e a reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa ou qualitativa (GESSAIN & CASSAR, 2012; MARTINS *et al.*, 2012).

Os sistemas diagnósticos amplamente utilizados baseiam-se nas proteínas Env e Gag, está última clivada nas proteínas p15, p19 e p24 que são bem caracterizadas como antígenos e estão presentes em muitos ensaios comerciais. Entretanto, os recombinantes do Env gp21 presentes em testes confirmatórios comerciais estão relacionados com resultados falsos positivos e indeterminados (MARIN *et al.*, 2001). Resultados falso-positivos representam um desafio, em especial para os hemocentros, pois levam ao desperdício desnecessário de bolsas de sangue, causam ansiedade ao doador e implicam na adoção de um processo mais complexo e caro para a retestagem de amostras. Um estudo recente realizado pela Fundação Hemominas mostrou uma queda de 2 a 3 vezes na frequência de soropositivos comparando o primeiro teste (primeira amostra) com a coleta avaliados em kits distintos, a frequência média caindo de 0,14% para 0,006% (MARTINS *et al.*, 2024).

No Brasil, o Sistema Único de Saúde considera o diagnóstico do HTLV uma ferramenta primordial para o controle e bloqueio da transmissão do HTLV-1/2, em especial em grupos chaves como em grupos indígenas, pessoas em situação de vulnerabilidade social, usuários de drogas injetáveis, mas também em mulheres em fase pré-natal e durante a amamentação (ROSADAS *et al.*, 2021).

Diferentes plataformas de diagnóstico têm sido requeridas para melhorar a detecção das amostras, como a desenvolvida em nosso grupo de pesquisa por Franco e colaboradores em 2022, que considerou antígenos de proteínas estruturais e também da proteína Tax (FRANCO *et al.*, 2022). Essa abordagem permite a triagem do HTLV-1/2, mas também poderia reconhecer grupos específicos de portadores, como é o caso do grupo denominado *Tax-only*, portadores que possuem sequência defectiva do vírus e apresentam resposta somente à proteína Tax e que já foram relatados nos Estados Unidos (ZUCKER-FRANKLIN *et al.*, 2002), Chile (RAMIREZ *et al.*, 2003) e, mais recentemente, na Argentina (GALLEGO *et al.*, 2020).

## 1.7 Doenças associadas ao HTLV-1

A infecção pelo HTLV-1 permanece em 95% dos casos assintomática por toda a vida e as doenças ocorrem em torno de 5% das pessoas infectadas. As principais doenças associadas ao vírus são a leucemia/linfoma de células T do adulto (ATL) e a mielopatia associada ao HTLV/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP). Outras doenças inflamatórias, tais como uveíte, polimiosite, artrite, alveolite, síndrome de sicca, ceratite intersticial, síndrome de Sjögren, tireoidite de Hashimoto (MARTIN *et al.*, 2014), bem como dermatite infecciosa também são associadas ao HTLV-1 (ANDRADE *et al.*, 2019). O HTLV-2 não está claramente associado com doenças, mas tem sido associado com o aumento da susceptibilidade a infecções bacterianas, com um impacto significativo na morbidade em portadores (MARTINS *et al.*, 2012).

### 1.7.1 ATL

A Leucemia/Linfoma de Células T do Adulto (ATL) foi a primeira neoplasia humana relacionada a um retrovírus. É um quadro relativamente raro, somente uma subpopulação de portadores desenvolve ATL após um longo período de latência (TAYLOR *et al.*, 2005), sendo 4-6% dos homens e 2.6% das mulheres de acordo com estudos no Japão, o país com maior número de casos de ATL relatado (ARISAWA *et al.*, 2000). No entanto, faltam estudos mais recentes para atualizar as informações sobre o risco dessa doença na população japonesa em geral (IWANAGA, 2020). No Brasil e em outros países a ATL é rara, não chegando a 2% dos casos, apesar de evidências da falta de diagnóstico (ROSADAS *et al.*, 2020)

A ATL apresenta uma ampla variedade de manifestações clínicas, incluindo sintomas leucêmicos, linfadenopatia, hepatomegalia, esplenomegalia, lesões de pele, hipercalcemia e infiltração de órgãos como o sistema nervoso central e o trato gastrointestinal. Sintomas e sinais incluem dor abdominal, diarreia, ascite, icterícia, derrame pleural, tosse, escarro, febre e inconsciência devido à hipercalcemia e/ou infecções oportunistas. Classificada em cinco subtipos clínicos, a ATL envolve transformação de células T infectadas com HTLV-1, com as proteínas Tax e HBZ desempenhando papéis essenciais. A patogênese da ATL está associada a variantes virais, características do hospedeiro e fatores ambientais, sendo a

interação complexa e ainda não totalmente compreendida (MA *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2016; WATANABE, 2017).

### **1.7.2 HAM/TSP**

Em 1985, uma pesquisa examinou portadores do HTLV-1 na Jamaica e Colômbia (RODGERS-JOHNSON *et al.*, 1985) que manifestavam alterações neurológicas, tais como processos debilitantes de evolução lenta, disfunção sensorial, paraplegia espástica ou esclerose lateral primária. Esse conjunto de sintomas foi designado como Paraparesia Espástica Tropical (TSP), associado à presença de anticorpos anti-HTLV-1. No ano seguinte, em 1986, no Japão, um quadro clínico semelhante à TSP foi identificado em pacientes com anticorpos anti-HTLV-1, sendo denominado Mielopatia Associada ao HTLV-1 (HAM) (OSAME *et al.*, 1986). Posteriormente, em 1988, essas distintas patologias foram reconhecidas como uma única entidade e passaram a ser denominadas HAM/TSP.

A HAM/TSP (Mielopatia Associada ao HTLV/Paraparesia Espástica Tropical) é caracterizada por uma paraparesia espástica de lenta progressão, na qual ocorre meningomielite crônica das massas branca e cinzenta da medula espinhal, seguida por degeneração dos axônios, afetando a medula lombar e torácica (COOPER *et al.*, 2009). A HAM/TSP evolui clinicamente em duas etapas, uma que se inicia como uma reação inflamatória, que compromete a integridade da barreira hematoencefálica e aumenta o potencial de migração dos linfócitos para o sistema nervoso central (SNC), sendo seguida de um longo estágio de desmielinização dos neurônios (ARAÚJO & SILVA, 2006).

A HAM/TSP caracteriza-se clinicamente por espasticidade e parestesia nas extremidades inferiores, hiperreflexia, clônus e/ou sinal de Babinski, queixas urinárias, dor lombar, impotência e diminuição da libido, constipação intestinal, sensibilidade vibratória diminuída e sinal de Hoffmann (GRANT *et al.*, 2002).

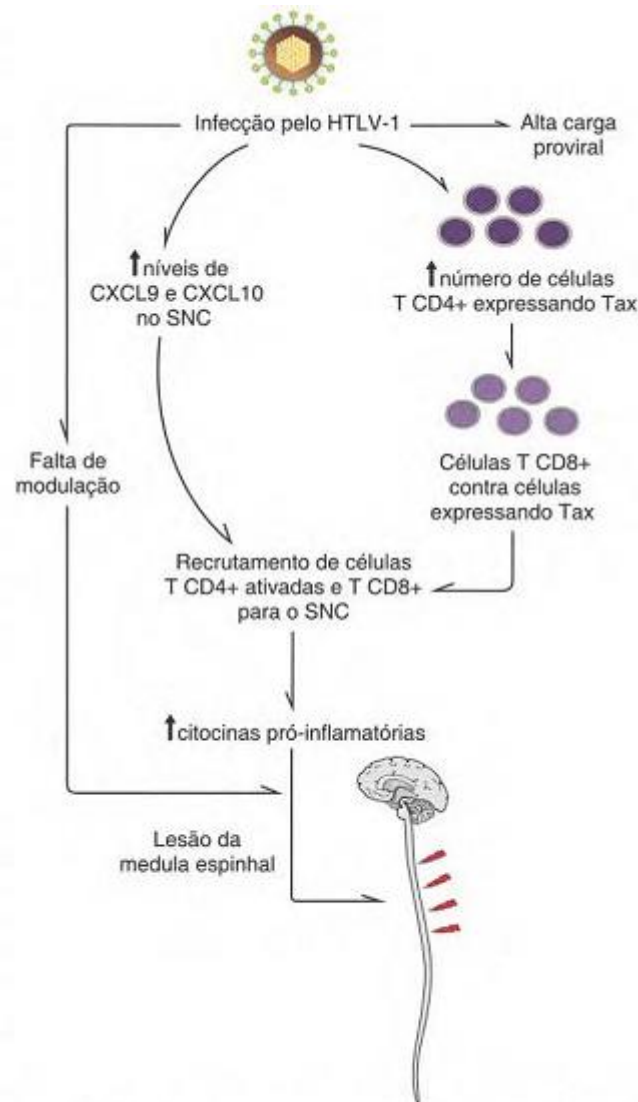
A doença é frequente no Brasil, sendo detectada em todos os estados com significativa heterogeneidade nas regiões geográficas. Estima-se que a prevalência varia entre 0,25% a 4% dos indivíduos infectados e aumenta com a idade (MILAGRES *et al.*, 2002), sendo a incidência três vezes maior em mulheres do que em homens. Além disso, a progressão da doença é mais rápida em mulheres, sendo este fato associado ao surgimento dos sintomas após a gravidez e antes da

menopausa, o que sugere uma relação da variação hormonal em sua patogênese (UCHIYAMA, 1997).

O mecanismo patológico que desencadeia a HAM/TSP não está totalmente elucidado, porém, três principais hipóteses são sugeridas: citotóxica, autoimune e processo auto-agressivo. A hipótese citotóxica propõe que células da glia podem ser infectadas pelo HTLV-1 e expressar antígenos na superfície celular que podem se tornar alvo de linfócitos T citotóxicos CD8+ que atravessaram a barreira hematoencefálica e provocariam a morte dessas células (OSAME *et al.*, 2002). Uma barreira hemato-encefálica comprometida pode permitir a entrada de constituintes do soro, especialmente IgG anti-Tax (anticorpos autoreativos). Vários mecanismos, incluindo a presença de macrófagos perivasculares com elevada produção de citocinas indicam a disfunção da barreira hematoencefálica, mas também o aumento da resposta do tipo Th1, com a presença de níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, tais como interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), TNF- $\alpha$ , interleucina (IL)-1 $\beta$ , IL-6, Ligante 10 de Quimiocina com Motivo C-X-C (CXCL-10) e fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) no líquido cefalorraquiano, induzidos por Tax (NAKAMURA *et al.*, 1993; LEPOUTRE *et al.*, 2009), ou seja, citocinas que induzem a melhora da pinocitose endotelial cerebral e alteram as junções endoteliais, alterando a permeabilidade da barreira hematoencefálica (QUAGLIARELLO *et al.*, 1991; RAMILO *et al.*, 1990).

Na proposta do processo autoimune argumenta-se que antígenos próprios das células da glia são semelhantes aos virais e que os linfócitos, ao reconhecerem os antígenos virais periféricos e migrarem para o SNC, desencadeiam uma resposta autoimune que pode levar à morte de células vizinhas. Por reação cruzada, os anticorpos anti-Tax do HTLV-1 reconhecem a ribonucleoproteína nuclear A1 (hnRNP A1), expressa em neurônios do SNC, o que levaria ao impedimento do disparo do estímulo nervoso nas células afetadas (LEE *et al.*, 2006; OSAME *et al.*, 2002; LEVIN *et al.*, 2002).

A terceira teoria, processo auto agressivo, é de que os linfócitos T CD4+ infectados e linfócitos T CD8+ específicos anti-HTLV-1 que migraram através da barreira hematoencefálica para o SNC danificam as células vizinhas, tais como as células da glia e neuronais, em decorrência da resposta T citotóxica desencadeada no SNC, provocando a lesão do órgão (OSAME *et al.*, 2002) (Figura 9).



**Figura 9: Possíveis mecanismos para o desenvolvimento da HAM/TSP.** O aumento da carga proviral representada por linfócitos T CD4+ que expressam Tax, leva à liberação das quimiocinas CXCL9 e CXCL-10, migração de células T CD8+ ativadas para o sistema nervoso central e produção de grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias, resultando em lesão da medula espinhal. Adaptado de: BITTENCOURT & FARRÉ, 2008

### 1.7.3 Síndrome Intermediária associada ao HTLV

Apesar da infecção pelo HTLV-1 representar quadros com baixa morbidade associada ao HTLV-1, estudos indicam que cerca de 30% dos indivíduos apresentam manifestações neurológicas que não se enquadram nos critérios de diagnóstico para HAM/TSP de acordo com os atuais critérios de classificação clínica. Isso levanta a possibilidade de que a taxa de morbidade pelo HTLV-1 pode não ser tão baixa como indicado na literatura (ARAÚJO *et al.*, 2009; HAZIOT *et al.*, 2019).

Estudos recentes de coortes longitudinais mostram que parte dos pacientes inicialmente assintomáticos apresentavam sintomas neurológicos leves que não

satisfaziam os critérios para serem classificados como casos de HAM/TSP, mas que os distinguia de portadores completamente assintomáticos. Os indivíduos infectados pelo HTLV-1 nessa fase intermediária possuem uma "Síndrome Intermediária" (SI), manifestando um sinal neurológico juntamente com dois sinais não neurológicos (DIXON *et al.*, 2023; HARDING *et al.*, 2022). As manifestações neurológicas subclínicas são frequentes, sendo relatada em 30% de uma coorte no estado da Bahia (TANAJURA *et al.*, 2015) e em 24% nos pacientes de um grupo de São Paulo (HAZIOT *et al.*, 2019).

### **1.8 Resposta imune**

A infecção pelo HTLV-1 é uma infecção latente, que desencadeia uma resposta imune celular que envolve linfócitos T citotóxicos específicos, os quais induzem mecanismos de resposta celular e humoral. Esses linfócitos reconhecem predominantemente a proteína Tax, seguida de epitopos das proteínas Gag, Env e outros produtos gênicos não estruturais (p30, p12 e p13) (JACOBSON *et al.*, 1996).

Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> representam o principal reservatório do vírus no organismo. Células infectadas por HTLV-1 expressam epitopos virais que ativam Linfócitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos e, simultaneamente, secretam citocinas pró-inflamatórias e neurotóxicas, como TNF e INF- $\gamma$ . Estudos com pacientes HAM/TSP revelaram altos níveis dessas citocinas nas lesões do cordão espinhal e no LCR (líquido cefalorraquidiano), com células T CD4<sup>+</sup> predominantes em infiltrados no SNC. Isso sugere a participação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> nos mecanismos imunopatogênicos associados às manifestações clínicas da doença (SABOURI *et al.*, 2008; MELAMED *et al.*, 2015).

Em indivíduos que desenvolvem HAM/TSP, observa-se um aumento significativo das células T CD8<sup>+</sup> efetoras e de memória específicas para a proteína Tax. Fatores correlacionados, como a alta carga proviral (sustentada pela produção persistente do vírus e pela divisão mitótica), elevados títulos de anticorpos no líquido cefalorraquidiano e no soro, aumento na produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, além do aumento na proliferação espontânea de linfócitos, podem estar inter-relacionados com o desenvolvimento do processo neurodegenerativo nos indivíduos infectados, sendo alvos de estudo para o prognóstico da doença (MELAMED *et al.*, 2015).

## 1.9 Carga proviral e HAM/TSP

A infecção pelo HTLV-1 não produz carga viral detectável no plasma de um indivíduo infectado, diferente de outros retrovírus, refletindo as principais vias de multiplicação viral: a sinapse viral, na qual ocorre a passagem do vírus de uma célula infectada para uma célula não infectada (IGAKURA *et al.*, 2003) e a proliferação de linfócitos que apresentam o genoma viral integrado ao cromossomo da célula hospedeira, sendo essas células reguladas pela Tax, que promove a expansão seletiva do linfócito T infectado (GONÇALVES, *et al.*, 2008). Então, a medida da carga viral é chamada de carga proviral (CPV) que é mensurada pelo número de cópias de DNA proviral inserido em células mononucleares do sangue periférico (PBMC).

Em geral, a média da carga proviral em um portador assintomático é mensuravelmente mais baixa em relação aos pacientes que apresentam ATL, HAM/TSP (YOSHIBA *et al.*, 1989; GESSAIN *et al.*, 2002; NAGAI *et al.*, 1998; NITTA *et al.*, 2003), uveíte, artrite (YAKOVA *et al.*, 2005), ou outras doenças associadas ao HTLV-1 de caráter inflamatório, embora haja sobreposição de valores. Existem portadores assintomáticos com alta carga proviral (>1% de PBMC infectadas) e pacientes com HAM/TSP com baixa carga proviral (<1% de PBMC infectadas), indicando que uma carga proviral alta não é necessária nem suficiente para causar HAM/TSP. A hipótese principal na patogênese da HAM/TSP postula que uma exacerbação da ativação de linfócitos CD4+ e/ou CD8+ é um evento chave no desencadeamento da doença (GRETEN *et al.*, 1998; JACOBSON *et al.*, 2002; GOON *et al.*, 2004).

Alguns estudos sugerem a importância da carga proviral associada a outros fatores no desenvolvimento dessa doença, tais como as citocinas (FURUKAWA *et al.*, 2003; NITTA *et al.*, 2003; STARLING, 2010), sugerindo que a carga proviral não está diretamente relacionada aos sintomas clínicos, mas pode estar relacionada ao início e progressão da HAM/TSP (MATSUZAKI *et al.*, 2001).

A carga proviral assume também um papel importante quanto à eficiência da transmissão. Valores altos indicam maior probabilidade de transmissão, seja pela transmissão vertical (principalmente por aleitamento materno) ou pela horizontal (relação sexual, principalmente do homem para a mulher) (NITTA *et al.*, 2003).

Uma variação na carga proviral pode ser observada em caso de desenvolvimento da doença. A maioria das pessoas infectadas com HTLV-1 permanecem como portadores assintomáticos saudáveis com carga proviral estável. A resposta CTL ao HTLV-1 desempenha o papel principal na determinação do equilíbrio entre a carga proviral e o controle da infecção (BANGHAM *et al.*, 2005). Além da taxa de lise promovida por células CD8+, a probabilidade de uma célula infectada expressar a Tax parece influenciar a carga proviral do indivíduo, tendo observado que indivíduos com as maiores cargas provirais apresentam um alto nível de expressão de Tax nas células infectadas (KUBOTA *et al.*, 1998).

Um modelo da evolução da patogênese do HTLV-1 na HAM/TSP baseado na carga proviral proposto por Grant e colaboradores (2002) indica que logo após a infecção a CPV seria alta, com um rápido pico seguido por uma queda que se manteria equilibrada, correspondendo ao período de latência clínica. Se a resposta imune do portador for capaz de manter esse nível estável, teria-se um quadro assintomático; se a carga proviral sair do equilíbrio e subir, o portador desenvolveria a HAM/TSP alcançando um novo platô e permanecendo relativamente estável durante o percurso da doença.

A carga proviral no sangue pode ser útil para monitorar a atividade da doença em ensaios terapêuticos, visto que flutuação da carga proviral foi observada em pacientes com HAM/TSP submetidos ao tratamento com corticosteróides, causando um aumento na carga (TAKENOUCI *et al.*, 2003). Por outro lado, os medicamentos anti-retrovirais causaram uma diminuição no perfil de citocinas pró-inflamatórias (TAYLOR *et al.*, 1998).

### **1.10 Anticorpos anti-Tax**

Os anticorpos anti-Tax têm sido relatados como bons marcadores da infecção, e correlacionam-se com uma maior probabilidade de transmissão do vírus, além de influenciar no aumento da carga proviral. Dados relatam que cerca de 90% dos pacientes com HAM/TSP, 31% dos pacientes ATL e 50- 60% de portadores assintomáticos desenvolvem uma resposta anti-Tax (RUDOLPH *et al.*, 1994; LYDY *et al.*, 1998).

Vários estudos apontam que anticorpos específicos de HTLV-1 contra a Tax estão elevados em pacientes HAM/TSP em comparação com portadores assintomáticos ou pacientes com ATL (CHEN *et al.*, 1997; SHINZATO *et al.*, 1993).

Utilizando o sistema de imunoprecipitação de luciferase (LIPS) para quantificar anticorpos anti-HTLV em pacientes avaliados longitudinalmente, Burbelo e colaboradores, em 2008, encontraram uma elevada taxa, duas vezes maior, de anticorpos anti-Tax em pacientes HAM/TSP comparado com portadores assintomáticos, uma relativa estabilidade no nível dos anticorpos e uma fraca correlação com a carga proviral. O mesmo estudo também avaliou a resposta anti-Gag e anti-Env, sendo esse último apontado um melhor marcador para a HAM/TSP (BURBELO *et al.*, 2008). De maneira interessante, outro estudo avaliando amostras de indivíduos da Jamaica utilizando a mesma técnica, mostrou uma diferença significativa ao comparar portadores assintomáticos e HAM/TSP com as respostas contra Gag e Env, mas não com os anticorpos anti-Tax (ENOSE-AKAHATA *et al.*, 2012).

Utilizando-se uma técnica de diagnóstico baseado em um sistema de infecção/transfecção para a expressão da porção C-terminal de Tax em células Vero amostras de soro de indivíduos portadores do HTLV-1 (coorte GIPH) foram avaliadas para a reatividade anti-Tax. Encontrou-se uma resposta de anticorpos IgG anti-Tax em 90% dos pacientes com HAM/TSP e 50% em assintomáticos (de Souza *et al.*, 2010). Posteriormente, um novo estudo avaliando quatro grupos distintos de portadores: assintomáticos, sintomáticos que não preenchiam os critérios para HAM/TSP (oligossintomáticos), doentes reumatológicos e portadores da HAM/TSP da mesma coorte, apontou diferença nos mesmos comparando-se a resposta IgG anti-Tax. O grupo HAM/TSP mostrou maior reatividade de IgG anti-Tax em relação ao grupo de indivíduos com doença reumatológica ( $p < 0,001$ ) e também com indivíduos oligossintomáticos e assintomáticos ( $p < 0,05$ ). Houve diferença na comparação de indivíduos com doença reumatológica x oligossintomáticos ( $p < 0,05$ ). Nenhuma relação entre essa resposta e a carga proviral (de Souza *et al.*, 2011).

Em 2009, nosso grupo de pesquisa avaliou a resposta de IgG e IgG1 anti-HTLV-1 utilizando as células MT2 (persistentemente infectadas pelo HTLV-1) como suporte sólido em ensaios de imunofluorescência por citometria de fluxo. O teste mostrou um alto desempenho em distinguir pacientes com mielopatia de portadores assintomáticos. Em seguida, avaliou-se a reatividade do soro de pacientes (IgG) em sistema de western blot, utilizando antígenos totais das células MT2. Uma diferença de reatividade estatisticamente significativa foi observada entre o grupo de assintomáticos e o grupo apresentando mielopatia, onde esses últimos reagiram

fortemente aos antígenos Gag (p15, p19 e p24) e Env (gp21 e gp46). Embora não tenha havido uma diferença estatística entre os grupos na reatividade anti-Tax (p40), uma maior porcentagem do grupo apresentando mielopatia reagiu mais fortemente a esse antígeno (COELHO-DOS-REIS *et al.*, 2009).

Recentemente foi desenvolvido, em cooperação FIOCRUZ-MG e Fundação HEMOMINAS, um ensaio de citometria de fluxo [FC-Duplex IgG1 (HTLV-1/2)] utilizando-se como suporte sólido células permanentemente infectadas MT2 e MoT para a detecção da resposta IgG1 anti-HTLV-1 e anti-HTLV-2, respectivamente. Os pesquisadores obtiveram altos índices de desempenho tanto na separação das amostras HTLV-1/2 positivas em relação à amostras negativas, quanto na diferenciação do HTLV-1 e HTLV-2. Esse mesmo estudo mostrou que a resposta IgG1 anti-HTLV-1 está associada a um acentuado perfil pró-inflamatório mediado por IFN- $\gamma$  e TNF, o que se correlaciona inversamente com os níveis de IL-10 encontrados em portadores assintomáticos (PAIVA *et al.*, 2022).

O perfil de resposta imunológica de pacientes assintomáticos, portadores de HAM/TSP e ATL mostram que as principais imunoglobulinas presentes no soro de pacientes infectados pelo HTLV-1 foram IgG, IgM e IgA, com concentrações mínimas de IgE nos grupos de HAM/TSP e ATL. Entre as subclasses de IgG, a IgG1 foi a mais prevalente em resposta aos antígenos do HTLV-1, seguida por IgG3 e IgG2. A IgG4 não foi detectada em pacientes de nenhum dos grupos. Além disso, os níveis de IgG1 e IgG3 foram significativamente mais altos em pacientes com HAM/TSP em comparação com os indivíduos com ATL e os assintomáticos (LAL *et al.*, 1993).

A presença de anticorpos anti-Tax no soro materno, alto título de anticorpos anti-HTLV-1 e uma elevada carga proviral no PBMC estão associados com o aumento do risco de transmissão vertical do vírus (HISADA *et al.*, 2002; KASHIWAGI *et al.* 1990 ). Os anticorpos anti-Tax também estão associados com a transmissão sexual, especialmente do homem para a mulher, devido ao fato de que portadores que possuem anticorpos anti-Tax possuem uma quantidade maior de células T infectadas nos fluidos corpóreos (KAPLAN *et al.*, 1996).

Os pacientes que apresentam a HAM/TSP geralmente expressam elevados títulos de anticorpos, principalmente IgG que reconhecem especificamente a região C-terminal de Tax (LEVIN *et al.*, 2002; LAL *et al.*, 1994). Esta região, que é de natureza hidrofílica e de conformação  $\alpha$ -hélice, apresenta os epítomos mais

imunodominantes (LAL *et al.*, 1994). Estudo recente do nosso grupo comparou a imunodominância das regiões N-terminal, Central e C-terminal da proteína Tax do HTLV-1 analisando microarranjos peptídicos de última geração. Foram realizadas previsões *in silico* para verificar a presença de peptídeos de nove aminoácidos presentes ao longo de Tax restritos ao haplótipo (HLA)-A2.02\*01, bem como para verificar a capacidade de induzir processos pró-inflamatórios e citocinas reguladoras, como IFN- $\gamma$  e IL-4, respectivamente. Os resultados indicaram abundante reatividade dose-dependente para HLA-A\*02:01 em todas as regiões (N-terminal, Central e C-terminal), mas com *hotspots* específicos. A análise *in silico* mostrou maior frequência de peptídeos indutores de IFN- $\gamma$  (eixo Th1) na porção N-terminal, enquanto a porção C-terminal, objeto do presente trabalho, apresentou maior frequência de indutores de IL-4 (eixo Th2) (PEREIRA-SANTOS *et al.*, 2023).

Em contrapartida, os pacientes ATL apresentam baixos títulos de anticorpos específicos anti-Tax, embora apresentem elevados níveis de anticorpos anti-HTLV-1 (AKIMOTO *et al.*, 2007; YOKOTA *et al.*, 1989). Evidências experimentais sugerem que a resposta de anticorpos anti-Tax é encontrada em indivíduos em que não é ainda possível detectar anticorpos dirigidos contra proteínas estruturais do vírus (OKAYAMA *et al.*, 1991).

Estudos que fizeram observações prospectivas da reatividade IgG anti-Tax mostraram poucas variações em mães soropositivas avaliadas por 10,9 anos e a redução do nível de anticorpos foi relacionada com o surgimento da ATL (KUSUHARA *et al.*, 1995), o mesmo foi observado em 105 portadores avaliados por 8 anos (KASHIWAGI *et al.* 1990).

## 2. JUSTIFICATIVA

O HTLV infecta cerca de 20 milhões de pessoas em todo o mundo, e estimativas epidemiológicas apontam o Brasil como o país detentor do maior número absoluto de indivíduos infectados. Este vírus é causador de diversas patologias, dentre elas, a mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP), de caráter neurodegenerativo, e a leucemia/linfoma de células T do adulto (ATL), de caráter neoplásico. A infecção pelo HTLV-1/2 é considerada uma condição negligenciada no Brasil, com deficiências em serviços de diagnóstico, de atendimento e acompanhamento dos portadores do vírus. Faltam centros de referência para realizar o diagnóstico laboratorial, e para apoio e acompanhamento do portador. Embora a maioria dos portadores do HTLV permaneça assintomática ao longo da vida, os portadores que desenvolvem doenças associadas ao vírus, as quais são de evolução lenta e progressiva, apresentam importante perda da qualidade de vida e alto custo para o sistema de saúde.

Ainda existe uma grande lacuna de conhecimento quanto aos biomarcadores considerados essenciais para o desenvolvimento da Mielopatia Associada ao HTLV-1/Paraparesia Espástica Tropical (HAM/TSP). Estudos em todo o mundo têm procurado identificar marcadores prognósticos para a evolução da infecção e que estejam associados ao maior risco de adoecimento, objetivando o acompanhamento do portador e intervenções para controle da progressão da doença. Uma das principais investigações de biomarcadores é o estudo da carga proviral no sangue e/ou líquido cefalorraquidiano. Mas, apesar da carga proviral ser considerada um bom marcador prognóstico, observa-se baixa e alta cargas, tanto em pacientes sintomáticos quanto assintomáticos. Outros parâmetros tem sido então investigados para a compreensão da HAM/TSP e identificação de bons marcadores de patogênese.

Tem sido cada vez mais evidenciado por trabalhos em todo o mundo, a relação das proteínas regulatórias Tax e HBZ, que modulam a expressão de genes celulares e interferem em diversas vias de transdução de sinais do hospedeiro, com o desenvolvimento das doenças associadas ao HTLV-1. Destacando-se a proteína Tax, esta é uma fosfoproteína regulatória de 40 kDa que contém vários domínios que permitem que a mesma interaja com mais de 100 proteínas celulares pertencentes a vários grupos funcionais, regulando ou desregulando uma série de

genes celulares. A proteína Tax é também o principal alvo da resposta imune celular e humoral no hospedeiro, sendo, portanto, um importante parâmetro para a medida da cronificação e desfecho da infecção.

O presente estudo buscou avançar mais um passo neste sentido, tendo como objetivo mensurar IgG e IgM anti-Tax em plasma de indivíduos da coorte GIPH infectados com HTLV-1, ao longo da infecção, e avaliar se há associação dos níveis de anticorpos com a carga proviral, bem como com a condição clínica dos mesmos. Este trabalho é importante não somente por propor a avaliação de um parâmetro imunológico, mas, especialmente por avaliar como este parâmetro se comporta ao longo da infecção, além de avaliar correlações e associações com marcadores já estabelecidos, o que em conjunto contribui para o entendimento da patogênese da HAM/TSP.

### **3. OBJETIVO**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar os níveis de IgG, IgG1 e IgM anti-Tax no soro de portadores do HTLV-1 da coorte GIPH, assintomáticos e com HAM/TSP, buscando entender a resposta anti-Tax no desenvolvimento da HAM/TSP ou co-morbidades.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Expressar a porção C-Terminal da proteína Tax para uso como antígeno na pesquisa de anticorpos anti-Tax em amostras de plasma;
- Comparar os níveis de anticorpos IgG, IgG1 e IgM anti-Tax no plasma entre portadores assintomáticos e pacientes com HAM/TSP coletadas ao longo da infecção (média de intervalo de  $5,62 \pm 4,5$  anos; 301 amostras);
- Correlacionar os níveis de anticorpos IgG, IgG1 e IgM anti-Tax no plasma com a carga proviral quantificada no sangue periférico;
- Analisar o perfil de reatividade anti-Tax em seis casos de HAM/TSP incidente, em amostras seriadas coletadas antes ( $n=11$ ) e após ( $n=20$ ) o início da doença (média de intervalo de  $7,31 \pm 3,2$  anos);
- Analisar o perfil de reatividade anti-Tax em amostras provenientes de 10 indivíduos com HAM/TSP coletadas ao longo da infecção (média de intervalo de  $7,4 \pm 2,9$  anos).

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 População de Estudo

As amostras analisadas neste estudo (soro e/ou plasma) fazem parte do repositório biológico da coorte GIPH e foram coletadas após assinatura do TCLE, com aprovação do Comitê de Ética da Fundação HEMOMINAS (ANEXO). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (CAAE - Certificado de Apresentação para Apreciação Ética - 55618516.1.0000.5149) e posteriormente pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação HEMOMINAS (CAAE 55618516.1.3001.5118).

O Grupo Interdisciplinar de Pesquisa em HTLV (GIPH) sediado na Fundação HEMOMINAS integram projetos em colaboração com profissionais da Faculdade de Medicina e Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, Hospital Sarah Kubistchek e o Centro de Pesquisas René Rachou. Através de uma coorte aberta prevalente para acompanhamento de indivíduos com sorologia positiva para HTLV1/2, os trabalhos investigam aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais dessa população e de seus familiares. A missão deste grupo é produzir e divulgar para a comunidade conhecimento científico sobre HTLV 1/2 nas áreas epidemiológica, clínica e laboratorial, buscando o entendimento da história natural da infecção e fornecendo suporte para Programas de Saúde e formação de recursos humanos.

Foram avaliados neste estudo amostras provenientes de 78 portadores assintomáticos (AS) com acompanhamento (amostras disponíveis) de 1,08 a 16,58 anos (média  $5,62 \pm 4,5$ ) totalizando 301 amostras. Este grupo é formado por 48 mulheres e 30 homens que foram avaliados nas especialidades de neurologia, oftalmologia, dermatologia, reumatologia e psiquiatria para se conhecer os aspectos clínicos da infecção pelo HTLV-1.

No grupo dos portadores de HAM/TSP, foram avaliados 10 indivíduos, 34 amostras ao total, sendo 7 mulheres e 3 homens e com amostras disponíveis coletadas em acompanhamento de 0,73 a 13,5 anos (média de  $6,02 \pm 3,4$ ), também avaliados pelas mesmas especialidades clínicas.

Avaliou-se também pacientes que tiveram a confirmação da HAM/TSP durante o acompanhamento, sendo um total de seis casos de HAM/TSP incidente (iHAM), sendo cinco mulheres e um homem. As amostras seriadas foram coletadas

antes (n=11) e após (n=20) o início da doença durante acompanhamento de 2,25 a 13,5 anos (média de 7,31 anos  $\pm$  3,2).

**Tabela 1 Características dos indivíduos soropositivos para HTLV-1 e níveis de carga proviral de acordo com o estado clínico**

Grupo	Idade	Tempo de Acompanhamento	Número Total de Amostras	Sexo	CPV Alta	CPV Baixa	Total de Pacientes
Assintomático	14 - 70 (43,7 $\pm$ 13)	1,08 -16,58 (5,62 $\pm$ 4,5)	301	Mulher	26	22	48
				Homem	14	16	30
				Total			78
HAM/TSP	41 - 73 (59,5 $\pm$ 8,8)	8,5 - 11,17 (7,4 $\pm$ 2,9)	34	Mulher	5	2	7
				Homem	2	1	3
				Total			10
iHAM	38 - 63 (53 $\pm$ 8,19)	2,25 -13,5 (7,3 $\pm$ 3,2)	26	Mulher	5	—	5
				Homem	1	—	1
				Total			6

**Tabela 1:** Dados do grupo Assintomático, HAM/TSP e HAM incidente (iHAM) indicando a Idade e o Tempo de acompanhamento, em anos, com o menor e o maior tempo e em parenteses a média e o desvio padrão. Além disso, a quantidade de indivíduos com a Carga Proviral (CPV) alta e baixa.

#### 4.2 Quantificação da carga proviral do HTLV-1

A carga proviral foi mensurada no sangue periférico na Fundação HEMOMINAS, conforme descrito por MARTINS *et al.* (2016), utilizando o método de PCR em tempo real SYBR Green com iniciadores para a região *pol*. Os valores para a carga proviral de HTLV-1 foram expressos como o número de cópias provirais de HTLV-1/10.000 células e relatados como a função logarítmica dessa razão. A definição de uma carga proviral alta ou baixa foi no ponto de corte de 114 cópias de HTLV-1/10<sup>4</sup> células (log 2,06) (FURTADO *et al.*, 2012). Os dados foram cedidos pela Dra. Marina Lobato Martins, co-orientadora desta dissertação.

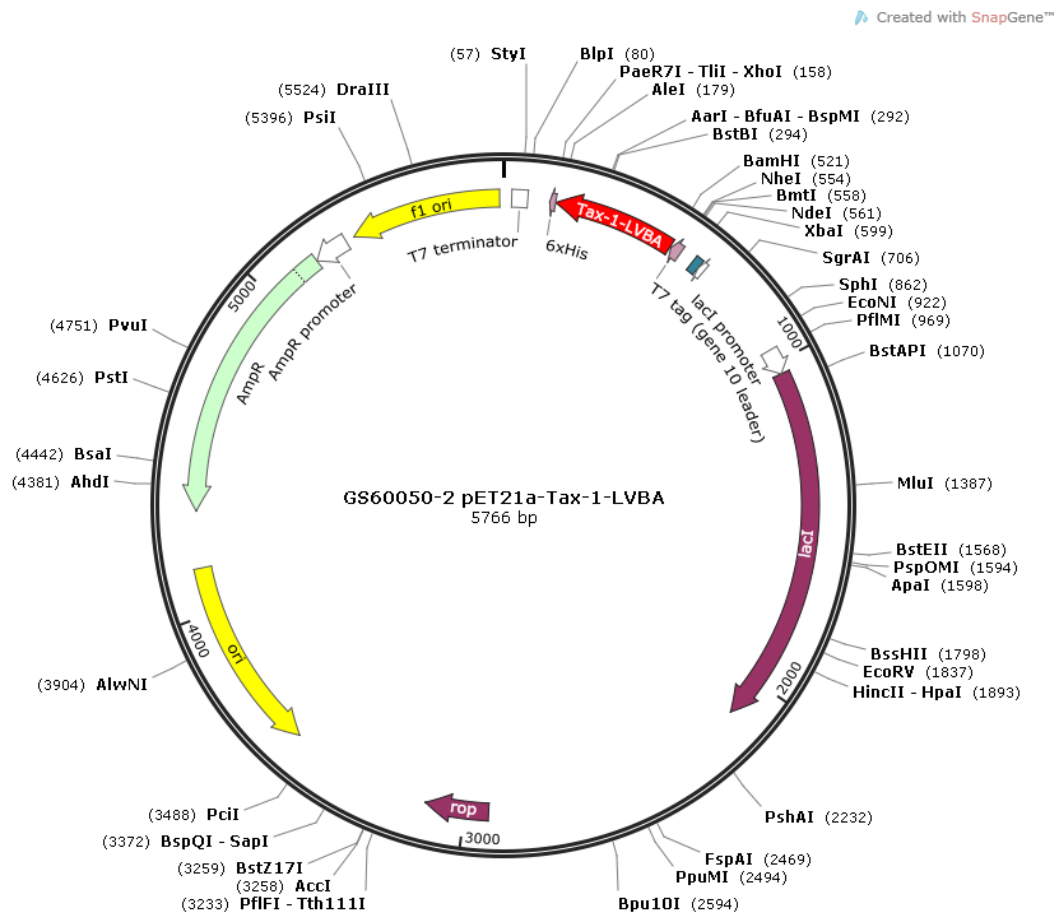
#### 4.3 Elaboração do plasmídeo recombinante Tax

A construção do sistema de expressão da Tax recombinante foi baseado no vetor pET-21a(+) e sintetizado pela *GenOne Biotechnologies*. Nessa construção, o gene que codifica a Tax recombinante está delimitado por sítios de restrição para as enzimas *BamHI* e *XhoI*, e está precedido por uma sequência codificadora que

permite a expressão da proteína fusionada a uma cauda de histidina (6xHis) na região C-terminal. Além disso, esse plasmídeo possui o gene *lac1*, que codifica a proteína repressora lac; o promotor T7 que é altamente específico para T7 RNA polimerase; um operador *lac* que bloqueia a transcrição; uma origem f1 de replicação; e um gene de resistência à ampicilina (Figura 10).

Para a construção deste cassete, foi utilizada a sequência da amostra de HTLV-1 AF033817.1 na região que expressa a porção C-terminal da proteína Tax, totalizando 369 pares de base, de acordo com a sequência codificadora retirada do banco de dados *Genbank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Análises *in silico* foram feitas para a pesquisa da presença de códons raros para a bactéria *Escherichia coli* através do Codon usage da plataforma *Bioinformatics* ([http://www.bioinformatics.org/sms2/codon\\_usage.html](http://www.bioinformatics.org/sms2/codon_usage.html)). O perfil de solubilidade proteico e a tendência à formação de transmembrana também foram analisados antes da construção do plasmídeo, de modo a saber se a expressão da proteína seria viável, se ela seria de alguma forma tóxica aos vetores de expressão, utilizando para tal as ferramentas de bioinformática disponíveis no portal ExPASy (<https://www.expasy.org/proteomics>).



**Figura 10: Representação esquemática do vetor utilizado para a expressão da proteína Tax e caracterização do vetor.** Plasmídeo pET21a (+) indicando a localização de *tax* (vermelho) flanqueado pelos sítios de restrição *BamHI* e *XhoI*.

#### 4.4 Competência e Transformação bacteriana

Uma única colônia da bactéria DH5 $\alpha$  (Genótipo: F-  $\phi$ 80/*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ (*lacZYA-argF*)U169 *recA1 endA1 hsdR17*(rk-, mk+) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1*  $\lambda$ -) foi inoculada em 15 mL de 2xYT e deixada sob agitação *overnight* a 37°C. Inoculou-se 1 mL dessa cultura em 100 mL de meio, até atingir a densidade óptica (DO) de 0,2 a 0,25 a 600 nm. Todo o volume foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O precipitado foi ressuscitado em glicerol 10% gelado, centrifugado novamente a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C, sendo tal procedimento repetido por duas vezes. Por fim, foi desprezado o sobrenadante e o precipitado foi ressuscitado em 1 mL de glicerol 10% frio. 25  $\mu$ L da suspensão foram adicionados a 10 mL de glicerol 10%. Foi avaliado a DO<sub>600</sub> e adicionado glicerol 10% à suspensão até que a DO<sub>600</sub> das células diluídas fosse igual a 0,15.

A transformação bacteriana foi realizada pelo método de eletroporação. Foram utilizados 16 ng do plasmídeo contendo o inserto de interesse para clonagem na bactéria DH5 $\alpha$ . Essa mistura foi colocada em cubetas e eletroporadas à 2.500 V utilizando um eletroporador. Após a eletroporação, foi adicionado 1 mL de caldo LB (*Luria-Bertani* - 1% de Triptona; 0,5% de extrato de levedura; 1% de NaCl) e as células foram mantidas a 37°C em agitação a 200 rpm por 1 hora. Após esse período, as bactérias foram plaqueadas com o uso de pérolas de vidro usando 20  $\mu$ L de cultura bacteriana para cada placa de meio LB Ágar contendo ampicilina na concentração de 100  $\mu$ g/mL. As placas foram incubadas por 16 a 18 horas em uma estufa a 37°C. As colônias isoladas foram selecionadas e testadas quanto à presença do vetor contendo o inserto de interesse mediante reações de digestão com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Xho*I.

#### 4.5 Extração e restrição do DNA plasmidial

As bactérias *E. coli* linhagem DH5 $\alpha$  transformadas com o plasmídeo pET-21/Tax foram cultivadas sob agitação de 180 rpm a 37°C por 16 horas em meio LB 1X acrescido de ampicilina (100  $\mu$ g/mL). 10 mL da cultura das colônias selecionadas foram submetidos à centrifugação para sua concentração. A extração de DNA plasmidial foi feita por lise alcalina (minipreparação plasmidial), conforme descrito por SAMBROOK *et al.* (1989).

Após extração e purificação do DNA plasmidial, foi feita a restrição enzimática para obtenção do inserto, seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante (PROMEGA). Assim, foi feita uma reação contendo 1,5  $\mu$ g/ $\mu$ L de DNA, 10  $\mu$ g/ $\mu$ L de BSA acetilada, 2  $\mu$ L de tampão 10X, 10 U/ $\mu$ L das enzimas de restrição e água q.s.p. 20  $\mu$ L. A solução foi homogeneizada e incubada por 2 horas a 37°C. Cada enzima de restrição possui um tampão específico sob o qual reage satisfatoriamente. A enzima *Bam*HI possui sua atividade otimizada pelo tampão E (6 mM de Tris-HCl, 6 mM de MgCl<sub>2</sub>, 100 mM de NaCl, 1 mM de DTT e pH 7,5) e a *Xho*I pelo tampão D (6 mM de Tris-HCl, 6 mM de MgCl<sub>2</sub>, 150 mM de NaCl, 1 mM de DTT e pH 7,9). Assim, foram procedidas duas reações de restrição utilizando os tampões E e D.

Para a confirmação da restrição enzimática, as amostras foram aplicadas em gel de agarose 1,5% submetido ao fracionamento eletroforético. O fragmento de DNA foi visualizado sob luz ultravioleta e o tamanho molecular dos fragmentos

obtidos foi estimado pela comparação da migração eletroforética do padrão de tamanho molecular 100 pb *Ladder* (Invitrogen, Brasil), devendo o inserto ter 393 pares de base (pb).

#### 4.6 Teste de Indução da Expressão de Proteínas

Para a expressão das proteínas usadas nos testes, foram transformadas as células de *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysS [Genótipo: (F– *ompT hsdS*(rB– mB–) *gal dcm*  $\lambda$ (DE3) pLysS (Camr) ( $\lambda$ (DE3): *lacI*, *lacUV5-T7 gene 1*, *ind1*, *sam7*, *nin5*)], conforme protocolo descrito anteriormente.

Para checar se essas bactérias transformadas expressavam de forma eficiente a proteína de interesse, foram realizados testes de indução de expressão de proteínas seguido de eletroforese em gel de poliacrilamida. Culturas bacterianas de 15 mL foram preparadas com o caldo LB acrescido de antibióticos (50  $\mu$ g/mL de ampicilina e 34  $\mu$ g/mL de clorafenicol) e 1,5 mL de cultura da colônia transformada em tubos de 50 mL. Cada tubo foi acrescido de duas diferentes concentrações de IPTG (isopropil-1-thio- $\beta$ -D-galactopiranosídeo - 1,0 mM e 1,5 mM) para testar qual induzia melhor a expressão da proteína estudada. Os tubos foram incubados em agitação a 150 rpm a 37°C. Depois dessa etapa, alíquotas foram coletadas a cada hora (1, 3, 4, e 5 horas) de incubação para verificar qual período de incubação induziu melhor a expressão da proteína e cada fração coletada foi analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida.

#### 4.7. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

A eletroforese foi realizada para avaliar a expressão da proteína. 10  $\mu$ L das amostras induzidas foram homogeneizadas com 15  $\mu$ L de tampão de proteína 5X (TrisCl 250 mM pH 6,8; SDS 10%; Azul de bromofenol 0,05%; glicerol 40%,  $\beta$ -mercaptoetanol 10%) e aplicadas em um gel de poliacrilamida a 15% de 1mm de espessura. A corrida foi realizada a 60 V no aparato Mini-Protean® (Bio-Rad) em tampão Tris-Glicina 1X (0,303% de Tris; 1,44% de Glicina; 0,1% de SDS; em água destilada) até que as amostras ultrapassassem o gel de empilhamento. Em seguida, o restante da corrida foi executado a 100 V. Os géis foram fixados em solução fixadora (40% de metanol; 10% de ácido acético; em água destilada) por 30 minutos. Em seguida, foram colocados em recipientes contendo solução de Comassie® Blue (Comassie 0,2%; Metanol 50%; Ácido Acético 10%) por 10 minutos. Após este

período, os géis foram lavados novamente em água e descorados usando solução descorante (10% de metanol; 7% de ácido acético; em água destilada) até que as bandas atingissem a resolução adequada para visualização.

#### **4.8 Teste de Solubilidade**

Após a verificação da expressão de Tax por eletroforese, dois clones com melhor expressão foram selecionados para nova indução, utilizando as condições ótimas já estabelecidas. Foram realizados dois testes de solubilidade para saber se a proteína se encontrava na fase solúvel ou insolúvel, com o objetivo de definir qual tampão seria utilizado e para a correta lise celular e purificação da proteína. No primeiro teste de solubilidade, o pellet proveniente de 100 mL de cultura induzida foi adicionado a 10 mL de tampão A de purificação (imidazol 30 mM em PBS 1X), e a mistura foi submetida a 15 ciclos de 1 minuto cada no disruptor sônico (modelo *Unique*) a 40 hertz com intervalo de 1 minuto entre cada ciclo. No segundo teste, ao pellet foi adicionado o tampão A e a mistura foi submetida a seis passagens pela Prensa Francesa (*Thermo Scientific*). Após a lise as amostras foram centrifugadas a 6000 x g por 10 minutos e o sobrenadante coletado foi transferido para novo tubo como fase solúvel, enquanto o sedimento foi ressuspensionado em 100 µL de água livre de nuclease como fase insolúvel, sendo ambas as fases submetidas à eletroforese.

#### **4.9 Purificação em sistema *Äkta Start***

Com o resultado do teste de solubilidade, foi observado que a proteína se encontrava, principalmente, na fase solúvel, logo uma nova indução foi feita com 400 mL de caldo LB. O sedimento foi resuspensionado em 50 mL de tampão A de purificação sem ureia. Entretanto, outra indução também foi realizada e o sedimento foi ressuspensionado com tampão A acrescido de 8 M de ureia. As amostras foram lisadas pelo disruptor celular por 15 ciclos a 40 hertz (ou até ser observado perda de viscosidade) e centrifugadas. O sobrenadante foi filtrado em filtro 0,45 µm para clarificação e foi purificado com coluna de níquel HisTrap HP de 1 mL (GE Healthcare Life Sciences).

A purificação foi realizada no aparelho *Äkta start* (GE Healthcare Life Sciences). A amostra foi injetada no aparelho através do *loop*, e o sistema foi posteriormente lavado para remoção de proteínas não ligadas com 25 mL do tampão A de purificação com ou sem ureia, de acordo com a suspensão inicial.

Primeiramente, a coluna foi lavada com água milli-Q por cinco vezes o volume da coluna. Logo após, a coluna foi novamente lavada com o tampão de ligação [20 mM Tris HCl, 100 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 4 M ou 8 M Ureia, pH 7,4] por cinco vezes o volume da coluna. A amostra foi injetada na coluna e após foi realizada mais uma lavagem com o tampão de ligação. A amostra foi eluída por gradiente do tampão de eluição [20 mM Tris HCl, 100 mM NaCl, 500 mM Imidazol, sem ureia ou com 8 M Ureia, pH 7,4] de 0 a 100 %, sendo coletados 1 mL por tubo e armazenadas a -20°C. Os eluatos foram avaliados por SDS-PAGE.

#### **4.10 SDS-PAGE**

As amostras resultantes da expressão e purificação foram analisadas em gel desnaturante de poliacrilamida a 15 %. O gel de empilhamento foi preparado com 10% de SDS, 10% de APS, TEMED e tampão Tris-HCl [1,0 M pH 6,8] e o gel de separação foi preparado com a adição de acrilamida/bisabrilamida 30 %, SDS 10 %, APS 10 %, TEMED e tampão Tris-HCl [1,5 M pH 8,8].

As amostras foram adicionadas ao tampão de proteína 5 x [Tris-HCl 250 mM pH 6,8, SDS 10 %, Azul de bromofenol 0,05 %, Glicerol 40 %,  $\beta$ -mercaptoetanol 10 %] e desnaturadas por aquecimento a 95 °C por 10 minutos.

O fracionamento foi realizado utilizando o equipamento Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-rad), aplicando a voltagem de 60 V até as bandas se alinharem no limite do gel de empilhamento, quando então, a voltagem foi aumentada para 100 V durante a corrida no gel de separação. O gel foi corado com uma solução de Comassie Blue por 30 minutos e descorada overnight com solução descorante [Metanol 10 %, Ácido acético 7 % e H<sub>2</sub>O 83 %]. Logo após, os géis foram visualizados no fotodocumentador ChemiDoc MP Imaging System (Bio-rad).

#### **4.11 Western blot**

Após o fracionamento eletroforético, as amostras foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Cytiva) com uma amperagem de 350 mA por 2 horas com a utilização do equipamento Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) e adição de tampão de transferência [Tris-Glicina 10 x 10 %, Metanol 10 % e ddH<sub>2</sub>O q.s.p].

Logo após, a membrana foi incubada com solução de bloqueio [TBS 1 x, Tween-20 0,05 %, 5 % de leite em pó desnatado (Molico – Nestlé)] overnight a 4 °C.

Posteriormente, a membrana foi lavada por três vezes por 5 minutos com tampão de lavagem [50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl e Tween-20 a 0,5%]. A membrana foi incubada por 2 horas com o anticorpo primário anti-histidina (1:100, Invitrogen) ou um *pool* de soros de pacientes da coorte GIPH (1:50). Posteriormente, a membrana foi novamente lavada com tampão de lavagem por três vezes e incubada com anticorpo secundário anti-mouse IgG para a reação com anti-histidina (1:40.000, Sigma Aldrich) e anti-humano IgG para a reação com *pool* de soro (1:10.000, Sigma Aldrich). A membrana foi lavada com tampão de lavagem novamente por três vezes, revelada utilizando o kit Clarity Western ECL Substrate (Bio-rad) e visualizada no fotodocumentador ChemiDoc MP Imaging System (Bio-rad). Logo após as membranas também foram reveladas com DAB (3,3'-diaminobenzidina) e 0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em PBS.

#### **4.12 Ensaio Imunoenzimático indireto (ELISA)**

Um primeiro ensaio de ELISA foi feito para determinar a melhor condição de recuperação do antígeno, sendo ele proveniente da purificação com ureia ou da purificação sem ureia. A placa de microtitulação de ELISA (96 poços de poliestireno de fundo chato e de alta ligação - *Corning*) foi sensibilizada com 75, 100 e 150 ng da proteína recombinante Tax C-terminal diluída em 100 µL/poço de tampão fosfato (solução A: 2,65 g de NaCO<sub>3</sub>; solução B: 4,2 g de NaHCO<sub>3</sub>; pH 9,6) e incubada durante 18 horas a 4°C para total adsorção das proteínas.

Em seguida, o líquido foi desprezado e a placa foi lavada uma vez com solução de lavagem (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 0,05% Tween 20 e 0,1% leite em pó). Foram adicionados 150µL/poço de solução de bloqueio (5% leite em pó em PBS 1X). Após incubação de 4 horas à temperatura ambiente, a placa foi lavada e foram adicionados 100 µL das amostras testes (*pool* de plasma sabidamente com presença ou ausência de anticorpos anti-HTLV-1) e uma amostra de soro humano (SH) comercial (Sigma Aldrich) previamente diluídas em solução de lavagem. As placas foram deixadas por 18 horas em câmara úmida a 4°C. Procedeu-se sete lavagens e posterior incubação das placas em câmara úmida com conjugado anti-IgG ou anti-IgM humana (Sigma Aldrich) ou anti-IgG1 (RheaBiotec) todos ligados à peroxidase, diluído em solução de lavagem, em um volume final de 100 µL/poço. Após 1 hora e 30 minutos de incubação à temperatura ambiente cada poço foi lavado 5 vezes com solução de lavagem e, finalmente, foram adicionados 70

$\mu\text{L}$ /poço de substrato de peroxidase TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina) (Sigma Aldrich). A reação foi paralisada com adição de 70  $\mu\text{L}$  de ácido sulfúrico. A absorbância foi medida a 450 nm no leitor de placas Multiskan (Thermo Fisher).

Após a padronização da fase sólida do ELISA, a padronização seguinte foi em relação ao tempo de bloqueio: se *overnight* (16 - 18 horas) ou se por 4 horas, utilizando como bloqueio o leite em pó. A terceira padronização foi em relação ao tipo de bloqueio (leite 5%, soro fetal bovino 3% ou BSA 1%) bem como a diluição dos anticorpos (anticorpos primários diluídos 50 e 100X); e anticorpos secundários: IgG diluídos 15.000 e 25.000X; IgM diluídos 25.000, 50.000 e 100.000X; e IgG1 diluídos 1000 e 5000X.

#### **4.12.1 Protocolos otimizados para ELISA anti-C-Tax**

Placas de 96 poços (High Binding, Sarstedt, Cat. 82.1581.200) foram sensibilizadas com 100 ng de proteínas recombinantes, purificadas no tampão de ureia 8M, em tampão carbonato ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  85 mM,  $\text{NaHCO}_3$  15 mM, pH 9,5) e incubadas *overnight* a 4 °C. Posteriormente, as placas foram lavadas uma vez com 150  $\mu\text{L}$  de solução de lavagem ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  100 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  18 mM, NaCl 1500 mM, KCl 28 mM, Sacarose 2 %, Tween 20 1 %, leite em pó desnatado 5 % (Molico – Nestlé)).

Foram adicionados a cada poço 150  $\mu\text{L}$  de solução de bloqueio (leite em pó desnatado 5 % (Molico – Nestlé), dissolvido em solução de lavagem), a placa foi incubada por 4 horas a temperatura ambiente. Logo após, as placas foram lavadas uma vez com 250  $\mu\text{L}$  de solução de lavagem e foi adicionado a amostra de soro humano (1:50) diluído em solução de lavagem por 16 horas a 4° C. As placas foram lavadas por sete vezes com solução de lavagem, foram adicionados os anticorpos secundário anti-humano IgG (1:15.000, Sigma Aldrich), ou anticorpos secundário anti-humano IgM (1:25.000, Sigma Aldrich), ou ainda, anticorpos secundário anti-humano IgG1 (1:1.000, RheaBiotec) por 1 hora e 30 minutos a temperatura ambiente.

Após a incubação, as placas foram novamente lavadas por cinco vezes e foram adicionados 70  $\mu\text{L}$  de TMB (Scienco Biotech) por 5 minutos para os ELISAs anti-IgG e anti-IgG1 e 7 minutos para ELISA anti-IgM. A reação foi paralisada com adição de 70  $\mu\text{L}$  de ácido sulfúrico. A absorbância foi medida a 450 nm no leitor de placas Multiskan (Thermo Fisher).

#### 4.12.2 Análise dos resultados de ELISA

Nos testes das amostras da população de estudo, o valor do *cut-off* para cada anticorpo foi estabelecido como a média de DO das amostras controle (96 amostras de indivíduos soronegativos) adicionado de 1,5 vezes do desvio padrão, conforme da Equação 1:

$$. \textit{cut} - \textit{off} = \textit{Média} + 1,5 \times \textit{DP}$$

O índice de reatividade (IR) foi calculado pela Equação 2:

$$\textit{Índice de Reatividade} = \frac{\textit{absorbância das amostras}}{\textit{cut} - \textit{off}}$$

A avaliação da reatividade dos anticorpos pelos ELISAs padronizados foi realizada por curvas ROC, no qual é demonstrada a relação entre a sensibilidade (verdadeiros positivos) e a especificidade (falsos positivos). A partir da curva ROC foi possível analisar a área sob a curva (AUC), que representa o desempenho geral do teste, levando em consideração os valores de sensibilidade de cada ponto de corte. Quanto maior o poder do teste em discriminar entre soropositivos e soronegativos, mais a curva se aproxima do canto superior esquerdo. Com isso, quanto mais a AUC se aproxima de 1, melhor o teste (HOSMER *et al.*, 2013).

#### 4.13 Análise Estatística

Todas as amostras foram testadas nos ELISAs anti-Tax em triplicata, foi obtida a média da densidade óptica e normalização pelo índice de reatividade. As amostras com valores acima do *cut-off*, ou seja, as amostras que tinham anticorpos detectáveis foram avaliadas nos testes estatísticos. Os dados longitudinais e com medidas repetidas foram analisados pelo Modelo Linear Generalizado Misto (GLMM). As famílias dos modelos generalizados não se limitam as relações lineares entre as variáveis explicativas e resposta. Além disso, os GLMMs são utilizados quando os dados possuem estrutura hierárquica ou repetida e quando a relação entre as variáveis de resposta e as variáveis explicativas é mais complexa do que a simples regressão linear. Esses modelos são amplamente utilizados em estudos longitudinais, experimentos repetidos e análises que envolvem grupos ou clusters de observações. Eles oferecem uma flexibilidade significativa para modelar diferentes

distribuições de respostas e incorporar efeitos aleatórios para lidar com a variabilidade não explicada por variáveis fixas (GARCIA *et al.*; 2017).

Nas análises utilizando o GLMM, as amostras por pacientes foram estabelecidas como um fator aleatório. Os índices de reatividade para cada anticorpo foram usados como variáveis explicativas e a idade, sexo, tempo de adoecimento, tempo de acompanhamento como variáveis resposta. Os GLMMs usaram distribuição gaussiana, as análises foram realizadas no Rstudio (<https://www.r-project.org/>), com uso do pacote *lme4* e *car* (BATES *et al*, 2015; FOX & WEISBERG, 2019) e os gráficos foram gerados pelo pacote *ggplot2* (WICKHAM, 2016).

Apesar de não ser uma etapa obrigatória para a construção dos modelos mistos a normalização dos dados pode ser útil em certos casos para garantir que os pressupostos do modelo sejam atendidos, melhorando a adequação do modelo aos dados. Nesse caso, os dados do índice de reatividade dos anticorpos IgG, IgG1 e IgM anti-Tax foram logaritimizadas e a carga proviral foi retirada a raiz quadrada.

Além disso, para a análise geral dos dados, da curva ROC, coeficiente de variação, gráficos de linha e avaliação dentre os assintomáticos utilizou-se o programa estatístico GraphPad Prism 8.0.1. A variação intraindividual de cada anticorpo foi determinada pelo coeficiente de variação (%), calculado através do desvio padrão/média x 100. As correlações foram realizadas utilizando a classificação de *Spearman*, e a avaliação dos sinais e sintomas relatados entre os portadores assintomáticos através do Teste Exato de *Fisher*. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo para todas as análises.

## 5. RESULTADOS e DISCUSSÃO

### 5.1 Análise *in silico* da proteína Tax C-terminal

#### 5.1.1 Construção do Plasmídeo

Baseando-se na descrição de Rudolph e colaboradores (1994) que descreveram quatro imunopéptidos para a proteína Tax, escolhemos dentre estes quatro, três que estão presentes na porção carboxila para compor a sequência de *tax* recombinante. A construção do sistema de expressão da Tax recombinante baseou-se no vetor pET-21-a (+) (GenOne), sendo que, para a construção deste cassete foi utilizado a amostra de HTLV-1 AF033817.1, como já explicado anteriormente. Utilizando o programa do Codon usage, foi analisado o perfil de códons raros e otimizados para a bactéria *Escherichia coli*.

Deste modo, utilizando o programa de tradução *Translate Tool* e o *MultAlin*, ambos da plataforma *ExpASy* verificou-se que a proteína recombinante produzida está de acordo com o produto do *coding sequence* (CDS) depositado no *GenBank*, apresentando somente dois diferentes aminoácidos (Figura 11).

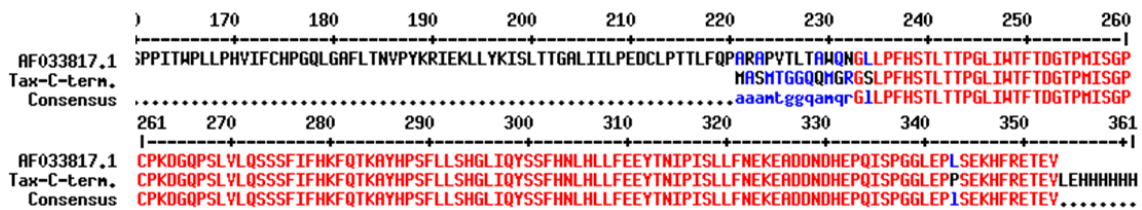
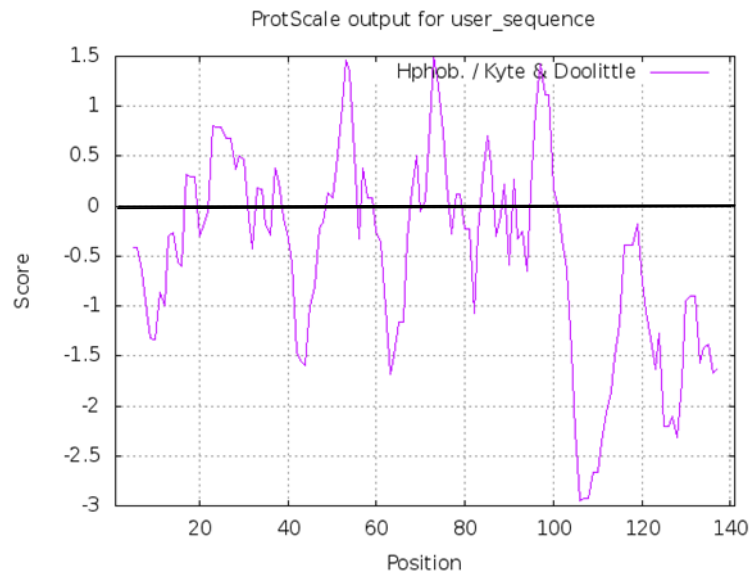


Figura 11: Sequência proteica da Tax C-terminal. Análise da similaridade da proteína recombinante produzida (Tax-C-term.) com a sequência modelo depositada no NCBI (AF033817.1).

#### 5.1.2 Perfil de hidrofobicidade

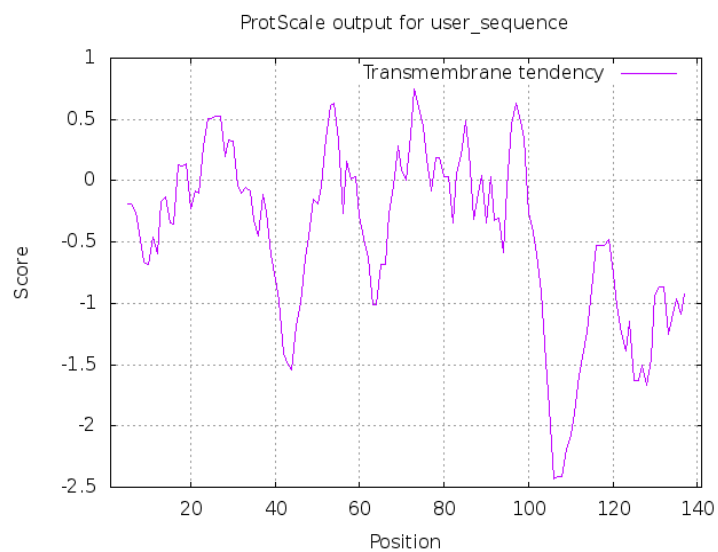
O perfil hidrofóbico da porção C-terminal da proteína Tax do HTLV-1 foi construído segundo Kyte & Doolittle (1982). Utilizando o programa *ProtScale*, do portal *ExpASy*, determinou-se um perfil majoritariamente hidrofóbico da proteína (figura 12) na qual valores acima de 0 indicam sequências de aminoácidos com características hidrofóbicas, dado a quantidade desses resíduos na sequência: 10,6% Leucina, 5,0% Isoleucina, 7,8% Glicina. Assim, abaixo de zero, consideram-se os resíduos hidrofílicos, prováveis epítomos.



**Figura 12: Perfil de Hidrofobicidade da proteína recombinante Tax C-terminal.** Pontuação utilizando o coeficiente de Kyte e Doolittle (1982), com valores acima de 0 indicando regiões hidrofóbicas, e abaixo da linha do 0 as com características hidrofílica

### 5.1.3 Tendência Transmembrana

A tendência a formação de transmembrana da proteína recombinante também foi avaliada a partir do programa *ProtScale*, através da escala de predição de aminoácidos de Zhao & London (2006), no qual valores acima de 1 indicam regiões transmembrana. A sequência não apresenta regiões com probabilidade de formação a transmembrana.



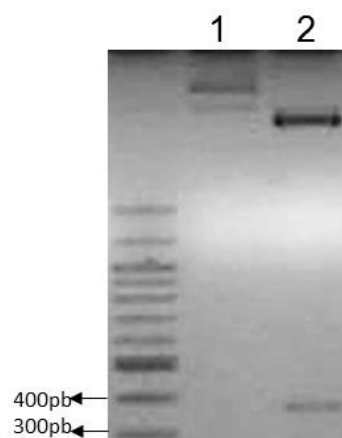
**Figura 13: Ausência de região transmembrana da proteína recombinante Tax C-terminal.** Valores acima de 1 indicam regiões transmembrana.

### 5.1.4 Perfil de solubilidade

A predição da solubilidade da proteína foi avaliada pelos programas PROSOII (PROtein SOLubility evaluator) e Protein-Sol, disponíveis na ExPASy e que categorizam as proteínas em um score de solubilidade (0-1), com proteínas insolúveis com valores inferiores a 0,5 e solúveis maiores ou iguais a 0,5. Ambos os programas indicaram que a proteína é solúvel com uma pontuação de 0,917 e 0,633, respectivamente.

### 5.2 Restrição plasmidial

Após a transformação da bactéria DH5 $\alpha$  realizou-se a digestão enzimática do plasmídeo para se confirmar a construção pelo tamanho do inserto utilizando as enzimas *Bam*HI e *Xho*I. O produto da digestão foi fracionado por eletroforese em gel de agarose 1,5%, onde se pôde observar uma banda de tamanho molecular igual a 393 pb, que corresponde a parte do fragmento do gene codificador da proteína Tax (Figura 14).

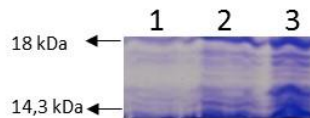


**Figura 14: Restrição do plasmídeo pET21-a(+)** recombinante. Imagem de gel de agarose 1,5% mostrando o plasmídeo não restringido (1) e o plasmídeo restringido (2) com o fragmento entre 400 e 300 pb de sequência parcial do gene *tax*.

### 5.3 Produção da Tax recombinante

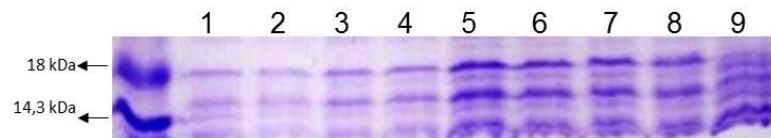
Após a confirmação da restrição, prosseguiu-se com a transformação da bactéria BL21 (DE3), para a expressão da proteína. Em uma análise preliminar para observar a produção da proteína recombinante clones selecionados foram crescidos em meio rico até a  $DO_{600} = 0,6$ , induzidos com IPTG 1mM por 4horas, centrifugados e lisados para serem aplicados no gel de poliacrilamida a 15%, como descrito em

material e métodos. Analisando o perfil protéico obtido, pôde-se observar que a cultura bacteriana induzida com IPTG (Figura 15, canaleta 3) apresentou uma banda diferenciada da cultura não induzida no tempo inicial do experimento e ao final (Figura 15, canaleta 1 e 2, respectivamente) próxima a massa molecular de 15 KDa, confirmada por comparação com padrão de peso molecular, conforme o esperado.



**Figura 15: Produção da Tax recombinante em *Escherichia coli*.** Imagem de eletroforese em gel de poliacrilamida 15% do produto da indução da expressão de Tax em vetor procarioto para a seleção de clones transformados. Representação de clone não induzido no começo do experimento (1) e no final (2) e de mesmo clone induzido no tempo final (3).

Após a seleção dos clones, seguiu-se com a otimização da indução a partir da concentração de IPTG em função do tempo, logo se realizou a indução utilizando 1,0 e 1,5mM de IPTG coletando-se uma alíquota da indução com 1, 3, 4 e 5 horas após a adição do mesmo. Observando-se a partir da eletroforese em gel SDS-PAGE (Figura 16) que as melhores condições foram com 1mM de IPTG e por 4 horas de indução



**Figura 16: Otimização da Expressão de Tax em plasmídeo recombinante.** Imagem de eletroforese em gel de poliacrilamida 15%, na qual foram inoculadas alíquotas induzidas com 1mM (canaletas 1, 3, 5 e 7) e com 1,5mM (2, 4, 6, e 8) por 1 hora (1 e 2), 3 horas (3 e 4), 4 horas (5-mais intensa- e 6) e 5 horas (7 e 8). Em todas se observa uma banda correspondente a 15kDa, correspondente à proteína Tax rec, exceto no controle não induzido (9).

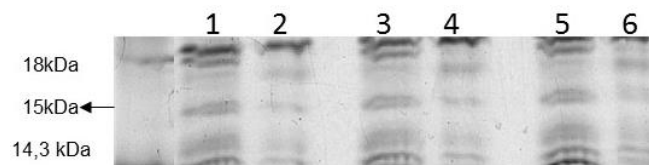
Apesar do sistema de expressão procarioto BL21 (DE3) ser considerado o ideal para a expressão heteróloga de genes de baixo número de cópias e plasmídeos baseados no T7, como os da família pET a expressão não atingiu níveis máximos de excelência em comparação com outras proteínas recombinantes produzidas no mesmo sistema. Este fato pode ocorrer por diferentes motivos: O primeiro deles é o fato da proteína alvo poderia ser tóxica ou instável para a célula hospedeira; ou que a expressão de proteínas heterólogas possa diminuir o crescimento de novas células hospedeiras inviabilizando a tradução da proteína alvo

ou a síntese protéica como um todo, nesses casos se observaria a lise celular; ou ainda o fato de que proteínas recombinantes com regiões hidrofóbicas frequentemente possuem um efeito tóxico sobre o hospedeiro devido à associação ou interação com o sistema de membrana. Entretanto a bactéria hospedeira possui o gene T7 lisozima, que suprime a atividade da RNA polimerase T7, reduzindo assim a níveis basais a expressão da proteína do gene de interesse, logo aumentando a tolerância de células *E. coli* contra a toxicidade.

Outras explicações estão relacionadas a propriedade da proteína: dado que poderia ocorrer degradação por proteases bacterianas e dobramento incorreto em proteínas muito pequenas (menores que 10 kDa), embora as linhagens de BL21 serem deficientes para as proteases *lon* e *ompT*; a proteína alvo poderia ter uma meia vida curta quando alguns aminoácidos como arginina (Arg), lisina (Lys), leucina (Leu), triptofano (Trp) e tirosina (Tyr) estão presentes; e uma quantidade expressiva de códons raros na proteína alvo para expressão em procarioto.

#### 5.4 Teste de Solubilidade

Após a comprovação da expressão da proteína Tax recombinante, foi averiguada a localização desta proteína dentro da célula procariótica, o que determinaria também sua solubilidade. Utilizando protocolo específico, verificou-se que a proteína Tax se encontra livre no citoplasma, preferencialmente como proteína solúvel (Figura 17, canaleta 1, 3 e 5). Para tal experimento também foram avaliados dois processos de lise: por pressão, através da prensa francesa, por ultrassom por meio do disruptor ultrasônico (sonicador) e pelos dois processos concomitantemente. Não houve diferença entre os processos, optando-se por questões práticas utilizar o disruptor ultrasônico.



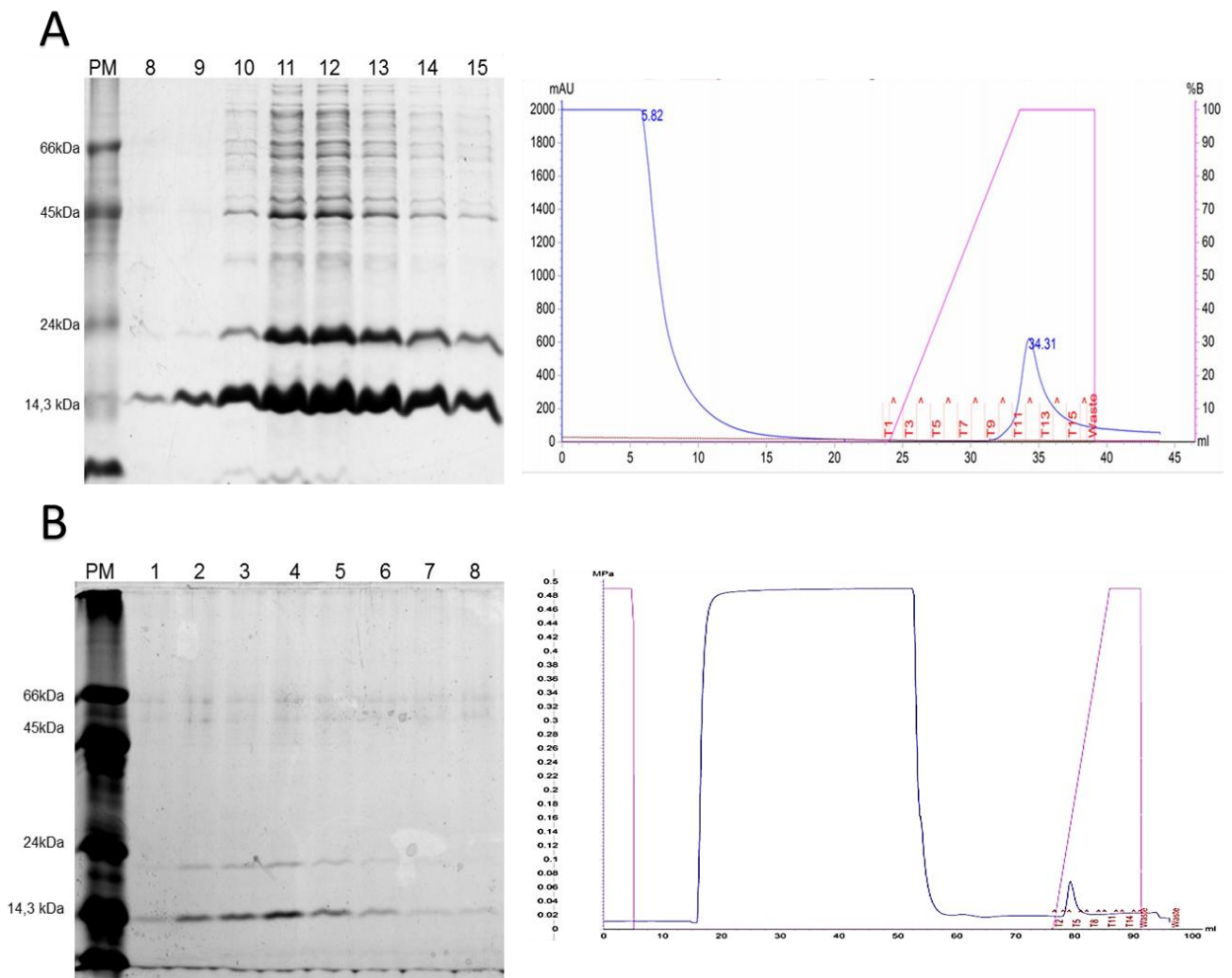
**Figura 17: Ensaio de Solubilidade da proteína Tax recombinante.** Eletroforese em gel de SDS-PAGE de bactérias BL21 transformadas indicando as frações solúveis (número ímpar) e insolúveis (números pares), dos processos de lise na Prensa Francesa (1 e 2), no disruptor ultrasônico (3 e 4) e por ambos aparelhos (5 e 6), indicando uma banda de 15kDa (seta) nas canaletas onde se aplicou a amostra solúvel.

Os mecanismos que influenciam na solubilidade e insolubilidade das proteínas e consequente formação de corpos de inclusão ainda não é bem compreendida. Hipóteses iniciais incluíram limitações de solubilidade como alto número de aminoácidos hidrofóbicos, tamanho de proteína, tipo de promotor, formação inadequada de pontes dissulfeto e aumento da temperatura durante a expressão. Porém, não há dados na literatura que mostrem uma relação simples entre esses fatores e a solubilidade (HARRISON & BAGAJEWICZ, 2014).

### **5.5 Purificação em sistema *Äkta Start***

Após a indução em larga escala e lise, foram realizadas duas purificações utilizando uma solução sem ureia, para proteínas solúveis, mas também uma outra purificação utilizando uma solução desnaturante com 8M de ureia. Na purificação sem ureia (Figura 18, A) o descarregamento da proteína da coluna de níquel foi tardio, eluatos com mais de 80% do tampão B, concentrado com 500mM de imidazol, além da purificação não ter sido totalmente pura contendo ainda proteínas constitutivas.

Na metodologia utilizando ureia, por sua vez, a eletroforese do gel de poliacrilamida indica melhor purificação, com poucas bandas de proteínas bacterianas. A ureia por ser um agente caotrópico neutro, quebra as ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre e dentro das proteínas, desnaturando a estrutura secundária e expondo os resíduos de histidina aumentando a afinidade da proteína pela coluna de níquel e retirando as proteínas fracamente ligadas durante a etapa de lavagem. O descarregamento da proteína, bem como o cromatograma se distinguiram bastante da purificação sem ureia, apesar de que em ambos o pico de eluição da proteína Tax apresenta uma base definida, não tão larga. Dessa vez, a purificação se iniciou com 10% ou menos do tampão B e finalizou com 80% do tampão.



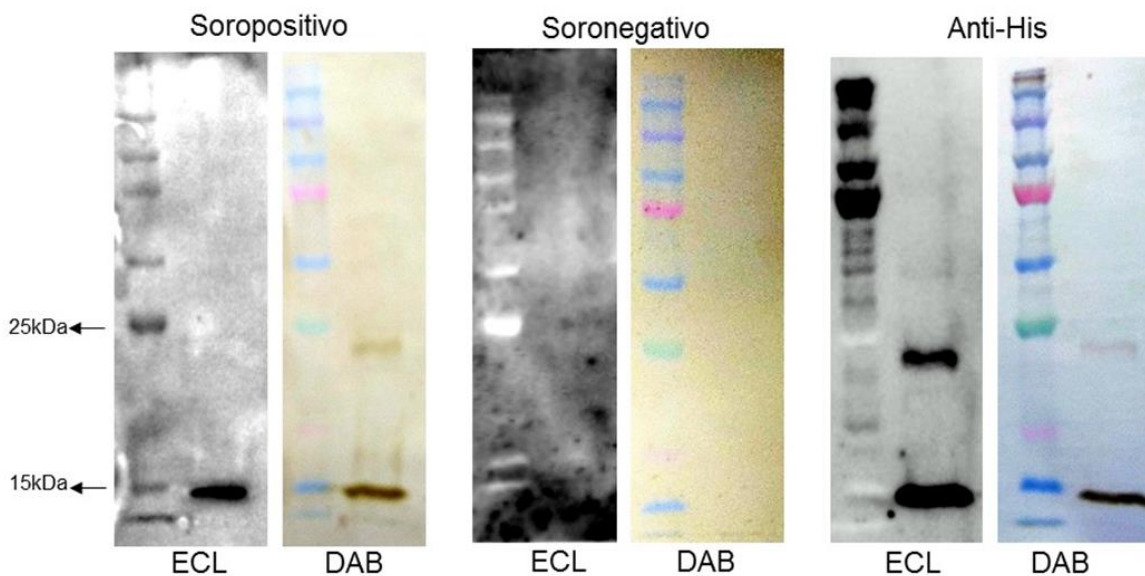
**Figura 18: Purificação da Proteína Tax recombinante.** (A) Purificação sem ureia. Foto de gel SDS-PAGE com bandas próximas à 15kDa e descarregamento da proteína nos eluatos com 80% ou mais de solução B; perfil cromatográfico da amostra obtido em coluna de afinidade a íons metálicos utilizando gradiente de imidazol para eluição, com leitura a 280nm representada (azul) e o gradiente de imidazol de 0 a 100% (rosa). (B) Purificação com ureia. Foto de gel SDS-PAGE com bandas próximas à 15kDa e descarregamento da proteína nos eluatos contendo entre 10 a 80% de solução B; cromatograma da purificação com pico entre os eluatos 2 e 5.

## 5.6 Western Blot

Para a validação dos produtos da purificação foi realizado um ensaio de *Western Blot* com a utilização de anticorpos comerciais anti-Histidina (anti-His) e avaliado a reatividade do anticorpo primário, soro/plasma de indivíduos não infectados e infectados pelo HTLV-1 à proteína recombinante purificada. Neste ensaio foi utilizado somente um eluato da purificação com ureia, por ter menos contaminantes.

Na membrana incubada com anticorpo primário anti-His e com a mistura de soro de indivíduos infectados com HTLV-1 é visível uma banda na altura de 15kDa indicando que a proteína Tax foi purificada com sucesso e é reativa a amostras de indivíduos soropositivos. Com o uso do pool de amostras soronegativas não há a presença de nenhuma banda nas duas revelações realizadas. Além disso, se observa uma segunda banda nas revelações de anti-His e na revelação com DAB nos soropositivos, com aproximadamente 30kDa, o que pode corresponder a formação de um dímero (Figura 19).

Foi demonstrado que Tax forma homodímeros que contribuem para uma ótima atividade transcricional do promotor do HTLV-1 (JIN & JEANG, 1997). O processo de auto-associação da Tax, no entanto, ainda é em grande parte incompreendida, e os domínios necessários para a dimerização de Tax não foram totalmente caracterizados. Resíduos de glutaraldeído, cisteína (Cys153, 174, 212 e 261), tirosina (Thr-123) e alanina (Ala-204) da região central permitem a formação de homodímeros (GITLIN *et al.* 1991; Tie *et al.* 1996), além da estrutura de *zinc-finger* localizada na parte N-terminal de Tax (resíduos 22 a 53) e do zíper de leucina na região C-terminal que também é necessária para a sua dimerização (JIN & JEANG, 1997). Entretanto, esses estudos, em sua maioria, foram realizados com ensaios *in vivo* utilizando mutantes de Tax.



**Figura 19: Reatividade da proteína por WB.** Reatividade da mistura de soro/plasma de soropositivos, soronegativos e do anticorpo comercial anti-Histidina.

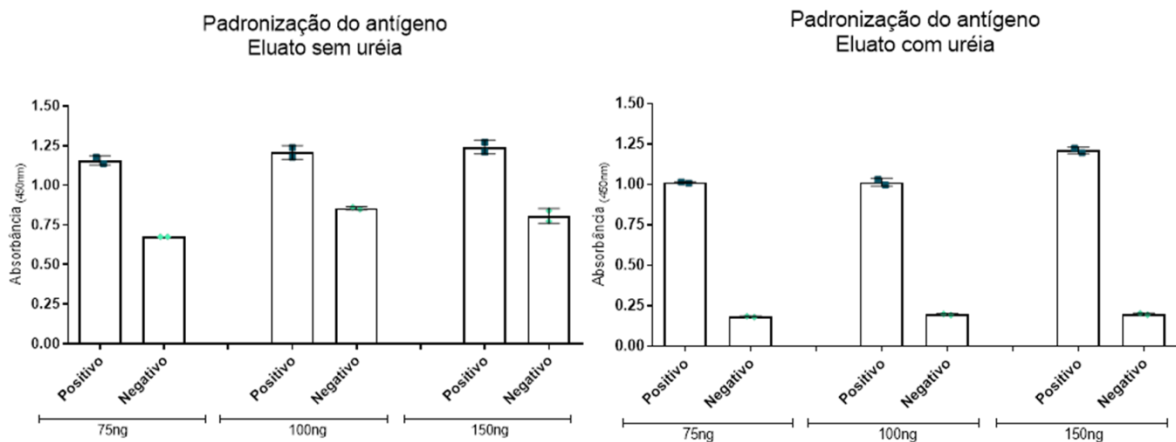
## 5.7 Padronização do ELISA

### 5.7.1 Padronização do ELISA IgG

Este ensaio teve como objetivo determinar as melhores condições que pudessem diferenciar amostras soronegativas de soropositivas para o HTLV-1. A primeira padronização foi realizada utilizando-se diferentes concentrações de antígenos e antígenos purificados com ou sem ureia.

A padronização utilizando a proteína eluída com tampão contendo ureia foi a que teve maior diferença entre soronegativos e soropositivos comparado com o ELISA realizado sem ureia, possivelmente devido a uma maior exposição dos epitópos. A ureia é um agente dissociante, com isso pode dissociar reações inespecíficas, não prejudicando as reações específicas, uma vez que reações específicas possuem maior afinidade que as inespecíficas (MIRHOSSEINI *et al.*, 2019).

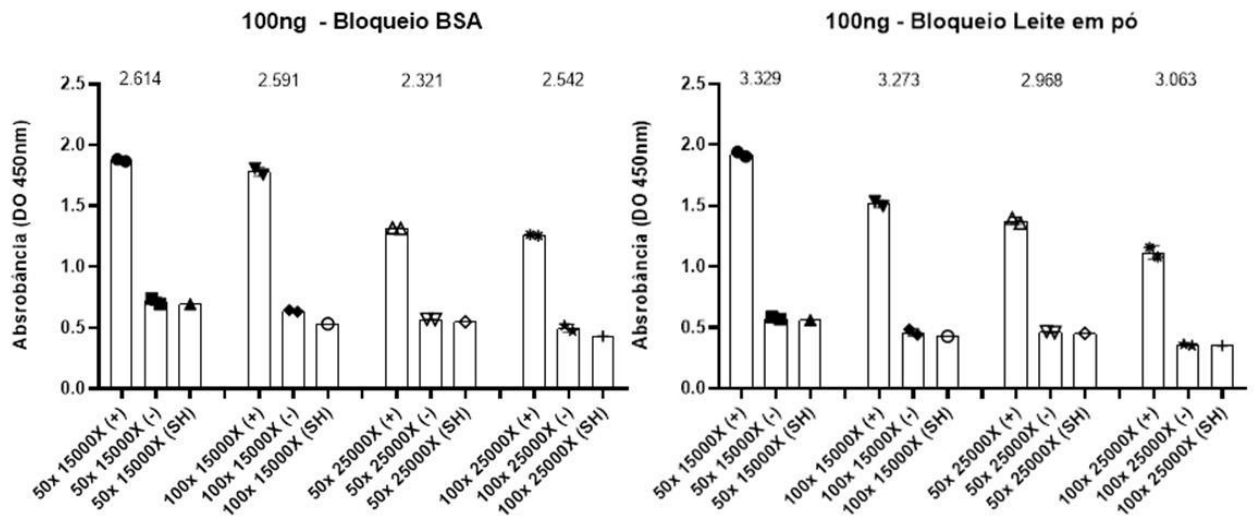
Também se definiu a quantidade de 100ng da proteína Tax recombinante como a que melhor diferenciou as amostras soronegativas das soropositivas para HTLV-1 com a razão de 5,03 em relação a 75ng (4,71) e 150ng (4,63) (Figura 20).



**Figura 20: Padronização da fase sólida do teste de ELISA usando a proteína Tax recombinante.** Avaliação, por ELISA, da reatividade da Tax recombinante eluída em tampão com e sem ureia nas concentrações de 75, 100 e 150ng com misturas de amostras soronegativas e soropositivas.

Na sequência, definiu-se o tipo de bloqueio: leite em pó 5% (Molico Nestlé - 0% de gordura) ou BSA 1%, bem como a diluição dos anticorpos (anticorpos primários diluídos 50 e 100X; e anticorpos secundários diluídos IgG: 15000 e 25000X. A relação de absorbância entre o soro humano (SH) comercial não reagente e pool de soronegativos foi próxima. De acordo com esse ELISA o melhor bloqueio foi o com o leite em pó 5% com a maior razão entre o *pool* de amostras

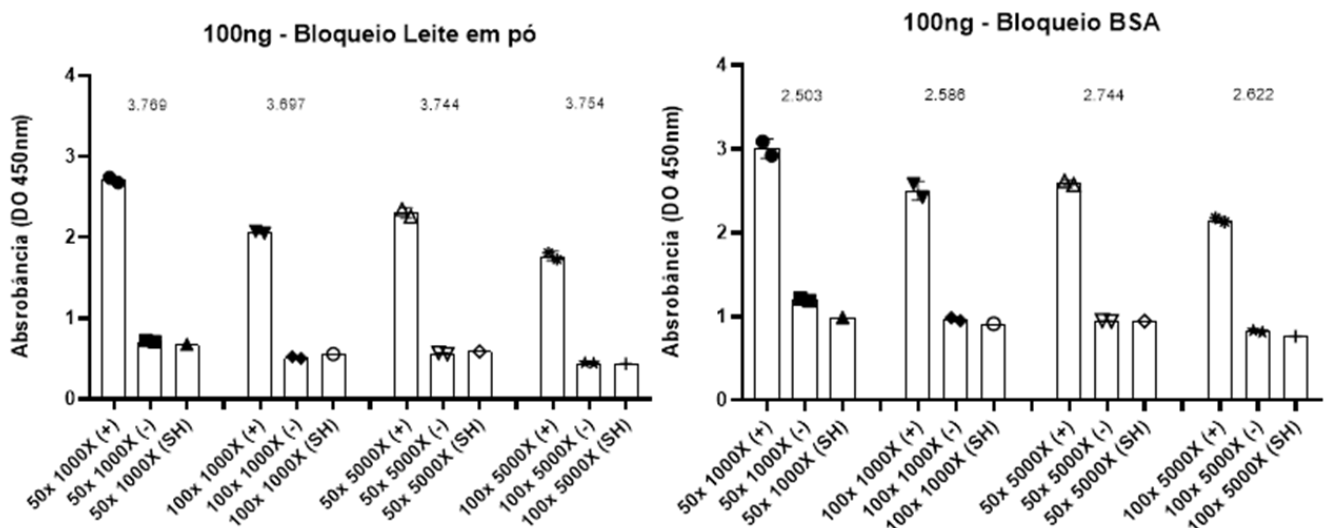
soropositivas para HTLV-1 e soronegativas (3,329), na diluição do soro de 50X e anticorpos secundários anti-IgG na a diluição de 15000X (Figura 21).



**Figura 21: Padronização do bloqueio e diluições para IgG.** Avaliação, por ELISA, do tipo de bloqueio com amostras soronegativas (-) e soropositivas (+) e soro humano (SH) diluídas 50 e 100X e com anticorpo secundário conjugado diluído 15000 e 25000X.

### 5.7.2 Padronização do ELISA IgG1

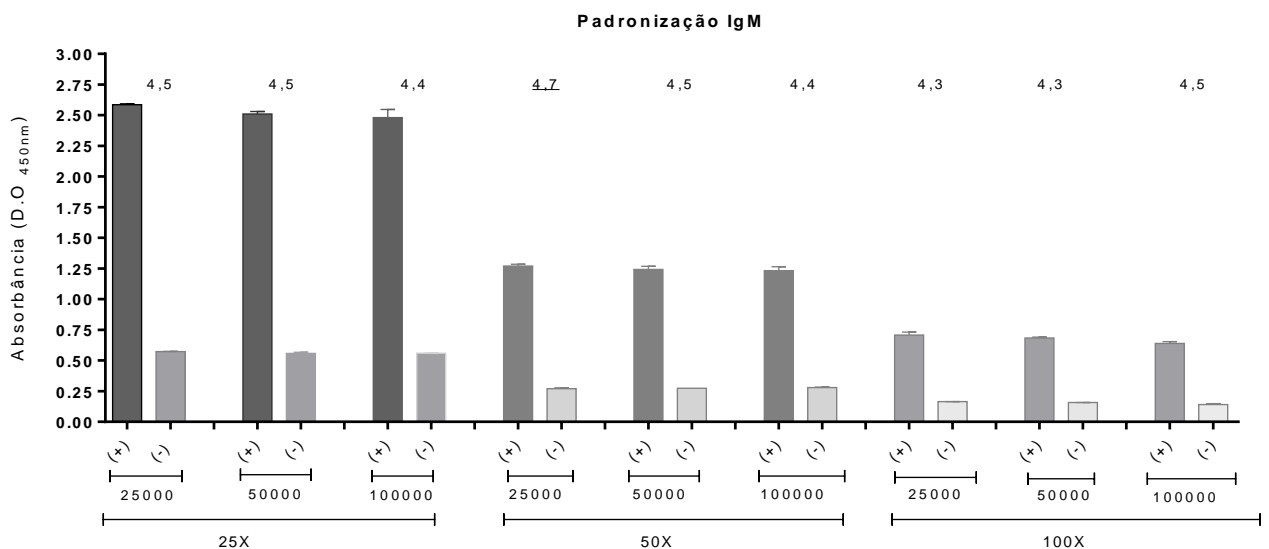
Assim como para o ELISA anterior a padronização do IgG1 considerou os bloqueios o leite em pó 5% (Molico Nestlé - 0% de gordura) ou BSA 1%, bem como a diluição dos anticorpos (anticorpos primários diluídos 50 e 100X; e anticorpos secundários diluídos IgG1: 1000 e 5000X. De acordo com esse ELISA o melhor bloqueio foi o com o leite em pó 5% com a maior razão entre o *pool* de amostras soropositivas e soronegativas (3,769), na diluição do soro de 100X e anticorpos secundários anti-IgG1 na a diluição de 1000X (Figura 21).



**Figura 22: Padronização do bloqueio e diluições para IgG1.** Avaliação, por ELISA, do tipo de bloqueio com amostras soronegativas (-), soropositivas (+) e soro humano comercial (SH) diluídos 50 e 100X e com anticorpo secundário conjugado diluído 1000 e 5000X.

### 5.7.3 Padronização do ELISA IgM

Para a padronização do ELISA IgM utilizou-se inicialmente a diluição dos anticorpos (anticorpos primários diluídos 25, 50 e 100X; e anticorpos secundários diluídos IgM: 25000, 50000 e 100000X). De acordo com essa padronização a melhor diluição que apresentou a maior razão entre a mistura de amostras soropositivas e soronegativas (4,7) foi a diluição do soro de 50X e o anticorpo secundário a 25000X (Figura 23).



**Figura 23: Padronização do ELISA IgM.** Avaliação da reatividade de anticorpos IgM anti-Tax com misturas de amostras soronegativas (-) e soropositivas (+) diluídas 25, 50 e 100X e com anticorpo secundário conjugado diluído 25000, 50000 e 100000X.

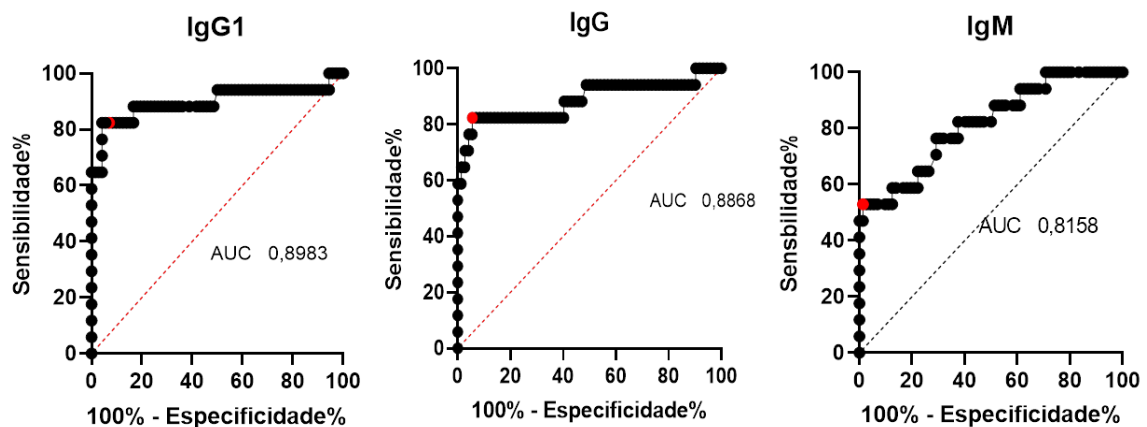
## 5.8 Curva ROC

Após a padronização, realizou-se três ELISAs utilizando 150ng da proteína recombinante Tax, bloqueio em leite em pó 5% e as respectivas diluições para o soro e anticorpo secundário dos três anticorpos alvo, para estabelecimento das relações de especificidade, sensibilidade e determinação do cut-off através da curva ROC. Avaliou-se 72 amostras de soronegativos e 17 amostras de soropositivos para o vírus HTLV-1.

Para o IgG encontrou-se uma média de densidade optica de amostras soronegativas de  $0.561 \pm 0.154$  e  $1.162 \pm 0.48$  para as soropositivas, o *cut-off* encontrado foi de 0,796, com uma sensibilidade de 76.4% e uma especificidade de 95,8%, e uma área sobre a curva AUC de 0,887.

Para o IgG1 encontrou-se uma média de densidade optica de amostras soronegativas de  $0.829 \pm 0.228$  e  $2.117 \pm 1.02$  para as soropositivas, o *cut-off* encontrado foi de 1,184, com uma sensibilidade de 82.4% e uma especificidade de 94,4%, e uma área sobre a curva AUC de 0,898.

Para o IgM encontrou-se uma média de densidade optica de amostras soronegativas de  $0.408 \pm 0.081$  e  $0.619 \pm 0.201$  para as soropositivas, o *cut-off* encontrado foi de 0,568, com uma sensibilidade de 52.9% e uma especificidade de 98,6%, e uma área sobre a curva AUC de 0,816. Todos os testes tiveram desempenho excelente, na figura 24 é apresentado as curvas os pontos de corte representados em vermelho.



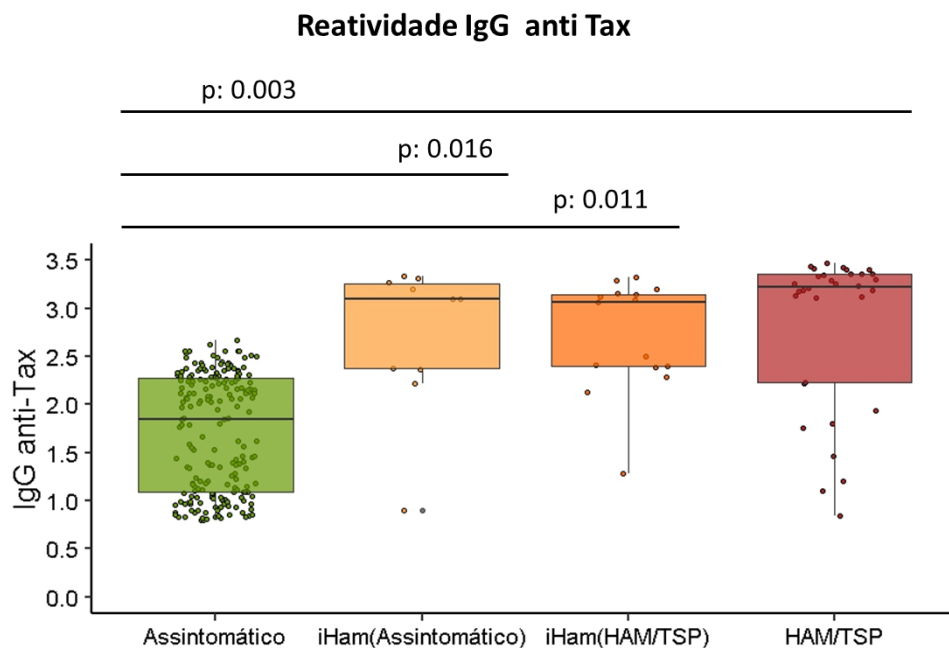
**Figura 24: Curva ROC.** Relação de sensibilidade e especificidade do teste para os anticorpos IgG, IgM e IgG1 usando a proteína Tax recombinante no teste de ELISA, com valores de área sob a curva (AUC) e o ponto destacado em vermelho representando o ponto de corte.

### 5.9 Reatividade dos anticorpos anti-Tax

Como já mencionado anteriormente, a reatividade foi estabelecida pelos valores de sensibilidade e especificidade da curva ROC. Partindo-se de uma linha de corte de 0.7965 para o ELISA de detecção de IgG anti-Tax identificamos uma reatividade para esse anticorpo em 52,56% (41/78) dos portadores assintomáticos, em 100% (6/6) dos pacientes de HAM/TSP incidente (iHAM) e em 90% nos

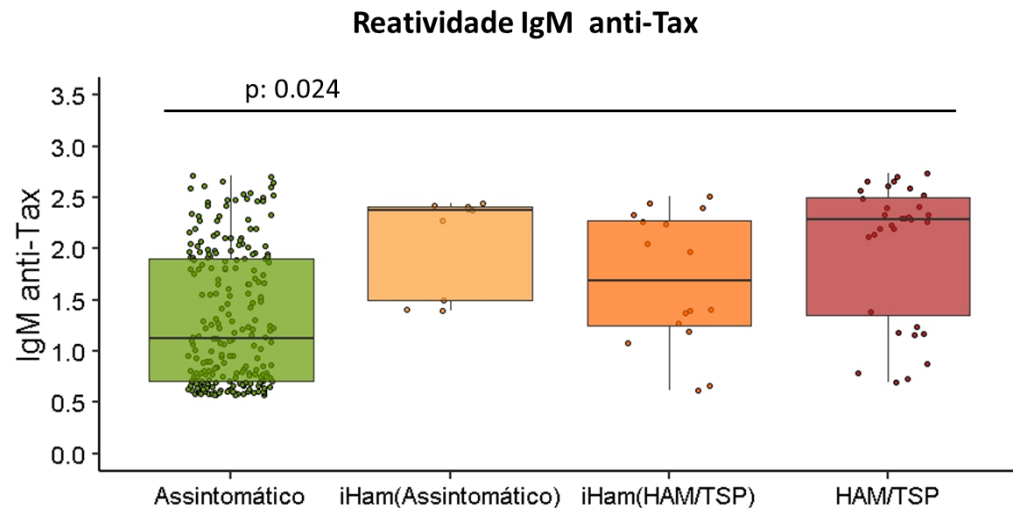
pacientes com HAM/TSP. A resposta IgG anti-Tax nos grupos de iHAM e HAM/TSP é especialmente alta.

O índice de reatividade avaliado pelo modelo linearizado mostra uma diferença estatística significativa entre os portadores assintomáticos e os pacientes HAM/TSP ( $p=0.00281$ ) e entre os indivíduos assintomáticos iHAM, seja durante a fase assintomática ( $p=0.01580$ ) ou após o desenvolvimento da HAM/TSP ( $p=0.01074$ ) (Figura 25).



**Figura 25: Avaliação da resposta IgG anti-Tax.** Perfil de reatividade (DO/cut-off) das amostras de plasma de portadores assintomáticos, de portadores de HAM incidente antes e após o adoecimento e de pacientes HAM/TSP. Barra indicando a variação dos valores baseado em quartis e a linha interna a mediana.

Para anticorpos IgM contra a Tax foi encontrada uma reatividade em 43,58% (34/78) nos assintomáticos, 83,3% (5/6) no grupo do iHAM e 80% (8/10) nos pacientes com HAM/TSP. Assim como evidenciado para a IgG houve uma diferença estatística significativa entre os portadores assintomáticos e os pacientes HAM/TSP ( $p=0.0242$ ), mas não houve diferenças comparando-se os outros grupos (Figura 26). A resposta IgM anti-Tax foi observada por Kira e colaboradores (1992) em 39% dos pacientes com HAM/TSP e somente em 6% de portadores do HTLV-1 sem a doença. Os dados mostram a presença de anticorpos IgM específico contra a Tax na maioria dos portadores, mesmo anos após a infecção e até mesmo após início da mielopatia, apontando atividade viral presente ao longo da cronificação.



**Figura 26: Avaliação da resposta IgM anti-Tax.** Perfil de reatividade IgM (DO/cut-off) entre os assintomáticos, os portadores de HAM incidente antes e após o adoecimento e os pacientes HAM/TSP.

Pelos paradigmas convencionais de imunidade, logo após o primeiro contato com um antígeno, ocorre um aumento nos níveis de anticorpos IgM (com baixa especificidade) no soro do indivíduo, os quais diminuem rapidamente (em 3 a 4 semanas) e são substituídos pelos anticorpos IgG (com alta afinidade), que permanecem elevados por várias semanas. Após o segundo contato com o mesmo antígeno, observa-se um aumento nos níveis de IgG, indicando uma resposta de reforço (*booster*), na qual esses anticorpos predominam na resposta secundária e são responsáveis pela memória imunológica. Assim, indivíduos com altos níveis de IgM antígeno-específico no soro provavelmente estão enfrentando infecções agudas, uma vez que, durante a fase crônica da infecção, o isotipo predominante seria IgG (BUSCH *et al.*, 2008; TOMARAS *et al.*, 2008).

Entretanto, achados posteriores têm sugerido que os anticorpos IgM podem sofrer hipermutação somática, tornando-se altamente específicos e levando ao desenvolvimento de resposta imune de vida longa (BOHANNON *et al.*, 2016). A produção de anticorpos IgM em fase tardia está associada à reativação dos vírus que causam infecção latente como já relatado para o vírus Epstein-Barr (*Human gammaherpesvirus 4*) e para o citomegalovírus (*Cytomegalovirus humanbeta 5*) em humanos (RASMUSSEN *et al.* 1982), em infecções bacterianas (RACINE *et al.*, 2011) e por protozoários (BOYLE *et al.*, 2019) intracelulares. As células secretoras de IgM de longa duração já foram detectáveis até 1 ano após uma infecção bacteriana e residindo no baço e na medula óssea (RACINE *et al.*, 2011).

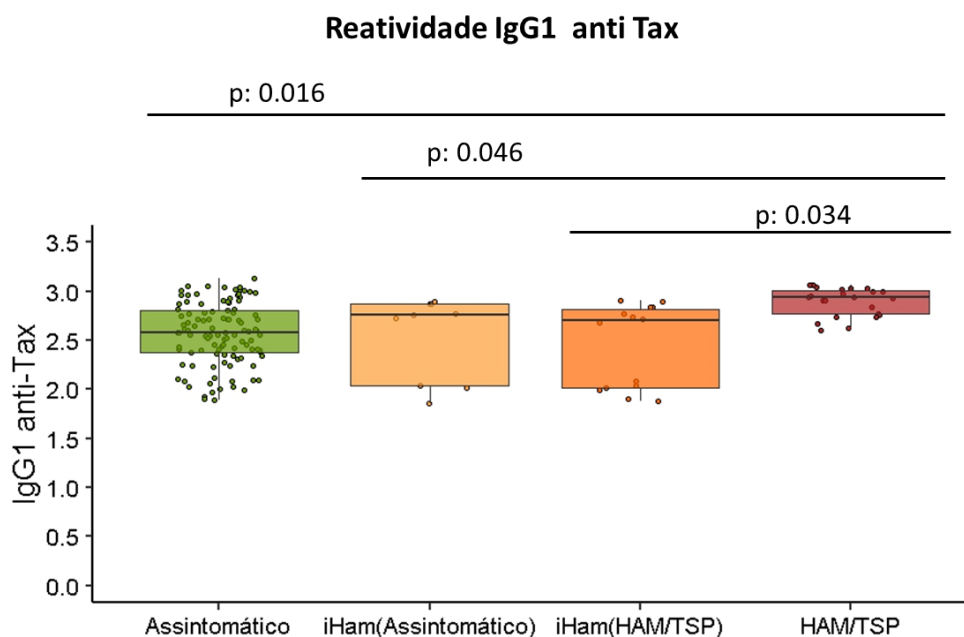
Poucos estudos relatam a dinâmica da resposta de IgM em HTLV. No entanto, sabe-se que este anticorpo é persistentemente detectado em pacientes infectados pelo HTLV-1, indicando uma provável multiplicação viral constante durante a fase crônica da infecção (NAGASATO *et al.*, 1991, LAL *et al.*, 1993). Para o HIV, entretanto, estima-se que a resposta adaptativa com produção de IgM é a primeira classe de anticorpos específicos do vírus a surgir após a infecção, assim como relatado para muitas infecções. Essa resposta permanece detectável em média por 5 dias após o RNA viral se tornar mensurável no plasma e vai diminuindo ao longo de 20 a 40 dias, enquanto as respostas de IgG aumentaram durante o mesmo período (TOMARAS *et al.*, 2008). Porém anticorpos IgM contra antígenos do HIV também são observados em estudos prospectivos, em especial a resposta contra a Tat, a proteína reguladora do HIV que, assim como a Tax, é essencial para a expressão, replicação e transmissão do gene viral (REZZA *et al.*, 2005).

A resposta IgM e IgG anti-Tat, embora presentes em uma pequena proporção de indivíduos infectados pelo HIV, são mais frequentemente encontrados na fase assintomática da infecção (ENSOLI *et al.*, 2006), em não-progressores (RICHARDSON *et al.*, 2003) e estão associados a manutenção da contagem de células T CD4 + (BELLINO *et al.*, 2014) e baixa carga viral (ZAGURY *et al.*, 1998). No entanto, essas associações são mais frequentes no HIV de clado B, para os HIV não-clado B a resposta IgG anti-Tat por si só não é protetora, a menos que seja concomitante com IgM, sugerindo um papel protetor do IgM anti-Tat persistente, independentemente do clado infectante (NICOLI *et al.*, 2016). De qualquer modo, um menor risco e taxa de progressão para a AIDS em indivíduos anti-Tat-positivos já foram observadas no HIV-1 e HIV-2, ampliando a importância protetora destes anticorpos que podem ser também bons marcadores prognóstico (RODRIGUEZ *et al.*, 2006).

Os pacientes com HAM/TSP, em geral, apresentam alta carga proviral e uma resposta imune exacerbada, sendo possível que o aparecimento de novos antígenos do HTLV-1, associados à multiplicação viral aumentada induza a resposta de anticorpos IgM, bem como de IgG e IgG1. Coelho-dos-Reis e colaboradores (2009) observaram no grupo HAM/TSP, diferentemente do grupo de indivíduos assintomáticos, uma resposta aumentada de IgG e IgG-1 anti-Gag (p15, p19 e p24) e anti-Env (gp21 e gp46), mas, sem diferença entre os dois grupos para Tax (p40) (COELHO-DOS-REIS *et al.*, 2009). Apesar da divergência entre os dados, vale-se

ressaltar que o referido trabalho utilizou um extrato de células MT-2 para obtenção de antígeno e a avaliação foi por meio de citometria de fluxo. Um trabalho recentemente publicado por nosso grupo de pesquisa apontou que as regiões antigênicas da proteína Tax concentram-se em regiões *hotspot*, sendo a porção C-terminal uma delas, com epítomos relacionados à resposta do eixo Th2 (PEREIRA *et al.*, 2023).

Por fim, na análise de anticorpos IgG1 anti-Tax foi encontrada uma reatividade de 44,87% (35/78) nos assintomáticos, 83,3% (5/6) no grupo do iHAM e 80% (8/10) nos pacientes com HAM/TSP. De forma idêntica à resposta de IgM e IgG houve uma diferença estatística significativa entre os portadores assintomáticos e os pacientes HAM/TSP ( $p= 0.0166$ ), e também com os HAM incidente antes ( $p=0.0458$ ) e após ( $p=0.0336$ ) o adoecimento (Figura 27).



**Figura 27: Avaliação da resposta IgG1 anti-Tax.** Perfil de reatividade (DO/cut-off) das amostras de plasma de portadores assintomáticos, de portadores de HAM incidente antes e após o adoecimento e de pacientes HAM/TSP. Barra indicando a variação dos valores baseado em quartis e a linha interna a mediana.

Os dados de avaliação geral das amostras revelam um perfil diferenciado de reatividade anti-Tax entre os portadores assintomáticos, indivíduos com HAM/TSP e no grupo iHAM. Diferentes estudos na literatura corroboram o perfil observado nesse estudo. É relatado que indivíduos infectados pelo HTLV-1 apresentam constante expressão das proteínas estruturais e regulatórias virais, levando a um aumento

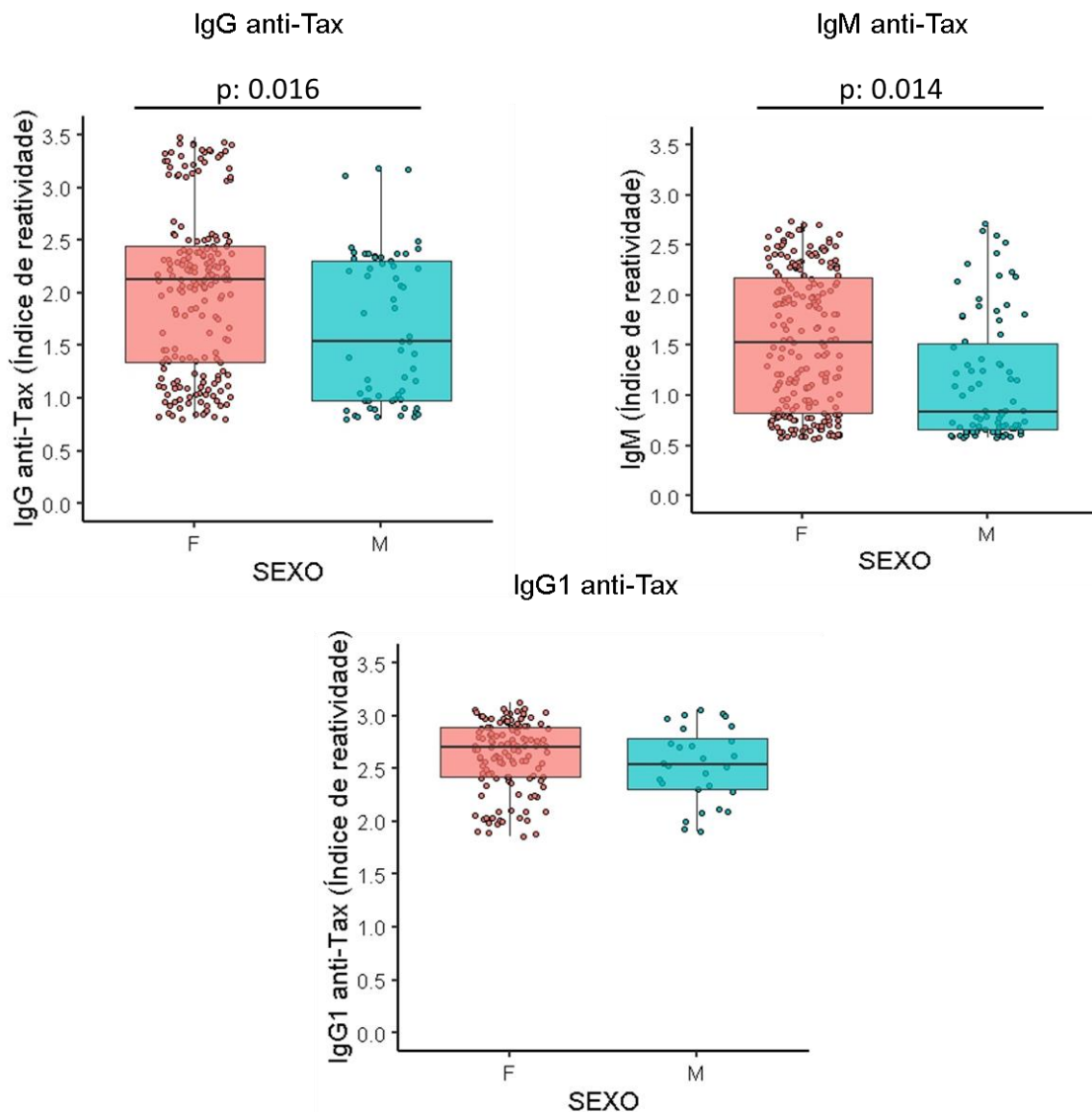
global da resposta imune celular e humoral (PIQUE *et al.*, 1996; CASTRO *et al.*, 2016) com poucas semanas de exposição ao vírus. Esse aumento da resposta imune é fortemente suportado pela presença da ativação crônica de linfócitos T citotóxicos responsivos para o HTLV-1, particularmente contra proteína Tax (GRETEN *et al.*, 1998; GOON *et al.*, 2004).

A resposta imune do paciente com acometimento do sistema nervoso central é significativamente mais alta em relação aos portadores assintomáticos (KAPLAN *et al.*, 1990; LEE *et al.*, 2006). Acredita-se que em portadores assintomáticos, os linfócitos T citotóxicos protejam contra a doença inflamatória, por reduzir a carga proviral do HTLV-1 e consequente diminuição da expressão antigênica, sendo observado nesses indivíduos o equilíbrio do sistema imune do hospedeiro e a infecção viral. Deste modo, a resposta imune não resulta na eliminação do vírus, mas pode ser determinante no curso das doenças associadas ao HTLV-1 (WODARZ *et al.*, 2001, BEST *et al.*, 2011). Por outro lado, a resposta imune específica para Tax do HTLV-1 é considerada por alguns autores como imunopatogênica, em vez de protetora, em pacientes com HAM/TSP, devido à alta citotoxicidade, a produção de citocinas inflamatórias, como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , associadas a danos no SNC (HANON *et al.*, 2000; ENOSE-AKAHATA *et al.* 2017).

Diferente do relatado na literatura na qual estudos apontam baixo nível de IgM no soro de portadores (ITOYAMA *et al.*, 1988; KITAJIMA *et al.*, 1988) em relação ao IgG, os dados desse trabalho apontam para uma alta porcentagem de reativos para IgM.

#### **5.10 Associação da reatividade anti-Tax com sexo e idade**

A avaliação entre os três tipos de anticorpos não mostrou uma associação significativa entre a idade e o índice de reatividade de IgG ( $p=0,160$ ), IgM ( $p=0,879$ ) ou IgG1 ( $p=0,985$ ), utilizando o GLMM. A avaliação por sexo, entretanto, mostrou diferenças entre mulheres e homens para IgG ( $p=0,016$ ), IgM ( $p=0,014$ ), mas não para IgG1 ( $p=0,698$ ). Com a reatividade entre as mulheres sendo significativamente maior que a observada nos homens (Figura 28).

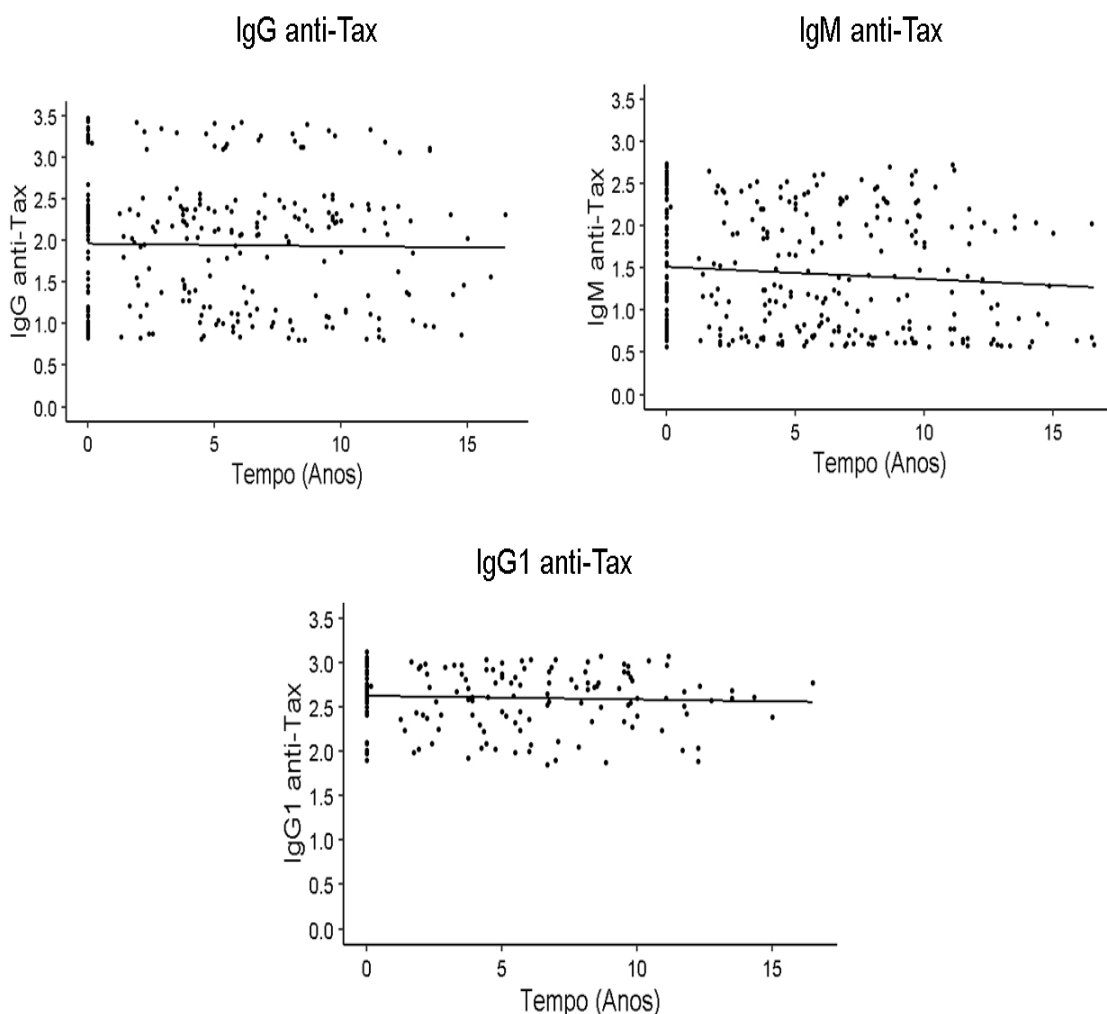


**Figura 28: Reatividade anti-Tax de acordo com o sexo.** Perfil de reatividade (DO/cut-off) de mulheres (box rosa) e homens (box azul) de acordo com a reatividade anti-Tax para o IgG, IgM e IgG1.

Estudos na literatura apontam uma relação entre o sexo e a idade para o surgimento e cronificação da HAM/TSP. Tipicamente, os sintomas desta doença, manifestam-se em pacientes durante a vida adulta tardia (50-60 anos de idade) e também com uma prevalência mais elevada de mulheres para homens numa proporção de aproximadamente 3:1, porém as razões para estas características também permanecem desconhecidas (MATSUURA *et al.*, 2016).

### 5.11 A reatividade anti-Tax na avaliação longitudinal

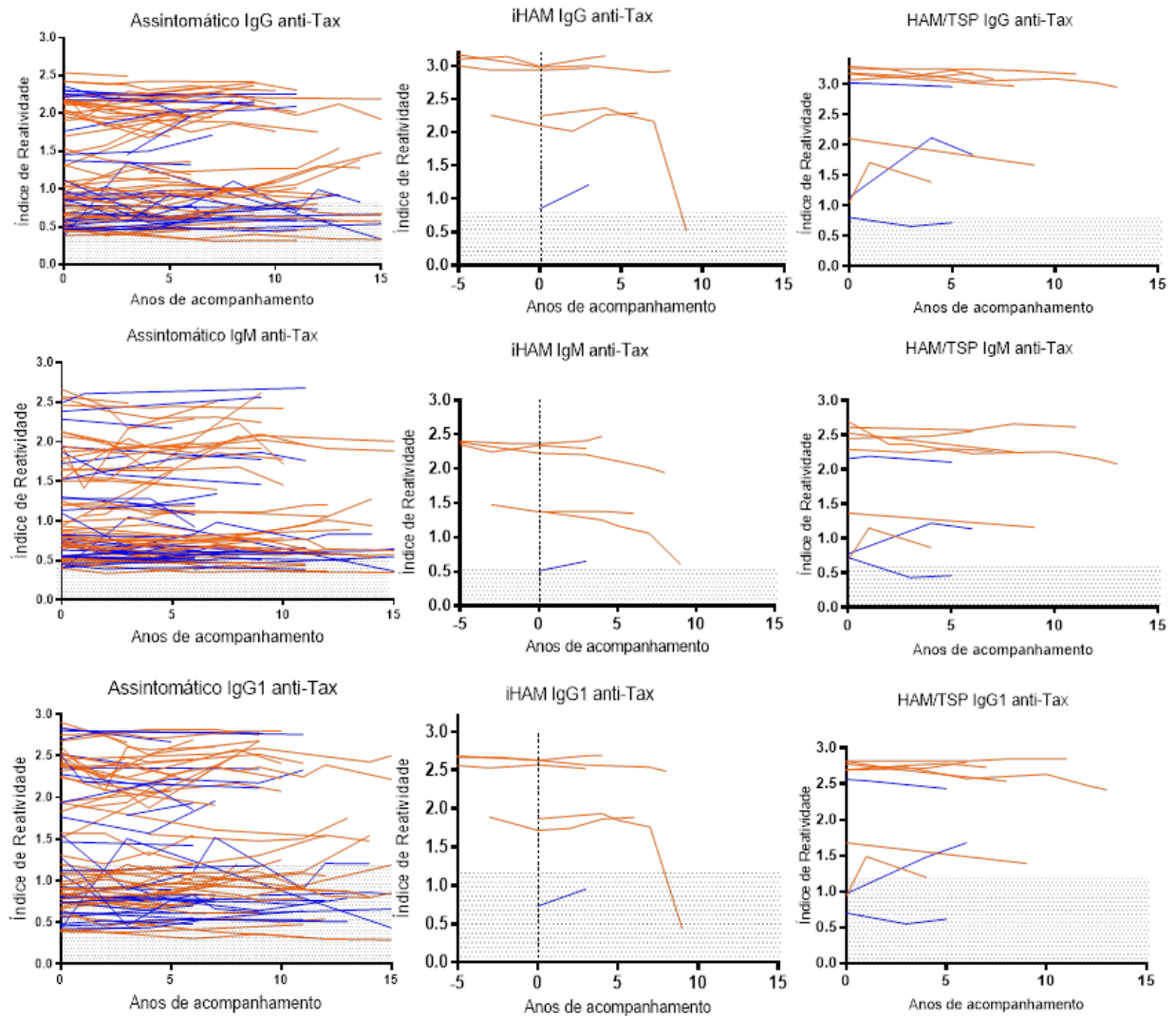
Em relação ao acompanhamento longitudinal para a resposta anti-Tax mensurada por ELISA, observa-se uma estabilidade na produção das três distintas imunoglobulinas ao longo do tempo de acompanhamento. Embora o gráfico abaixo aponte um ligeiro declínio ao longo dos anos para as três imunoglobulinas, não foi encontrada nenhuma relação estatística significativa entre o tempo de acompanhamento e a reatividade para o anticorpo IgG ( $p=0.828$ ), IgM ( $p=0.139$ ) e IgG1 (0.507) (Figura 29).



**Figura 29: Reatividade anti-Tax de acordo com o tempo.** Correlação do índice de reatividade (cut-off/DO) anti-Tax para o IgG, IgM e IgG1 em relação ao tempo em anos, através do GLMM.

Nos gráficos abaixo (Figura 30) cada uma das linhas representa um indivíduo (linhas azuis – sexo masculino e linhas laranjas – sexo feminino). O presente estudo longitudinal permitiu comprovar uma premissa muito importante, de que a resposta

anti-Tax permanece estável ao longo dos anos. Esta representação claramente aponta uma estabilidade da reatividade anti-Tax ao longo do tempo. O quadrante hachurado em cada um dos gráficos mostra o ponto de corte separando os indivíduos que não apresentaram resposta anti-Tax para cada uma das imunoglobulinas avaliadas.



**Figura 30: Avaliação longitudinal do perfil de reatividade anti-Tax.** Demonstração do índice de reatividade anti-Tax para o IgG, IgM e IgG1 em relação ao tempo em anos. Homens destacados em linhas azuis e mulheres em linhas laranjas. Quadrante hachurado em pontos refere-se ao ponto de corte e linha tracejada vertical em iHAM, refere-se ao ponto inicial em que o paciente preencheu os critérios de HAM/TSP, assim de -5 a 0 – iHAM assintomático e de 0 a 15 – iHAM sintomático.

Analisando-se os indivíduos assintomáticos, iHAM e HAM/TSP é possível verificar que os indivíduos que não mostram reatividade à proteína Tax, mantêm o padrão não reativo até o final do acompanhamento temporal, somente com poucos pontos a partir do décimo ano de acompanhamento mostrando baixa reatividade

(próxima ao ponto de corte). De forma semelhante, os indivíduos com padrão de reatividade de IgG, IgG1 e IgM anti-Tax, mantêm a resposta positiva média ou alta desde o início ao final do acompanhamento.

Interessante observar que para os assintomáticos, as imunoglobulinas IgG e IgG1 agrupam-se em indivíduos negativos (não reativos para Tax) e em indivíduos positivos, apresentando alta reatividade. Em sua maioria, não houve um número expressivo de indivíduos com reatividade entre o IR de 1,0 a 2,0. Conforme já destacado na figura 28, a reatividade é vista em maior número no sexo feminino.

Nos gráficos de indivíduos iHAM a linha tracejada vertical aponta o tempo exato do acompanhamento (média de 8 anos, variando de 3.8 a 16 anos) quando o indivíduo preencheu os critérios da HAM/TSP utilizando a escala ASIA (*American Spinal Injury Association (ASIA) impairment Scale*) que descreve o comprometimento funcional de uma pessoa como resultado de sua lesão medular. Para este grupo, pode ser observado que dentre os seis pacientes, somente um é do sexo masculino (16,67%), destacando-se na coorte GIPH a maior incidência de HAM/TSP em mulheres. Esse paciente masculino mostra resposta negativa para IgM e IgG1, e, somente baixa reatividade para IgG, próxima ao ponto de corte (IgG anti-Tax IR – 1,212).

Embora o baixo número de pacientes iHAM (que se refere exatamente à incidência de HAM/TSP em 16 anos de acompanhamento na coorte GIPH; MARTINS et al., 2017), as cinco pacientes mulheres mostram reatividade alta para as três imunoglobulinas desde o início do acompanhamento. De maneira interessante, uma das mulheres apresentou queda da reatividade para as três imunoglobulinas em torno do décimo ano de acompanhamento deste o estabelecimento da HAM/TSP. Relativo aos 10 pacientes com HAM/TSP acompanhados (7 mulheres e 3 homens), 6 indivíduos mostraram alta reatividade e somente 1 homem dentre estes. Um dos indivíduos do sexo masculino apresentou reatividade negativa para as três distintas imunoglobulinas e o terceiro apresentou uma tendência de aumento da reatividade à IgG-1 ao longo de 5 anos de avaliação, para IgG total subida ao longo dos 5 anos, com declínio a partir desse ponto; para IgM mostrou reatividade negativa na primeira coleta e reatividade próxima ao ponto de corte nas duas seguintes. Em relação às mulheres 5/7 (71,4%) apresentaram altos níveis de reatividade para todas as imunoglobulinas testadas. Duas apresentaram valores mais baixos, sendo que uma delas mostrou valores negativos

para IgM e IgG1 em dois e um tempo de coleta, respectivamente. Pelos gráficos é possível observar que os perfis de variação do índice de reatividade anti-Tax dos anticorpos IgG, IgM e IgG1 foram muito similares entre eles em todos os grupos analisados, sugerindo que a resposta humoral anti-Tax apresenta uma produção interligada dessas classes e subclasses de anticorpos.

Gessain & Gout (1992) apontaram a preponderância de HAM/TSP nas mulheres em todo o globo, com relação de 1,5:1 a 3,5:1 (mulheres:homens). Nagai e colaboradores (1998) comprovaram em uma coorte japonesa níveis mais altos de carga proviral em mulheres em relação aos homens. Anticorpos anti-Tax correlacionam-se com uma maior probabilidade de transmissão do vírus, além de influenciar no aumento da carga proviral (SOUZA *et al.*, 2011). A interação HTLV-1 *versus* hospedeiro é diferente em cada indivíduo, dependendo certamente, do modo de transmissão, idade à infecção, bem como o perfil de resposta Th1/Th2 apresentada pelo mesmo.

Pode ser hipotetizado que os indivíduos assintomáticos que apresentam o padrão alto de reatividade anti-Tax para todas as imunoglobulinas deveriam ser acompanhados em intervalos temporais mais curtos, tendo em vista a possibilidade de desenvolvimento de HAM/TSP. Destaca-se o fato de que 43,58% dos assintomáticos apresentaram IgM anti-Tax, o que sugere que nesses indivíduos a atividade do HTLV-1 tem sido constante, e muitos dentre os mesmos apresentaram índices de reatividade altos, bem assemelhados aos apresentados pelos grupos iHAM e HAM/TSP.

Tem sido comprovado que os hormônios femininos desempenham um papel importante na predisposição para muitas doenças infecciosas. Evidências apontam que o estrogênio causa mudanças tanto no número total de linfócitos como nos seus diferentes subtipos. Kanda e Tamaki (1999) comprovaram em estudos *in vitro*, que os estrogênios promovem a proliferação dos linfócitos T, e a diferenciação, proliferação e sobrevivência dos linfócitos B, induzindo maior produção de imunoglobulinas IgG e IgM.

Lima e colaboradores (2005) mostraram que as mulheres, além de ter uma maior incidência de HAM/TSP, apresentam uma progressão mais rápida da doença, especialmente se a mesma iniciou o adoecimento antes da menopausa. Os autores acompanharam 88 pacientes com HAM/TSP, sendo dentre esses 60 mulheres (68,2%). Dividiu-se o grupo das mulheres em <50 anos e ≥50 para designar o

desenvolvimento de HAM/TSP antes e após a menopausa. O índice de progressão de doença foi mais alto naquelas mulheres que desenvolveram a HAM/TSP com idade <50 anos, indicando um provável papel dos hormônios sexuais na evolução da doença.

Na tabela abaixo (Tabela 2) pode ser observado que os seis pacientes que desenvolveram a HAM/TSP (iHAM), homem e mulheres, possuem alta carga proviral. As pacientes 506.F5, 264.F3 e 803.F5 desenvolveram HAM/TSP antes dos 50 anos, com grande probabilidade, então, de apresentarem progressão rápida. Essas três pacientes apresentam ainda altos índices de reatividade para as três imunoglobulinas, comparado às duas outras mulheres (508.F6 e 538.F5), e ao homem, que possui reatividade positiva somente para IgG. Os índices de IgM anti-Tax certamente apontam para a atividade viral.

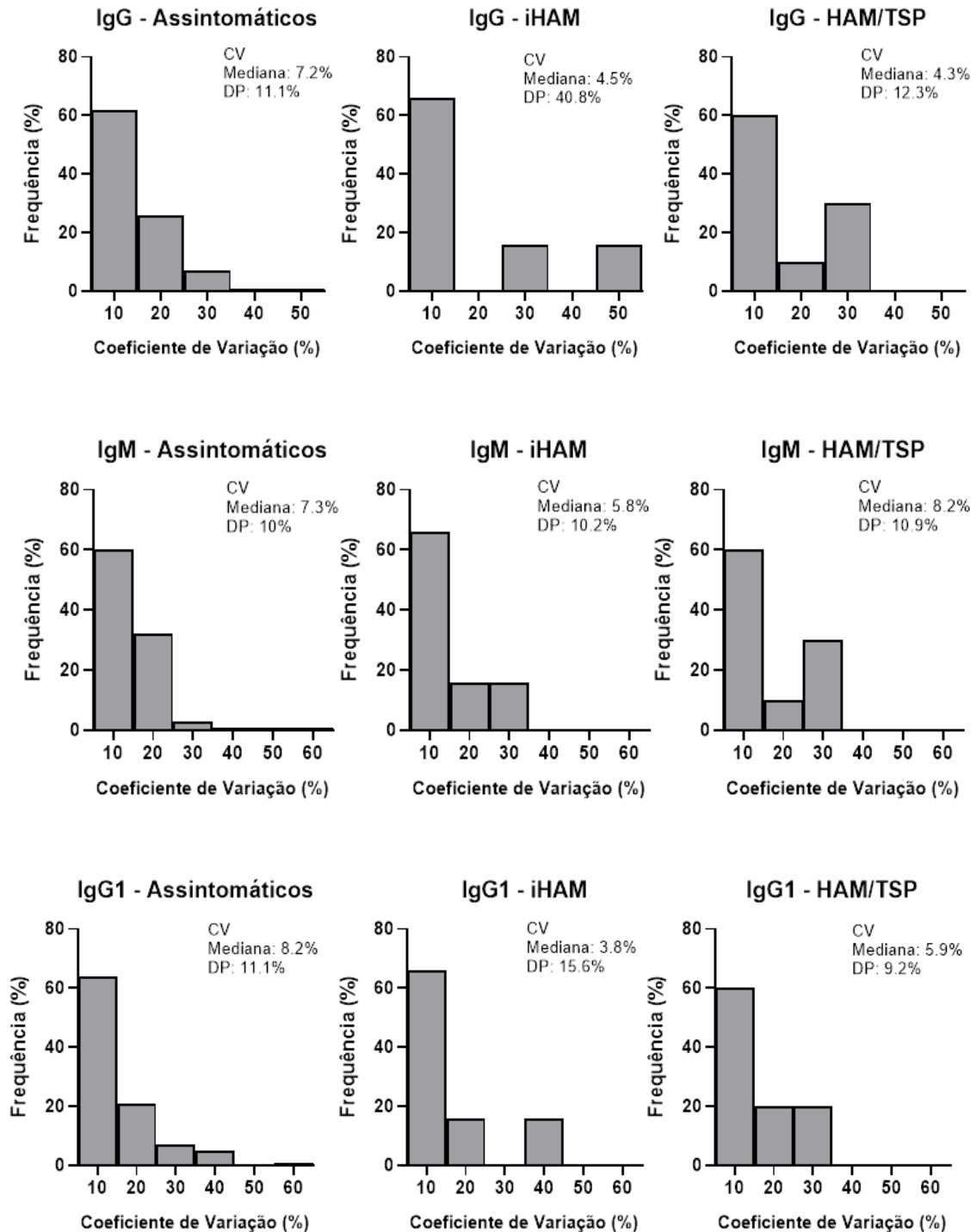
**Tabela 2 Características dos indivíduos iHAM relativas ao tempo após instalação da HAM/TSP (escala ASIA)**

Paciente	Idade/HT	Sexo	Tempo de doença	CPV	IgG	IgG1	IgM
506.F5	35	F	2	2.7	2.993	2.628	2.367
264.F3	49	F	3	2.85	2.977	2.631	2.229
803.F5	49	F	1	2.32	2.984	2.545	2.3
508.F6	53	F	2	2.79	2.019	1.744	1.378
538.F5	59	F	4	2.47	2.367	1.936	1.255
758.F3	50	M	4	2.33	1.212	0.954	0.652

**Tabela 2:** iHAM - HAM/TSP incidente; FA - Fase de avaliação e coleta de amostras clínicas; Idade/HT idade, em anos, quando o paciente passou de assintomático a HAM/TSP; CPV – carga proviral (log nº de cópias/10.000 células); Tempo de Doença - número de anos desde a HAM/TSP instalada; IgG, IgG1 e IgM anti-Tax em Índice de Reatividade (DO/cut-off) obtido nos ELISAs indiretos.

Como destacado anteriormente, a estabilidade da resposta anti-Tax ao longo dos anos também indicou um baixo coeficiente de variação (desvio padrão/média x100) desses anticorpos, tendo em cada grupo uma frequência de 60% das amostras variando somente até 10%, o que está de acordo com os achados anteriores de outros grupos que acompanharam por longo tempo a resposta anti-Tax em mães e seus filhos (KUSUHARA *et al.*, 1995; KASHIWAGI *et al.* 1990). O coeficiente de variação dos anticorpos não foi significativamente diferente em nenhum dos anticorpos avaliados, IgG ( $p = 0.8548$ ), IgM ( $p = 0,8452$ ) ou IgG1 anti-

Tax ( $p = 0,5883$ ) e para nenhum dos grupos estudados, indicando que não há diferenças na variação de amostras individuais entre esses grupos. Assim, as raras mudanças no nível dos anticorpos não são necessariamente clinicamente relevantes, uma vez que os indivíduos assintomáticos não apresentaram piora clínica, como a incapacidade motora durante o acompanhamento.



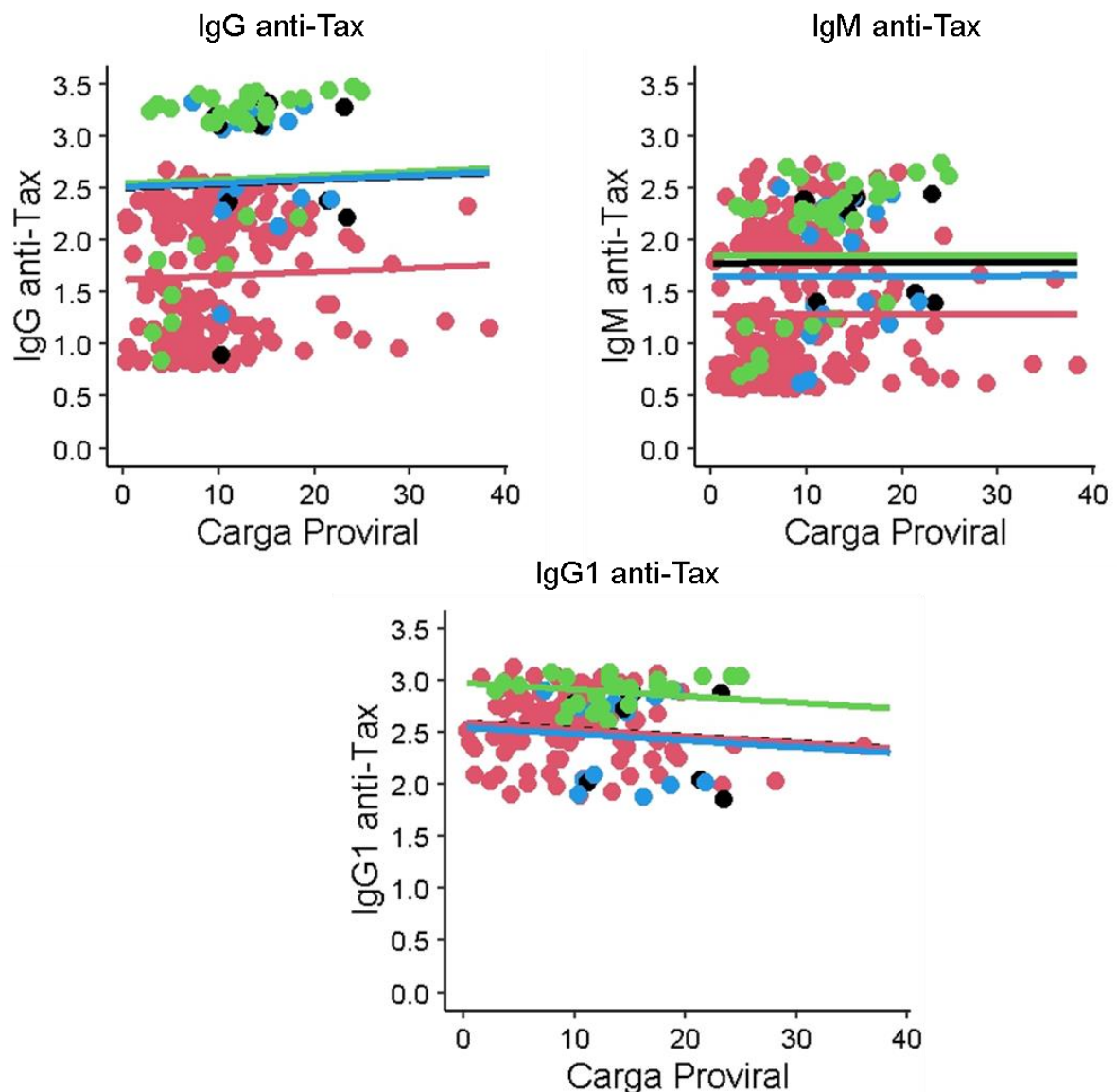
**Figura 31: Coeficiente de variação do índice de reatividade anti-Tax.** Coeficiente de Variação (%) do índice de reatividade anti-Tax para o IgG (primeira fileira), IgM (segunda fileira) e IgG1 (terceira fileira) de 78 portadores assintomáticos (301 amostras), 10 pacientes com HAM/TSP (34 amostras) e 6 indivíduos incidentes para a HAM/TSP (iHAM, 26 amostras) durante o acompanhamento (1.1 a 16.6 anos). Mediana e Desvio Padrão (DP) do Coeficiente de variação (CV).

## 5.12 A reatividade anti-Tax e a Carga Proviral

Em 2017, Martins e colaboradores, trabalhando com essas mesmas amostras, mas com o valor da média da carga proviral de cada paciente mostraram que os indivíduos assintomáticos possuíam um nível significativamente menor de carga proviral em comparação com o grupo HAM/TSP ( $p = 0,018$ ) e com o grupo iHAM ( $p = 0,004$ ), enquanto a diferença entre os grupos HAM e iHAM não foi significativa ( $p = 0,349$ ) (MARTINS *et al.*, 2017). Sabe-se que a alta carga proviral e a presença de anticorpos IgM e altos títulos de anticorpos IgG e IgA contra as proteínas HTLV-1 distinguem pacientes HAM/TSP de portadores de HTLV-1 (KIRA *et al.*, 1992).

Ao avaliar a correlação entre a carga proviral, transformada em log, e os anticorpos anti-Tax encontrou-se uma correlação significativa pelo teste de *Spearman* ( $p < 0.001$ ) para todos os anticorpos, apesar de a correlação ser fraca,  $\rho = 0.437$ ,  $0.379$  e  $0.374$  para IgG, IgG1 e IgM, respectivamente. Neste tipo de correlação, mesmo que o valor-p seja extremamente baixo, a magnitude da correlação (coeficiente  $\rho$  de correlação de *Spearman*) pode ser pequena. Isso pode ocorrer quando há muita variabilidade nos dados ou quando a relação entre as variáveis não é linear, mas sim curvilínea ou não linear de outra forma.

Na análise pelo modelo misto da raiz quadrada da carga viral em função dos grupos de portadores, controlada por paciente, observa-se o efeito da carga proviral somente sobre a reatividade IgG1 anti-Tax ( $p = 0.047$ ) (Figura 32). Tais dados corroboram os achados encontrados por de Souza e colaboradores, 2011, que não encontraram nenhuma relação estatisticamente significativa entre carga proviral de portadores assintomáticos ( $n = 23$ ), pacientes HAM/TSP ( $n = 30$ ) e portadores de doenças reumatológicas ( $n = 7$ ) e a resposta IgG anti-Tax. O referido trabalho avaliou a resposta IgG anti-Tax através de citometria de fluxo com a expressão de Tax em um sistema eucarioto, através de uma transfecção utilizando um carreador viral (de SOUZA *et al.*, 2011).



**Figura 32: Correlação da Carga Proviral do HTLV-1 e índice de reatividade anti-Tax.** Correlação da Carga Proviral (cópias provirais/10.000 células; raiz quadrada) com a resposta anti-Tax IgG, IgM e IgG1 no grupo dos assintomáticos (pontos rosa), iHAM de fase assintomática (pontos preto), iHAM de fase sintomática (pontos azuis) e HAM/TSP (pontos verdes). As linhas representam uma curva de tendência.

Um trabalho recente avaliando a resposta contra diferentes antígenos (Tax, Env, Gag p15, Gag p19 e Gag p24) mostrou uma relação significativa positiva entre a carga proviral e todos os anticorpos contra esses antígenos em portadores assintomáticos ( $n=263$ ), mas tal associação não foi encontrada em pacientes com ATL ( $n=25$ ) e HAM/TSP ( $n=56$ ) e indicaram que o tamanho das amostras nos grupos poderia ser muito pequeno para revelar uma correlação fraca (YAMADA *et al.*, 2024).

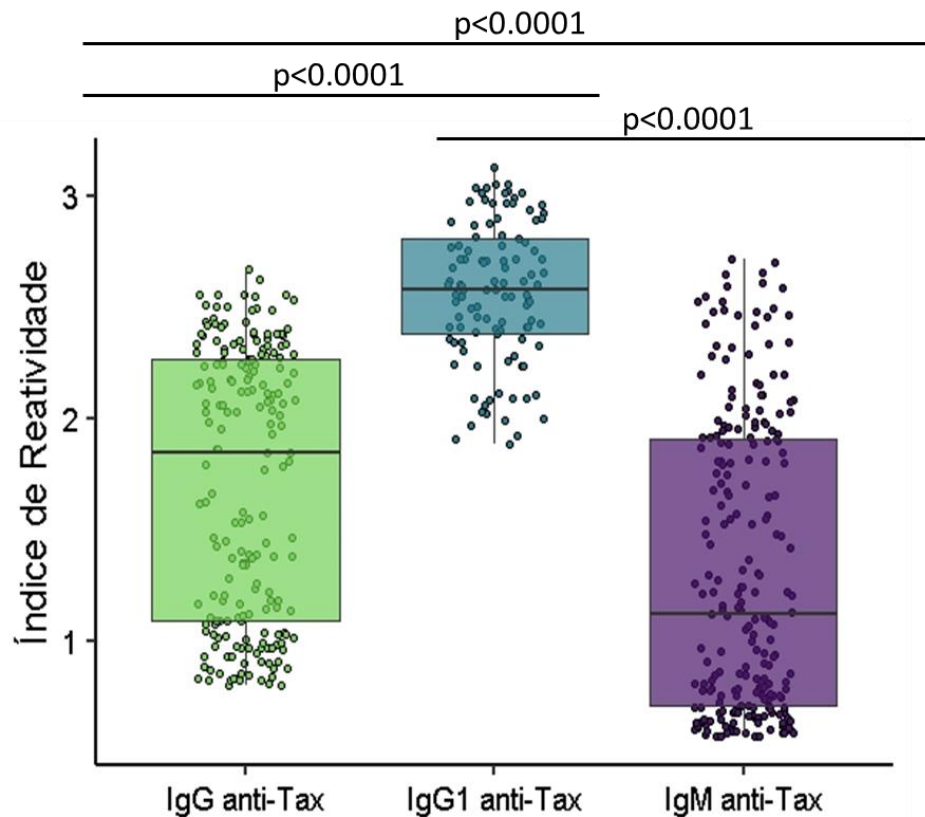
### 5.13 A reatividade anti-Tax e os assintomáticos

Ao se avaliar a reatividade anti-Tax detectada entre os 78 indivíduos encontrou-se 43,58% reativos para IgM (34/78), 52,56% para IgG (41/78) e 44,87% para IgG1 (35/78). Grande parte das publicações avaliam a resposta anti-Tax por IgG e em portadores assintomáticos a reatividade possui uma grande variação de: 27–37% em amostras provenientes do Japão e EUA (LAL *et al.*, 1994) 85% de reatividade em amostras de um estudo americano (BURBELO *et al.*, 2008), em amostras brasileiras 50% (de SOUZA *et al.*, 2010) e 38,25% (de SOUZA *et al.*, 2010). A grande variação no número de amostras, nas populações estudadas, a obtenção de antígenos e ensaios estão associados a essas diferenças encontradas na reatividade, o que aponta para a necessidade de estudos direcionados, tanto pelo fato de Tax ser a principal proteína alvo dos CLTs quanto de ser um alvo nas técnicas imunoterápicas que estão sendo pesquisadas (KANNAGI *et al.*, 2019).

Outro importante fator a ser observado é a alta reatividade de IgM, o que além de indicar uma provável multiplicação viral constante durante a fase crônica da infecção, efeito também observado nos outros grupos avaliados, pode ser um indicio da ocorrência de *bursts* (“disparos”) intermitentes da expressão de Tax, possivelmente levando à regulação positiva de genes envolvidos em dano ao DNA e senescência, ambos associados à expressão ativa do provírus. A alternância esporádica de ativação/desativação da expressão de Tax é essencial para a manutenção da população de células infectadas, em especial nas células leucêmicas induzidas pelo vírus (MAHGOUB *et al.*, 2018).

A média do índice reatividade é menor em IgM do que em IgG em assintomáticos e há uma diferença significativa entre eles (Figura 33). Embora as afinidades de ligação a antígenos dos anticorpos IgM sejam tipicamente menores do que as dos IgG, sua polivalência permite uma ligação de alta avidéz, o que torna os anticorpos IgM particularmente eficientes na ligação a antígenos presentes em baixas concentrações, como é o caso da Tax, e a antígenos não proteicos, como carboidratos ou lipídios presentes em superfícies microbianas (BRUCE *et al.*, 2020).

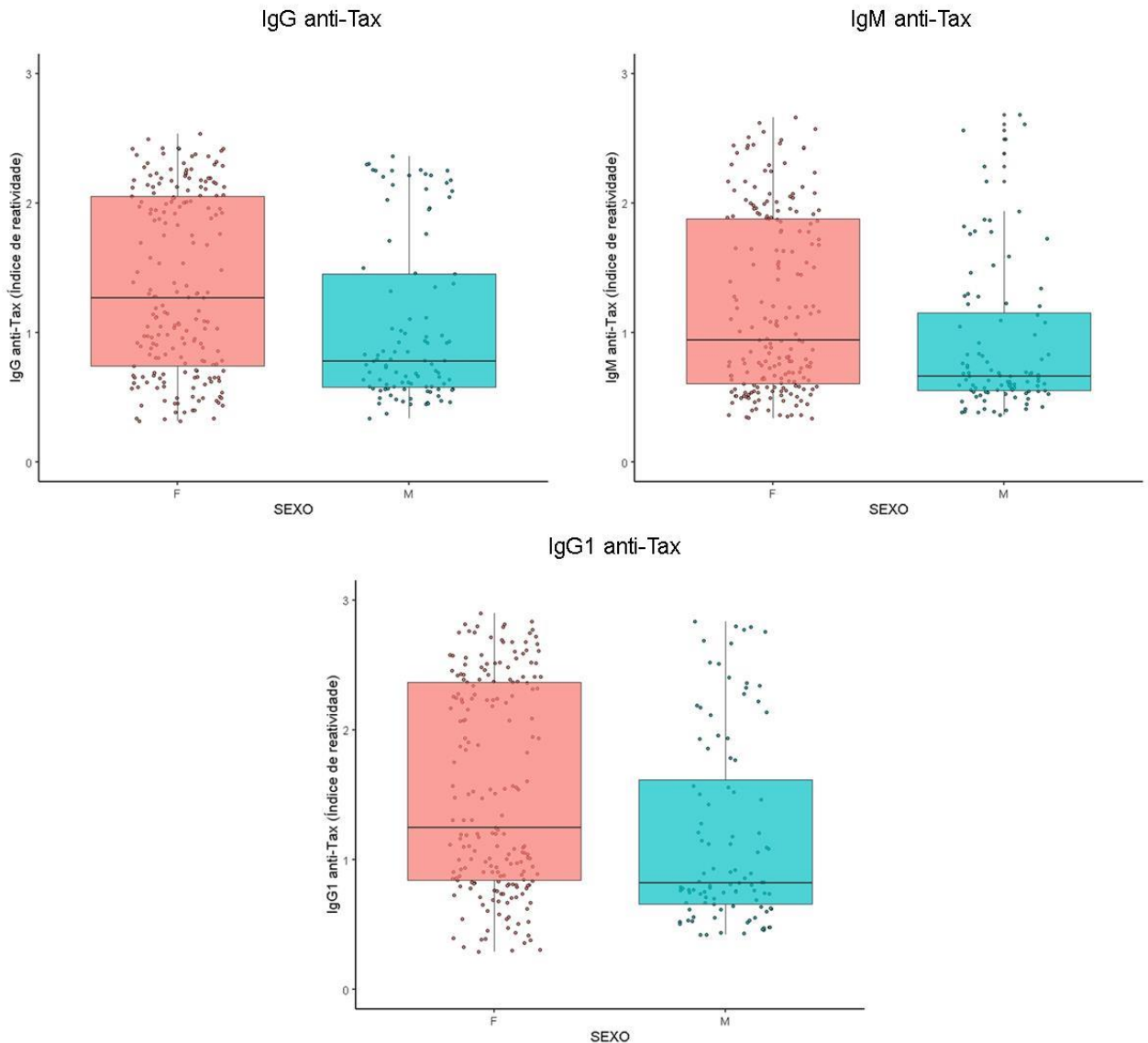
### Reatividade anti –Tax em Assintomáticos



**Figura 33: Índice de reatividade anti-Tax em assintomáticos:** Índice de reatividade (DO/cut-off) dos diferentes isotipos avaliados (IgG, IgG1 e IgM anti-Tax) pelo modelo misto.

A reatividade (%) IgG1 anti-Tax também foi parecida com as outras classes de anticorpos, mas encontrou-se uma diferença significativa ao avaliar índice. O IgG1 é normalmente a subclasse mais abundante de IgG, as respostas contra antígenos de proteínas solúveis e proteínas de membrana induzem principalmente essa subclasse de anticorpos. A IgG1 possui uma excelente capacidade efetora e de neutralização de partículas virais e toxinas. Em assintomáticos, a resposta IgG1 contra antígenos do HTLV-1 foi encontrada em 30% (8/27) dos indivíduos (COELHO-DOS-REIS, *et al.* 2009).

As mulheres representaram 61,53% do grupo avaliado (48/78) e apresentaram maior índice de reatividade que os homens, mas não houve diferenças significativas para nenhum anticorpo (IgM anti-Tax p:0.163; IgG p: 0.111 e IgG1 p: 0.133). A idade também não mostrou nenhuma relação com a resposta nos indivíduos assintomáticos (IgM anti-Tax p:0.521; IgG p: 0.112 e IgG1 p: 0.936) encontradas a partir da análise do modelo misto (Figura 34).



**Figura 34: índice de reatividade anti-Tax de acordo com o sexo em assintomáticos.** Perfil de reatividade (DO/cut-off) de mulheres (box rosa) e homens (box azul) de acordo com a reatividade anti-Tax para o IgG, IgM e IgG1 somente entre assintomáticos.

### 5.13.1 Avaliação clínica dos indivíduos HTLV-1 positivos assintomáticos

Dentre os portadores do HTLV-1 assintomáticos acompanhados pela equipe de especialistas clínicos somente 26.9% (21/78) não relataram nenhum sintoma e nem tiveram nenhum sinal clínico relevante observado para a infecção do HTLV-1. É importante destacar que muitas coortes no Brasil e outras partes do globo apontam essa ocorrência, sendo atualmente aceito que sinais e sintomas especialmente dos polos neurológico (TANAJURA *et al.*, 2015); e dermatológico (NOBRE *et al.*, 2006; NOBRE *et al.*, 2006 – coorte GIPH), dentre outros, são observados em indivíduos infectados pelo HTLV-1, sendo mesmo assim considerados como “assintomáticos”. Recentemente estudos de meta-análise baseados em dados epidemiológicos mundiais entre positividade para o HTLV-1 e desfechos de saúde, apontam um maior risco relativo de morte prematura em HTLV-1 positivos, ainda que estes indivíduos nunca tenham desenvolvido HAM/TSP ou ATL (SCHIERHOUT *et al.*, 2020). Dados de uma coorte da Espanha a partir de indivíduos que foram hospitalizados observaram que doenças comuns relacionadas à idade, como eventos cardiovasculares, doenças neurodegenerativas, anormalidades metabólicas e osteoporose, têm ocorrido consistentemente em portadores de HTLV-1. Os autores propuseram que a inflamação crônica e o envelhecimento acelerado podem ter ocorrido mais cedo em pessoas infectadas pelo HTLV-1 em comparação com indivíduos não infectados e que essas condições são responsáveis pela menor sobrevivência em indivíduos infectados pelo HTLV-1, mesmo naqueles que não desenvolvem HAM/TSP ou ATL (RAMOS *et al.*, 2020).

Os dados do presente estudo apontam que na avaliação do grupo assintomático pela equipe de neurologia, 32% (25/78) dos indivíduos do estudo apresentaram sinais ou sintomas, sendo os mais comuns: parestesia, cãibras, constipação intestinal, dor lombar, hiperreflexia, reflexo patelar aumentado e fraqueza muscular. Manifestações dermatológicas foram encontradas em 23.1% (18/78), sendo os achados mais comuns: a dermatite crônica avaliada por biópsia, escabiose, líquen, ictiose, hiperkeratose e ceratose plantar, onicomicose, infecção por *Tinea pedis* e *Tinea corporis*, dermatofitose, leucodermia solar, vitiligo, dermatite seborréica e dermatite de contato, intertígio e prurido. As manifestações oftalmológicas foram observadas em 29.5% (23/78) do grupo de assintomáticos, com relatos de ceratoconjuntivite sicca, uveíte e olho seco. Manifestações

psiquiátricas foram relatadas em 32% (25/78) sendo relatados depressão, ansiedade, estresse grave e transtorno de adaptação. E por fim manifestações reumatológicas presentes em 15.4% (12/78) do grupo avaliado com o relato de fibromialgia, reumatismo, artrose e osteoartrite.

Nem todos os indivíduos que apresentaram sintomas mostraram reatividade anti-Tax, e da mesma forma alguns indivíduos não tinham nenhuma queixa clínica, mas apresentaram reatividade anti-Tax (Tabela 3). Não há diferença entre reativos e não reativos para nenhum dos anticorpos, comparando-se cada uma das especialidades (Teste Exato de Fisher,  $p > 0.05$ ).

**Tabela 3** Frequência de sinais e sintomas entre a reatividade dos anticorpos

Assintomáticos	IgG			IgG1			IgM		
	Reativos 52.5% (n=41)	Não Reativos 47.5% (n=37)	p	Reativos 44.9% (n=35)	Não Reativos 55.1% (n=43)	p	Reativos 43.8% (n=34)	Não Reativos 56.4% (n=44)	p
Neurologia	17.9 (14)	14.1 (11)	0.808	17.9 (14)	14.1 (11)	0.224	11.5 (9)	20.5 (16)	0.484
Psiquiatria	21.7 (17)	10.2 (8)	0.088	19.5 (15)	12.8 (10)	0.088	15.3 (12)	16.6 (13)	0.63
Oftalmologia	12.8 (10)	16.6 (13)	0.329	11.5 (9)	17.9 (14)	0.619	8.9 (7)	20.5 (16)	0.143
Dermatologia	10.2 (8)	14.1 (11)	0.428	10.2 (8)	12.8 (10)	>0.999	5.1 (4)	17.9 (14)	0.058
Reumatologia	7.6 (6)	7.6 (6)	>0.999	6.4 (5)	8.9 (7)	>0.999	6.4 (5)	8.9 (7)	>0.999

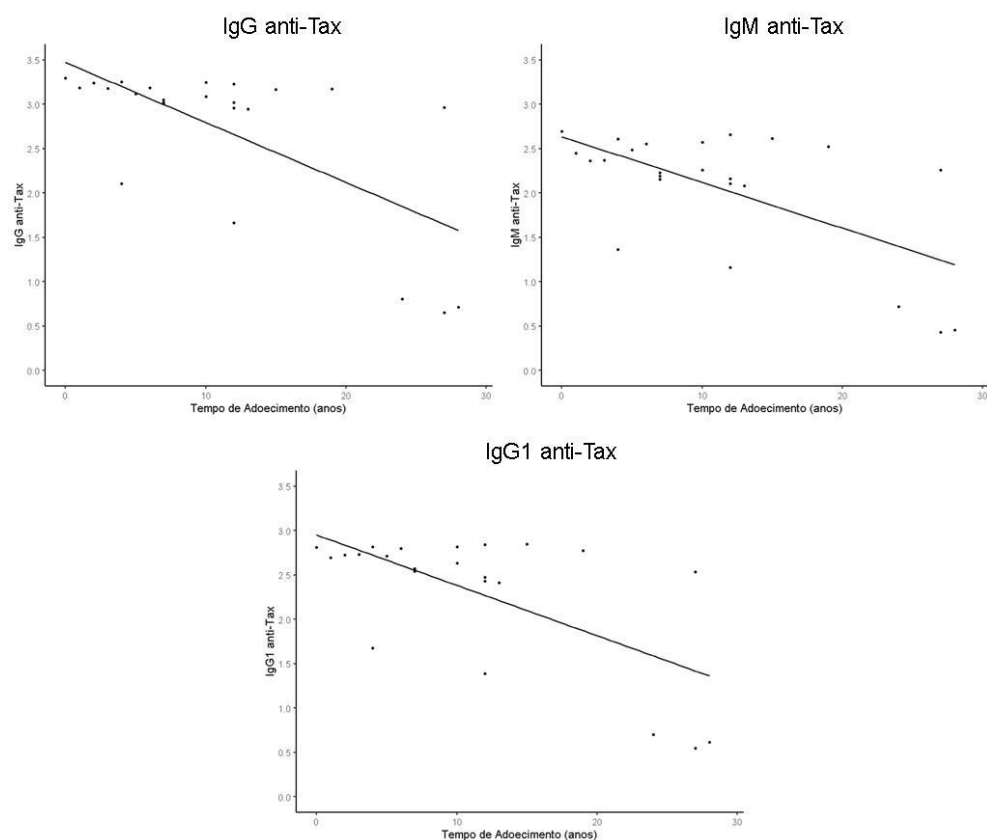
**Tabela 3:** Frequência, em porcentagem, de queixas relatadas e observadas (sintomas/sinais clínicos), para as especialidades médicas, em assintomáticos que foram reativos e não reativos para o IgG, IgG1 e IgM anti-Tax. Entre parênteses a quantidade de indivíduos.

Assim, a frequência dos sinais e sintomas não apresentou correlação direta com a reatividade anti-Tax. Porém, de maneira interessante, o percentual de sintomas foi maior nos indivíduos que apresentaram reatividade anti-Tax do que naqueles que não apresentaram reatividade no grupo de mulheres, tendo ocorrido o contrário em relação aos homens (excetuando-se IgM anti-Tax em mulheres). Considerando-se o total de sinais e sintomas observados para o total das cinco especialidades avaliadas, observou-se na porcentagem de indivíduos com sinais e sintomas e reatividade anti-Tax / e ausência de reatividade anti-Tax para IgG anti-Tax: (♀ 62,5% / 27,5%; ♂ 36,6% / 63,3%); IgG1 anti-Tax (♀ 60,4% / 39,5%; ♂ 43,3% / 56,6%) e IgM anti-Tax (♀ 47,9% / 52,1%; ♂ 36,6% / 63,3%). Novas formas de abordagem estatística deverão ser avaliadas.

### 5.14 A reatividade anti-Tax e o adoecimento

Ao avaliar especificamente o grupo HAM incidente (iHAM) não se encontrou nenhuma variação do índice de reatividade dos anticorpos comparando-se o estado antes e após o diagnóstico da HAM/TSP ( $p=0.749$  para IgG;  $0.734$  para IgG1 e  $0.269$  para IgM).

Apesar da estabilidade dos níveis de anticorpos ao longo do tempo, nos pacientes com a HAM/TSP, entretanto, a relação da reatividade anti-Tax com o tempo de doença é uma correlação negativa para os anticorpos IgG ( $p<0.0001$ ;  $\rho(\text{rho}):-0.637$ ), para o IgG1 ( $p: 0.001$ ;  $\rho(\text{rho}):-0.442$ ) e para IgM ( $p<0.0001$ ,  $\rho(\text{rho}):-0.637$ ), avaliados pela correlação de *Spearman* (Figura 35). Embora se trate de um pequeno grupo de somente 10 indivíduos, essa relação pode indicar uma adaptação do sistema imune devido a uma exaustão da resposta humoral anti-Tax ao longo da doença ou uma menor exposição do antígeno (Tax) no curso da infecção, bem como o uso de anti-inflamatórios e outras drogas imunossupressoras.



**Figura 35: Correlação da Reatividade anti-Tax com o tempo de adoecimento.** Correlação da resposta anti-Tax IgG, IgM e IgG1 em pacientes com HAM/TSP.

## 6. CONCLUSÃO

No presente trabalho foi avaliada a reatividade de anticorpos anti-Tax como possível marcador prognóstico.

A resposta anti-Tax para os três anticorpos permanece estável ao longo dos anos tanto para indivíduos com resposta anti-Tax baixa ou ausente, quanto para indivíduos resposta anti-Tax alta. Sugere-se um acompanhamento em intervalos mais curtos dos indivíduos que possuem a resposta anti-Tax elevada dentre os indivíduos considerados “assintomáticos”. Esta premissa é reforçada pelo fato da incidência de HAM na coorte estudada ter ocorrida em 5/6 indivíduos com resposta anti-Tax elevada para as três imunoglobulinas estudadas.

As mulheres representam o grupo com maior reatividade para os três anticorpos. Conforme destacado na conclusão anterior relativo aos indivíduos nos quais a incidência de HAM ocorreu ao longo do estudo, os cinco dentre os seis indivíduos eram mulheres, as quais apresentaram alta reatividade desde o início do acompanhamento.

Em relação aos assintomáticos, os pacientes HAM/TSP possuem uma reatividade maior para Tax, e o mesmo é observado para os pacientes iHAM antes de completarem o quadro para diagnóstico de HAM/TSP.

Encontrou-se uma correlação positiva entre a carga proviral e a resposta IgG anti-Tax na avaliação pelo modelo misto.

Relativo à ocorrência de sinais e sintomas para os cinco grupos clínicos avaliados nos indivíduos “assintomáticos”, não encontrou-se correlação significativa com a reatividade anti-Tax para nenhuma das imunoglobulinas. Não houve diferença de frequência de sinais e sintomas entre os que são reativos e não reativos.

## 7. PERSPECTIVAS

- Avaliar a resposta anti-Tax usando toda a porção da proteína, visto que as porções central e N-terminal, também são imunogênicas;
- Realizar uma abordagem no grupo dos pacientes considerando os sinais e sintomas apresentados em cada fase e abordagens de tratamento que interferem na resposta imune.

## 8. REFERÊNCIAS

- ANDRADE DE SOUSA B, DOS SANTOS LV, OLIVEIRA TR, DIAS AL, ARAÚJO DA COSTA C, MEDEIROS SOUSA RC, et al. Dermatological manifestations in patients with human T-cell lymphotropic virus at a reference service in Amazon. **Int J Dermatol.** 58(8):953-960. 2019
- ALEFANTIS, T.; JAIN, P.; AHUJA, J.; MOSTOLLER, K.; AND WIGDAHL, B. HTLV-1 Tax nucleocytoplasmic shuttling interaction with the secretory pathway, extracellular signaling, and implications for neurologic disease. **Journal of Biomedical Science.** vol 12, p. 961-974. 2005.
- ALEFANTIS, T.; FLAIG, K.E.; WIGDAHL, B.; JAIN, P. Interaction of HTLV-1 Tax protein with calreticulin: implications for Tax nuclear export and secretion. **Biomedicine & Pharmacotherapy.** vol 61, pg 194-200. 2007.
- ARAÚJO AQ, LEITE AC, LIMA MA, SILVA MT. HTLV-1 and neurological conditions: when to suspect and when to order a diagnostic test for HTLV-1 infection? **Arq Neuropsiquiatr.**67(1):132-138. 2009
- ARAUJO A., HALL W. W. Human T-lymphotropic virus type II and neurological disease. **Annals Neurology.** 56, 10–19. doi: 10.1002/ana.20126. 2004
- ARISAWA, K., SODA, M., ENDO, S., KUROKAWA, K., KATAMINE, S., SHIMOKAWA, I., et al. Evaluation of adult T-cell leukemia/lymphoma incidence and its impact on non-Hodgkin lymphoma incidence in southwestern Japan. **Int. J. Cancer** 85, 319–324. doi: 10.1002/(sici)1097-0215(20000201)85:3<319::aid-ijc4>3.0.co;2-b. 2000
- BELLINO S, TRIPICIANO A, PICCONI O, FRANCAVILLA V, LONGO O, SGADARI C et al. The presence of anti-Tat antibodies in HIV-infected individuals is associated with containment of CD4+ T-cell decay and viral load, and with delay of disease progression: results of a 3-year cohort study. **Retrovirology.**11:49. 2014
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. Guia de Manejo Clínico da Infecção pelo HTLV / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. **Brasília: Ministério da Saúde.** 104p. il. 2021
- BITTENCOURT, A. C. L.; FARRÉ, L Patologia da Infecção pelo HTLV. In *Bogliolo*, 8ed Volume 1, pg 1361-1372. 2008.
- BOHANNON C, POWERS R, SATYABHAMA L, CUI A, TIPTON C, MICHAELI M, SKOUNTZOU I, MITTLER RS, KLEINSTEIN SH, MEHR R, LEE FE, SANZ I, JACOB J. Long-lived antigen-induced IgM plasma cells demonstrate somatic mutations and contribute to long-term protection. **Nat Commun.** 2016 Jun 7;7:11826. doi:

10.1038/ncomms11826. Erratum in: Nat Commun. 2016 Aug 16;7:12687. Lee, Francis Eun-Hyung [Lee, Frances Eun-Hyung]. PMID: 27270306; PMCID: PMC4899631. 2016

BOYLE MJ, CHAN JA, HANDAYUNI I, REILING L, FENG G, HILTON A, KURTOVIC L, OYONG D, PIERA KA, BARBER BE, WILLIAM T, EISEN DP, MINIGO G, LANGER C, DREW DR, DE LABASTIDA RIVERA F, AMANTE FH, WILLIAMS TN, KINYANJUI S, MARSH K, DOOLAN DL, ENGWERDA C, FOWKES FJI, GRIGG MJ, MUELLER I, MCCARTHY JS, ANSTEY NM, BEESON JG. IgM in human immunity to *Plasmodium falciparum* malaria. **Sci Adv**. Sep 25;5(9):eaax4489. doi: 10.1126/sciadv.aax4489. PMID: 31579826; PMCID: PMC6760923. 2019

BOXUS M.; TWIZERE J.C.; LEGROS S.; DEWULF J.F.; KETTMANN R.; WILLEMS L. The HTLV-1Tax interactome. **Retrovirology**. vol 5, n. 76, p. 1-24. 2008.

BURBELO PD, MEOLI E, LEAHY HP, GRAHAM J, YAO K, OH U, JANIK JE, MAHIEUX R, KASHANCHI F, IADAROLA MJ, JACOBSON S. Anti-HTLV antibody profiling reveals an antibody signature for HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). **Retrovirology**. Oct 20;5:96. doi: 10.1186/1742-4690-5-96. PMID: 18937847; PMCID: PMC2580768. 2008

BUSCH MP, KLEINMAN SH, TOBLER LH, KAMEL HT, NORRIS PJ, WALSH I, MATUD JL, PRINCE HE, LANCIOTTI RS, WRIGHT DJ, LINNEN JM, CAGLIOTI S. Virus and antibody dynamics in acute west nile virus infection. **J Infect Dis**. Oct 1;198(7):984-93. doi: 10.1086/591467. PMID: 18729783. 2008

CATALAN-SOARES, B.; CARNEIRO-PROIETTI, A.B.E.; PROIETTI, F.A.; GIPH. Heterogeneous geographic distribution of Human T-cell lymphotropic viruses I and II (HTLV-I/II): serological screening prevalence rates in blood donors from large urban areas in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**. vol 21, n. 3, p. 926-931. 2005.

CARPENTIER, A.; BAREZ, P.; HAMAIDIA, M.; GAZON, H.; BROGNIEZ, A.; PERIKE, S.; GILLET, N.; WILLEMS, L. Modes of Human T Cell Leukemia Virus Type 1 Transmission, Replication and Persistence. **Viruses**.vol 7, p. 3603-3624. 2015.

CALATTINI, S.; CHEVALIER, S. A.; DUPREZ, R.; BASSOT, S.; FROMENT, A.; MATHIEUX, R.; GESSAIN, A. Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. **Retrovirology**. vol. 2, p. 1-4, 2005.

CALATTINI, S.; CHEVALIER, S. A.; DUPREZ, R.; AFONSO, P. FROMENT, A.; GESSAIN, A. Human T-cell lymphotropic virus type 3: complete nucleotide sequence and characterization of the human tax3 protein. **Journal of Virology**. vol 80, pg 9876–9888. 2006.

CANN, A.J.,; CHEN, I.S.Y. Human T-cell leukemia virus types I and II. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, et al, eds. Fields virology, vol. 59. Philadelphia: Raven Publishers, pg 1849-1980. 1996.

CARNEIRO-PROIETTI, A.B.F.; SABINO, E.F.; LEÃO, S.; SALLES, N.A.; LOUREIRO, P.; SAAR, M. et al. Human T-cell lymphotropic viruses Type 1 and Type 2 Seroprevalence, Incidence and Residual transfusion Risk Among Blood Donors in Brazil During 2007-2009. **AIDS Research Human Retroviruses**. vol 28, p. 1265-1272. 2012.

CHEN YM, CHEN SH, FU CY, CHEN JY, OSAME M. Antibody reactivities to tumor-suppressor protein p53 and HTLV-I Tof, Rex and Tax in HTLV-I-infected people with differing clinical status. **Int J Cancer**. Apr 10;71(2):196-202. doi: 10.1002/(sici)1097-0215(19970410)71:2<196::aid-ijc12>3.0.co;2-g. PMID: 9139842. 1997

CIMINALE, V.; PAVLAKIS, G.N.; DERSE, D.; CUNNINGHAM, C.P.; FELBER, B.K. Complex splicing in the Human T-cell leukemia virus (HTLV) family of retrovirus: novel mRNAs and proteins produced by HTLV type I. **Journal of Virology**. vol 66, n. 3, p. 1737-1745. 1992.

COELHO-DOS-REIS JG, MARTINS-FILHO OA, DE BRITO-MELO GE, GALLEGOS, CARNEIRO-PROIETTI AB, SOUZA JG; GIPH; Barbosa-Stancioli EF. Performance of IgG and IgG1 anti-HTLV-1 reactivity by an indirect immunofluorescence flow cytometric assay for the identification of persons infected with HTLV-1, asymptomatic carriers and patients with myelopathy. **J Virol Methods**. Sep;160(1-2):138-48. doi: 10.1016/j.jviromet.2009.05.007. Epub 2009 May 15. PMID: 19447144. 2009.

COELHO-DOS-REIS JG, PERUHYE-MAGALHÃES V, PASCOAL-XAVIER MA, DE SOUZA, GOMES M, DO AMARAL LR, CARDOSO LM, et al. Flow Cytometric-Based Protocols for Assessing Anti-MT-2 IgG1 Reactivity: High-Dimensional Data Handling to Define Predictors for Clinical Follow-Up of Human T-Cell Leukemia Virus Type-1 Infection. **J Immunol Methods**. 444:36–46. doi: 10.1016/j.jim.2017.02.006. 2017

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

CORNILESCU, C.C.; BOUAMR, F.; CARTER, C.; TJANDRA, N. Backbone 15N relaxation analysis of the N-terminal domain of the HTLV-I capsid protein and comparison with the capsid protein of HIV-1. **Protein Science**. vol 12, p. 973- 981, 2003.

CURRER, R.; DUYNEM R.V.; JAWORSKI, E.; GUENDEL, I.; SAMPEY, G.; DAS, R.; NARAYANAN, A.; KASHANCHI, F. HTLV Tax: a fascinating multifunctional coregulator of viral and cellular pathways. **Frontiers in Microbiology**. vol 12, n. 406, p. 1- 24. 2012.

DELAMARRE, L; ROSENBERG, A.R.; PIQUE, C.; PHAM, D.; CALLEBAUT, I. & DOKHÉLAR, M-C. The HTLV-1 envelope glycoproteins: structure and functions. *Journal Acquired Immune Deficiency Syndromes Humam*. **Retrovirology**, vol. 13 (suppl. 1), p. 85- 91.1996.

de SOUZA JG, FONSECA FG, MARTINS-FILHO OA, TEIXEIRA-CARVALHO A, MARTINS CP, CARVALHO LD, COELHO-DOS-REIS JG; GIPH; Barbosa-Stancioli EF. Diagnostic tool based on an HTLV-1-Tax expression system in eukaryotic cells using a poxvirus vector. **J Virol Methods**. Jun;166(1-2):65-71. doi: 10.1016/j.jviromet.2010.02.021. Epub 2010 Feb 26. PMID: 20219542. 2010

de SOUZA JG, DA FONSECA FG, MARTINS ML, MARTINS CP, DE CARVALHO LD, COELHO-DOS-REIS JG, CARNEIRO-PROIETTI AB, MARTINS-FILHO OA, BARBOSA-STANCIOLI EF; GIPH. Anti-Tax antibody levels in asymptomatic carriers, oligosymptomatic carriers, patients with rheumatologic disease or with HAM/TSP do not correlate with HTLV-1 proviral load. **J Clin Virol**. Jan;50(1):13-8. doi: 10.1016/j.jcv.2010.09.007. Epub 2010 Oct 15. PMID: 20951636. 2011

DIAS-BASTOS, M.R.; OLIVEIRA, C.D.L.; CARNEIRO-PROIETTI, A.B.F. Decline in prevalence and asymmetric distribution of human T cell lymphotropic virus 1 and 2 in blood donors, State of Minas Gerais, Brazil, 1993 to 2007. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. vol 43, n. 6, p. 615-619. 2010.

DINIZ, M.S.C.; FELDNER, P.C.; CASTRO, R.A.; SARTORI, M.G.F.; GIRÃO, M.J.B.C. Impacto f HTLV-1 in quality of life in urogynecologic parameters of women with urinary incontinence. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**. vol 147, p. 230-233. 2009.

DIXON L, MCNAMARA C, DHASMANA D, TAYLOR GP, DAVIES N. Imaging Spectrum of HTLV-1-Related Neurologic Disease: A Pooled Series and Review. **Neurol Clin Pract**. Jun;13(3):e200147. doi: 10.1212/CPJ.0000000000200147. Epub 2023 Mar 27. PMID: 37066106; PMCID: PMC10092304. 2023

ECDC. European Centre for Disease Prevention and Control. Geographical distribution of areas with a high prevalence of HTLV-1 infection. **ECDC**: Stockholm; nº177; 2015.

EDWARDS D, FENIZIA C, GOLD H, DE CASTRO-AMARANTE MF, BUCHMANN C, PISE-MASISON CA, FRANCHINI G. Orf-I and orf-II-encoded proteins in HTLV-1 infection and persistence. **Viruses**. Jun;3(6):861-85. doi: 10.3390/v3060861. Epub 2011 Jun 17. PMID: 21994758; PMCID: PMC3185781. 2011

EINSIEDEL LJ, PHAM H, WOODMAN RJ, PEPPERILL C, TAYLOR KA. The prevalence and clinical associations of HTLV-1 infection in a remote Indigenous community. **Med J Aust**. Oct 3;205(7):305-9. doi: 10.5694/mja16.00285. PMID: 27681971. 2016

ENOSE-AKAHATA Y, ABRAMS A, JOHNSON KR, MALONEY EM, JACOBSON S. Quantitative differences in HTLV-I antibody responses: classification and relative risk assessment for asymptomatic carriers and ATL and HAM/TSP patients from Jamaica. **Blood**. Mar 22;119(12):2829-36. doi: 10.1182/blood-2011-11-390807. Epub 2012 Feb 7. PMID: 22318200; PMCID: PMC3327461. 2012

ENSOLI B, FIORELLI V, ENSOLI F, CAFARO A, TITTI F, BUTTÒ S, MONINI P, MAGNANI M, CAPUTO A, GARACI E. Candidate HIV-1 Tat vaccine development: from basic science to clinical trials. **AIDS**. Nov 28;20(18):2245-61. doi: 10.1097/QAD.0b013e3280112cd1. PMID: 17117011. 2006

FEUER, G.; GREEN, P.L. Comparative biology of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2. **Oncogene**. vol 24, n. 39, p. 5996-6004. 2005.

FILIPPONE, C.; BETSEM, E.; TORTEVOYE, P.; CASSAR, O.; BASSOT, S.; FROMENT, A.; FONTANET, A.; GESSAIN, A. A severe bite from a nonhuman primate is a major risk factor for HTLV-1 infection in hunters from central Africa. **Clinical Infectious Diseases**. vol 60, pg 1667–1676. 2015.

FOGARTY, K.H.; ZHANG, W.; GRISGBY, I.F.; JOHNSON, J.L.; CHEN, Y.; MUELLER, J.D.; MANSKY, L.M. New insights into HTLV-1 particle structure, assembly, and gag-gag interactions in living cells. **Viruses**. vol 3, p. 770-793. 2011.

FOX, J. & WEISBERG, S. An {R} Companion to Applied Regression, Third Edition. Thousand Oaks. 2019

FRANCHINI, G. Molecular mechanisms of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I infection. **The journal of the American society of hematology**. vol. 86 (10), p. 3619-3639, Nov. 1995.

FRANCO, G.M. Novos derivados da amantadina: ensaios de atividade antiviral contra o HTLV-1. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, **Programa de Pós-Graduação em Microbiologia**, Belo Horizonte. 142f. 2015.

FRANCO, G.M.; ROCHA, A.S; COX, L.J.; DAIAN E SILVA, D.S.O.; DA SILVEIRA E SANTOS, D.M.; MARTINS, M.L.; ROMANELLI, L.C.; ISHAK, R.; VALLINOTO, A.C.R.; BOMFIM, M.R.Q.; CATERINO-DE-ARAUJO, A.; COELHO-DOS-REIS, J.G.A.; DA FONSECA, F.G.; BARBOSA-STANCIOLI, E.F.. Multi-Epitope Protein as a Tool of Serological Diagnostic Development for HTLV-1 and HTLV-2 Infections. **Front Public Health**. May 23;10:884701. doi: 10.3389/fpubh.2022.884701. PMID: 35677763; PMCID: PMC9168532. 2022

FUJII, M; MATSUOKA, M. Human T-cell leukemia virus types 1 and 2. In *Field's Virology*, 6th ed.; Wilkins, L.W.A., Ed.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, USA; Volume 2, pp. 1474-1501, 2013.

FURTADO, M.S.; ANDRADE, R.G.; ROMANELLI, L.C.; RIBEIRO, M.A.; RIBAS, J.G.; TORRES, E.B.; *et al.* Monitoring the HTLV-1 proviral load in the peripheral blood of asymptomatic carriers and patients with HTLV-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis from a Brazilian cohort:ROC curve analysis to establish the threshold for risk disease. **Journal Medical Virology**. vol 84, p. 664-671, 2012.

FURUKAWA, Y.; SAITO, M.; MATSUMOTO, W.; USUKU, K.; TANAKA, Y.; IZUMO, S.; OSAME, M. Different cytokine production in tax-expressing cells between patients with human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis and asymptomatic HTLV-I carriers. **Journal Infectious Diseases**. vol. 187, pg. 1116-1125. 2003.

GALLEGO S, FRUTOS MC, BLANCO S, CASTRO G, BALANGERO M, ELÍAS PANIGO D, MANGEAUD A, REMONDEGUI C, SANTOS ROCHA A, MELO FRANCO G, LOBATO MARTINS M, BARBOSA-STANCIOLI EF, NATES S. First Description of Seronegative HTLV-1 Carriers in Argentina. **Am J Trop Med Hyg**. Apr;102(4):889-895. doi: 10.4269/ajtmh.19-0647. PMID: 32043459; PMCID: PMC7124914. 2020

GALLO, R.C.; Research and discovery of the first human cancer virus, HTLV-1. **Best Practice & Research Clinical Hematology**. vol 24, p. 559-565. 2011.

GARCIA TP, MARDER K. Statistical Approaches to Longitudinal Data Analysis in Neurodegenerative Diseases: Huntington's Disease as a Model. **Curr Neurol Neurosci Rep**. 2017 Feb; p.17-14. 2017

GATZA, M.L.; DAYARAM, T.; MARRIOTT, S.J. Ubiquitination of HTLV-I Tax in Response to DNA Damage Regulates Nuclear Complex Formation and Nuclear Export. **Retrovirology**. vol 4. 2007.

GATZA, M.L.; MARRIOTT, S.J. Genotoxic stress and cellular stress alter the subcellular distribution of human T-cell leukemia virus type 1 tax through a CRM1-dependent mechanism. **Journal of Virology**. vol 80, pg 6657-6668. 2006.

GESSAIN, A.; CASSAR, O. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. **Frontiers in Microbiology**. vol 3, nº 388. 2012.

GESSAIN, A.; GOUT, O. Chronic myelopathy associated with human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I). **Ann Intern Med**. Dec 1;117(11):933-46. doi: 10.7326/0003-4819-117-11-933. PMID: 1443956. 1992

GIAM, C.; SEMMES, O. J. HTLV-1 Infection and Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma - A Tale of Two Proteins: Tax and HBZ. **Viruses**. vol 8. 2016.

GITLIN, S.D.; BOSSELUT, R.; GÉGONNE, A.; GHYSDAEL, J.; BRADY, J.N. Sequence-specific interaction of the Ets1 protein with the long terminal repeat of the human T-lymphotropic virus type I. **Journal of Virology**. vol 65.1991.

GOFF, S. *Retroviridae: The Retroviruses and Their Replication*. In *Fields Virology*. 5 ed. Philadelphia: Raven Publishers, v.1, p. 2000-2069. 2007.

GOFF, S. *Retroviridae*. In *Fields Virology*. 6 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, v.1, p. 1425-1473. 2013.

GONCALVES, D.U.; PROIETTI, F.A.; BARBOSA-STANCIOLI, E.F.; MARTINS, M.L.; RIBAS, J.G.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; PERUHYPE-MAGALHÃES, V.; CARNEIRO-PROIETTI, A.B. HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) inflammatory network. **Inflammation & Allergy Drug Targets**. vol 7, pg 98-107. 2008.

GONÇALVES, D.U.; PROIETTI, F.A.; RIBAS, J.G.R.; ARAÚJO, N.G.; PINHEIRO, S.R.; GUEDES, A.C.; CARNEIRO-PROIETTI, A.B.F. Epidemiology, treatment, and prevention of Human T-cell Leukemia Virus Type 1-associated diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 3, p. 577-589. 2010.

GOON, P. K.; BIANCARDI, A.; FAST, N.; IGAKURA, T.; HANON, E.; MOSLEY, A. J.; ASQUITH, B.; GOULD, K. G.; MARSHALL, S.; TAYLOR, G. P.; BANGHAM, C. R. Human T cell lymphotropic virus (HTLV) type-1-specific CD8 T cells: frequency and immunodominance hierarchy. **Journal Infectious Diseases**. vol 189,pg 2294–2298. 2004.

GRANT, C.; BARMAK, K.; ALEFANTIS, T.; YAO, J.; JACOBSON, S.; AND W, B. Human T cell leukemia virus type I and neurologic diseases: events in bone marrow, peripheral blood, and central nervous system during normal immune surveillance and neuroinflammation. **Journal of cellular physiology**. vol 190, p. 133-159, 2002.

GRETEN, T. F.; SLANSKY, J. E.; KUBOTA, R.; SOLDAN, S. S.; JAFFEE, E. M.; LEIST, T. P.; PARDOLL, D. M.; JACOBSON, S.; SCHNECK, J. P. Direct visualization of antigen-specific T cells: HTLV-1 Tax11–19- specific CD8(+) T cells are activated in peripheral blood and accumulate in cerebrospinal fluid from HAM/TSP patients. **Proceedings of the National Academy of Science**. vol 95, pg 7568–7573. 1998.

HANON E, HALL S, TAYLOR GP, SAITO M, DAVIS R, TANAKA Y, USUKU K, OSAME M, WEBER JN, BANGHAM CR. Abundant tax protein expression in CD4+ T cells infected with human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) is prevented by cytotoxic T lymphocytes. **Blood**. Feb 15;95(4):1386-92. PMID: 10666215. 2000

HARDING D, ROSADAS C, TSOTI SM, HESLEGRAVE A, STEWART M, KELLEHER P, ZETTERBERG H, TAYLOR GP, DHASMANA D. Refining the risk of HTLV-1-associated myelopathy in people living with HTLV-1: identification of a HAM-like phenotype in a proportion of asymptomatic carriers. **J Neurovirol**. Dec;28(4-6):473-482. doi: 10.1007/s13365-022-01088-x. Epub 2022 Jul 30. PMID: 35908019; PMCID: PMC9797460. 2022

HATTORI, T.; UCHIYAMA, T.; TOIBANA, T.; TAKATSUKI, K.; UCHINO, H. Surface Phenotype Japanese Adult T-Cell Leukemia Cells Characterized by Monoclonal Antibodies. **Blood**, vol. 58, n. 3, p. 645- 647, 1981.

HAZIOT, M.E.; GASCON, M.R.; ASSONE, T.; FONSECA, L.A.; LUIZ, O.D.; SMID, J. et al. Detection of clinical and neurological signs in apparently asymptomatic HTLV-1

infected carriers: Association with high proviral load. **PLoS Negl Trop Dis.**13(5):e0006967. 2019

HIGUCHI, M.; FUJII, M. Distinct functions of HTLV-1 Tax1 from HTLV-2 tax2 contribute key roles to viral pathogenesis. **Retrovirology.** vol 6. 2009.

HISADA, M.; MALONEY, E.M.; SAWADA, T.; MILEY, W.J.; PALMER, P.; HANCHARD, B.; GOEDERT, J.J.; MANNS, A. Virus markers associated with vertical transmission of human T lymphotropic virus type 1 in Jamaica. **Clinical Infectious Disiases.** vol 34, pg 1551-1557. 2002.

HOSMER J. R. D. W.; LEMESHOW, S.; STURDIVANT, R. X. Applied Logistic Regression. 3. ed. Hoboken, John Wiley & Sons, Inc., 2013.

ICTV. Virus Taxonomy: 2020 Release. Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>>. Acesso 02 de janeiro de 2024.

IGAKURA, T.; STINCHCOMBE, J.C.; GOON, P.K.; TAYLOR, G.P.; WEBER, J.N.; GRIFFITHS, G.M.; TANAKA, Y.; OSAME, M.; BANGHAM, C.R. Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. **Science.** vol 299, pg 1713–1716. 2003.

IWANAGA M. Epidemiology of HTLV-1 Infection and ATL in Japan: An Update. **Front Microbiol.** May 29;11:1124. doi: 10.3389/fmicb.2020.01124. PMID: 32547527; PMCID: PMC7273189. 2020

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**, v. 13, n. 1, p. 100-106. 1996.

JACOBSON, S. Immunopathogenesis of human T cell lymphotropic virus type I-associated neurologic disease. **The Journal of Infection Diseases.** vol. 186, pg 187-192. 2002.

JAIN, P.; MOSTOLLER, K.; FLAIG, K.E.; AHUJA, J.; LEPOUTRE, V.; ALEFANTIS, T.; KHAN, Z.K.; WIGDAHL, B. Identification of Human T Cell Leukemia Virus Type 1 Tax Amino Acid Signals and Cellular Factors Involved in Secretion of the Viral Oncoprotein. **Journal of Biology and Chemistry.** vol 282, 34581–34593. 2007.

JASSAL, S.R.; POHLER, R.G.; BRIGHTY, D.W. Human T-cell leukemia virus type 1 receptor expression among syncytium-resistant cell lines revealed by a novel surface glycoprotein-immuno-adhesion. **Journal of Virology**, 8371-8328, 2001.

JIN, D.Y.; JEANG, K.T. HTLV-I Tax Self-Association in Optimal Trans-Activation Function. **Nucleic Acids Research.** vol 25, pg 379–387. 1997.

JONES, K.S.; PETROW-SADOWSKI, C.; BERTOLETTE, D.C.; HUANG, Y.; RUSCETTI, F.W. Heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of

Human T-cell leukemia virus type 1 virions into CD4+ T cells. **Journal of Virology**. vol 79, n. 20, p. 12692-12702. 2005.

KALYANARAMAN, V.S.; SARNGADHARAN, M.G., ROBERT-GUROFF, M.; MIYOSHI, I.; GOLDE, D.; GALLO, R.C. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. **Science**. vol 218, p. 517-523. 1982

KANNAGI. M.; HASEGAWA, A.; NAGANO, Y.; IINO, T.; OKAMURA, J.; SUEHIRO, Y. Maintenance of long remission in adult T-cell leukemia by Tax-targeted vaccine: A hope for disease-preventive therapy. **Cancer Sci**. Mar;110(3):849-857. doi: 10.1111/cas.13948. Epub 2019 Feb 19. PMID: 30666755; PMCID: PMC6398881. 2019.

KANNAGI M, HARADA S, MARUYAMA I, INOKO H, IGARASHI H, KUWASHIMA G, SATO S, MORITA M, KIDOKORO M, SUGIMOTO M, et al. Predominant recognition of human T cell leukemia virus type I (HTLV-I) pX gene products by human CD8+ cytotoxic T cells directed against HTLV-I-infected cells. **Int Immunol**. Aug;3(8):761-7. doi: 10.1093/intimm/3.8.761. PMID: 1911545. 1991

KAPLAN, J.E.; KHABBAZ, R.F.; MURPHY, E.L.; HERMANSEN, S.; ROBERTS, C.; LAL, R.; HENEINE, W.; WRIGHT, D.; MATIJAS, L.; THOMSON, R.; RUDOLPH, D.; SWITZER, W.M.; KLEINMAN, S.; BUSCH, M.; SCHREIBER, G.B. Male-to-Female Transmission of Human T-Cell Lymphotropic Virus Types I and II: Association with Viral Load. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology**, vol. 12, n. 2, pg 193-201. 1996.

KASHIWAGI, S.; KAJIYAMA, W.; HAYASHI, J. et al. Antibody to p40-tax protein of human T cell leukemia virus I and infectivity. **J. Infect. Dis**. Vol. 161. p. 426-429. 1990

KONDO, R.; HIGUCHI, M.; TAKAHASHI, M.; OIE, M.; TANAKA, Y.; GEJYO, F. Human T-cell leukemia virus type 2 Tax protein induces interleukin 2-independent growth in a T-cell line. **Retrovirology**. vol 3, pg 88. 2006.

KUBOTA, R.; NAGAI, M.; KAWANISHI, T.; OSAME, M.; JACOBSON, S. Increased HTLV type 1 tax specific CD8+ cells in HTLV type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: correlation with HTLV type 1 proviral load. **AIDS Research Human Retroviruses**. vol 16, pg 1705–1709. 2002.

KULKARNI A, MATEUS M, THINNES CC, MCCULLAGH JS, SCHOFIELD CJ, TAYLOR GP, BANGHAM CRM. Glucose Metabolism and Oxygen Availability Govern Reactivation of the Latent Human Retrovirus HTLV-1. **Cell Chem Biol**. Nov 16;24(11):1377-1387.e3. doi: 10.1016/j.chembiol.2017.08.016. Epub 2017 Sep 28. PMID: 28965728; PMCID: PMC5696563. 2017

KUSUHARA, K.; UEDA, K.; TOKUGAWA, K.; MIYAZAKI, C.; OKADA, K.; SAWADA, T. Long-term sequential changes of antibody to p40tax in HTLV-I carrier mothers and children. **Acta Paediatrica Japonica**. vol, 37, p.651-653. 1995

LAIRMORE, M.D.; FRANCHINI, G. Human T-cell leukemia virus types 1 and 2. In *Fields Virology*. 5 ed. Philadelphia: Raven Publishers, p. 2072-2105. 2007.

LAIRMORE, M.D.; ANUPAM, R.; BOWDEN, N.; HAINES, R.; HAYNES II, R.A.H.; RATNER, L.; GREEN, P.L. Molecular determinants of Human T-Lymphotropic Virus Type 1 transmission and spread. **Viruses**. v 3, p. 1131-1165. 2011.

LAL, R.B., GIAM, C.Z., COLIGAN, J.E., RUDOLPH, D.L. Differential immune responsiveness to the immunodominant epitopes of regulatory proteins (tax and rex) in human T cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy. **Journal of Infect Diseases**. vol 169, 496–503.1994

LAMBERT, S.; BOUTTIER, M.; VASSY, R.; SEIGNEURET, M.; PETROWSADOWSKI, C.; JANVIER, S.; HEVEKER, N.; RUSCETTI, F.W.; PERRET, G.; JONES, K.S.; PIQUE, C. HTLV-1 uses HSPG neuropilin-1 for entry by molecular mimicry of VEGF 165. **Blood**. vol 113, n. 21, p. 5176-5185. 2009.

LAMSOUL, I.; LODEWICK, J.; LEBRUN, S.; BRASSEUR, R.; BURNY, A.; GAYNOR, R.B.; BEX, F. Exclusive Ubiquitination and Sumoylation on Overlapping Lysine Residues Mediate NF-KappaB Activation by the Human T-Cell Leukemia Virus Tax Oncoprotein. **Molecular and Cellular Biology**. vol 25, pg 10391–10406. 2005.

LEBRETON, M.; SWITZER, W.M.; DJOKO, C.F.; GILLIS, A.; JIA, H.; STURGEON, M.M.; SHANKAR, A.; ZHENG, H.; NKEUNEN, G.; TAMOUFE, U.; NANA, A.; LE DOUX DIFFO, J.; TAFON, B.; KIYANG, J.; SCHNEIDER, B.S.; BURKE, D.S.; WOLFE, N.D. A gorilla reservoir for human T-lymphotropic virus type 4. **Emerg Microbes Infect**. Jan;3(1):e7. doi: 10.1038/emi.2014.7. 2014

LEE, T.H.; COLIGAN, J.E.; HOMMA, T.; McLANE, M.F.; TACHIBANA, N.; ESSEX, M. Human T-cell leukemia virus-associated membrane antigens identity of the major antigens recognized after virus infection. **Medical Sciences**. vol 81, p. 3856-3860. 1984.

LEE, S.M.; MORCOS, Y.; JANG, H.; STUART, J.M.; LEVIN, M.C. HTLV-1 induced molecular mimicry in neurological disease. **Current Topics in Microbiology and Immunology**. vol 296, pg125–36. 2006.

LEPOUTRE, V.; JAIN, P.; QUANN, K.; WIGDAHL, B.; KHAN, Z.K. Role of resident CNS cell populations in HTLV-1-associated neuroinflammatory disease. *Frontiers Bioscience*. vol 14, pg 1152–1168. 2009.

LEVIN, M.C.; KRICHAVSKY, M.; FOX, R.J.; LEHKY, T.; JACOBSON, S.; FOX, C.; KLEGHORN, F.; WHITE, J.; YOUNG, N.; EDWARDS, R.J.; JACK, N.E.;

- BARTHOLOMEW, C. Extensive latent retroviral infection in bone marrow of patients with HTLV-I-associated neurologic disease. **Blood**. Jan 1;89(1):346-8. PMID: 8978312. 1997
- LEVIN, M. C.; LEE, S. M.; KALUME, F.; MORCOS, Y.; DOHAN, F. C. Jr.; HASTY, K. A. Autoimmunity due to molecular mimicry as a cause of neurological disease. **Nature Medicine**. vol 8, pg 509–513. 2002.
- LEWIS, M. J.; SHEEHY, N.; SALEMI, M.; VANDAMME, A. M.; HALL, W. W. Comparison of CREB and NF-kappaB-mediated transactivation by human T lymphotropic virus type II (HTLV-II) and type I (HTLV-I) tax proteins. **Virology**. vol 295, pg 182–189. 2002.
- LIÉGEOIS, F.; LAFAY, B.; SWITZER, W.M.; LOCATELLI, S.; MPOUDI-NGOLÉ, E.; LOUL, S.; HENEINE, W.; DELAPORTE, E.; PEETERS, M. Identification and molecular characterization of new STLV-1 and STLV-3 strains in wild-caught nonhuman primates in Cameroon. **Virology**. Feb 20;371(2):405-17. doi: 10.1016/j.virol.2007.09.037. 2008
- LIMA, M.A.; BICA, R.B.; ARAÚJO, A.Q. Gender influence on the progression of HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**. 2005 Feb;76(2):294-6. doi: 10.1136/jnnp.2004.035709. 2005
- LODEWICK, J.; LAMSOUL, I.; BEX, F. Move or Die: the Fate of the Tax Oncoprotein of HTLV-1. **Viruses**. vol 3,pg 829-857. 2011.
- LYDY, S. L.; CONNER, M. E.; MARRIOTT, S. J. Relationship between Anti-Tax responses and cocultivable virus in HTLV-I-infected rabbits. **Virology**. vol. 250, pg 60-66. 1998.
- MA, G.; YASUNAGA, J.; MATSUOKA, M. Multifaceted functions and roles of HBZ in HTLV-1 pathogenesis. **Retrovirology**. p.13-16. 2016
- MAHGOUB, M.; YASUNAGA, J.; IWAMI, S.; MATSUOKA, M. Sporadic on/off switching of HTLV-1 Tax expression is crucial to maintain the whole population of virus-induced leukemic cells. **PNAS**. January 22. 115 (6) E1269-E1278. 2018
- MAHEIUX, R.; GESSAIN, A. HTLV-3/STLV-3 and HTLV-4 viruses: discovery, epidemiology, serology and molecular aspects. **Viruses**. vol 3, p.1047-1090. 2011.
- MARIN, H.M.; CASTELLANOS PENTÓN, P.; MÁRQUEZ BOCALANDRO, Y.; POZO PEÑA, L.; DÍAZ NAVARRO, J., et al.. Chimeric synthetic peptides from the envelope (gp46) and the transmembrane (gp21) glycoproteins for the detection of antibodies to human T-cell leukemia virus type II. **Biochem Biophys Res Commun**. 289:7–12. 10.1006/bbrc.2001.5917. 2001
- MARTIN F, TAYLOR GP, JACOBSON S. Inflammatory manifestations of HTLV-1 and their therapeutic options. **Expert Rev Clin Immunol**. 10(11):1531-1546. 2014

MARTIN, J.L.; MALDONADO, J.O.; MUELLER, J.D.; ZHANG, W.; MANSKY, L.M. Molecular Studies of HTLV-1 Replication: An Update. **Viruses**. vol 8, p. 3390. 2016

MARTINS, M.L.; ANDRADE, R.G.; NÉDIR, B.H.; BARBOSA-STANCIOLI, E.F. Human T-Lymphotropic Viruses (HTLV). **Blood Transfusion in Clinical Practice**, p.175, 2012.

MARTINS, M. L.; GUIMARÃES, J. C.; RIBAS, J. G.; ROMANELLI, L. C. F.; CARNEIRO-PROIETT, A. B. F. Long-term follow-up of HTLV-1 proviral load in asymptomatic carriers and in incident cases of HAM/TSP: what is its relevance as a prognostic marker for neurologic disease? **Journal of Neurovirology**. v 23, pg 125-133. 2016.

MARTINS, M.L.; GUIMARÃES, J.C.; RIBAS, J.G.; ROMANELLI, L.C.; CARNEIRO-PROIETTI, A.B. Long-term follow-up of HTLV-1 proviral load in asymptomatic carriers and in incident cases of HAM/TSP: what is its relevance as a prognostic marker for neurologic disease? **J Neurovirol**. 2017 Feb;23(1):125-133. doi: 10.1007/s13365-016-0484-x. Epub 2016 Sep 27. PMID: 27678093.

MARTINS, M.L.; BARBOSA-STANCIOLI, E.F.; DA SILVA-MALTA, M.C.F., NUNES, S.M.. The importance of confirmatory assays in testing blood donors for human T-cell lymphotropic virus. **Vox Sang**. Jan 15. doi: 10.1111/vox.13577. Epub ahead of print. PMID: 38223953. 2024

MATSUOKA M, YASUNAGA J. Human T-cell leukemia virus type 1: replication, proliferation and propagation by Tax and HTLV-1 bZIP factor. **Curr Opin Virol**. Dec;3(6):684-91. doi: 10.1016/j.coviro.2013.08.010. Epub 2013 Sep 21. PMID: 24060211. 2013

MATSUURA E, NOZUMA S, TASHIRO Y, KUBOTA R, IZUMO S, TAKASHIMA H. HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP): A comparative study to identify factors that influence disease progression. **J Neurol Sci**. Dec 15;371:112-116. doi: 10.1016/j.jns.2016.10.030. Epub 2016 Oct 21. PMID: 27871430. 2016

MATSUZAKI, T.; NAKAGAWA, M.; NAGAI, M.; USUKU, K.; HIGUCHI, I.; ARIMURA, K.; KUBOTA, H.; IZUMO, S.; AKIBA, S. & OSAME, M. HTLV-1 proviral load correlates with progression of motor disability in HAM/TSP: Analysis of 239 HAM/TSP patients including 64 patients followed up for 10 years. **Journal of Neurovirology**. vol. 7, pg 228-234. 2001.

MEDINA, F.; QUINTREMIL, S.; ALBERTI, C.; BARRIGA, A.; CARTIER, L.; PUENTE, J.; RAMIREZ, E.; FERREIRA, A.; TANAKA, Y.; VALENZUELA, M.A. Tax posttranslational modifications and interaction with calreticulin in MT-2 cells and human peripheral blood mononuclear cells of human T cell lymphotropic virus type-i-associated myelopathy/ tropical spastic paraparesis patients. **AIDS Research Human Retroviruses**. vol 30, pg 370–379. 2014.

MEDINA F, QUINTREMIL S, ALBERTI C, GODOY F, PANDO ME, BUSTAMANTE A, BARRIGA A, CARTIER L, PUENTE J, TANAKA Y, VALENZUELA MA, RAMÍREZ E. Tax secretion from peripheral blood mononuclear cells and Tax detection in plasma of patients with human T-lymphotropic virus-type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis and asymptomatic carriers. **Journal of Medical Virology**. Mar;88(3):521-31. doi: 10.1002/jmv.24342. Epub 2015 Oct 19. PMID: 26241614. 2016.

MELAMED, A., LAYDON, D.J., AL KHATIB, H. *et al.* HTLV-1 drives vigorous clonal expansion of infected CD8<sup>+</sup> T cells in natural infection. **Retrovirology** 12, 91. 2015

MIRHOSSEINI, S., LATIFI, A., HOSSEINI, H., REZVAN SEIDMORADI, R., AGHAMOLLAEI, H., FARNOOSH, G. The Efficient Solubilization and Refolding of Recombinant Organophosphorus Hydrolyses Inclusion Bodies Produced in Escherichia coli. **J Appl Biotechnol Rep**. Mar;6(1):20-25. 2019

MILAGRES, A.C.; JORGE, M.L.; MARCHIORI, P.E.; SEGURADO, A.A. Human T cell lymphotropic virus type 1-associated myelopathy in Sao Paulo, Brazil. Epidemiologic and clinical features of a university hospital cohort. **Neuroepidemiology**. vol 21, p.153-158. 2002.

NAGAI, M.; USUKU, K.; MATSUMOTO, W.; KODAMA, D.; TAKENOUCI, N.; MORITOYO, T.; HASHIGUCHI, S.; ICHINOSE, M.; BANGHAM, C. R.; IZUMO, S.; OSAME, M. Analysis of HTLV-I proviral load in 202 HAM/TSP patients and 243 asymptomatic HTLV-I carriers: high proviral load strongly predisposes to HAM/TSP. **Journal of Neurovirology**, vol. 4 (6), pg. 586-593, 1998.

NAKAMURA, S.; NAGANO, I.; YOSHIOKA, M. *et al.* Detection of tumor necrosis factor- $\alpha$ -positive cells in CSF of patients with HTLV-1 associated myelopathy. **Journal of Neuroimmunology**. vol 42, p. 223- 226. 1993

NAGASATO K, NAKAMURA T, SHIRABE S, SHIBAYAMA K, OHISHI K, ICHINOSE K, TSUJIHATA M, NAGATAKI S. Presence of serum anti-human T- lymphotropic virus type I (HTLV-I) IgM antibodies means persistent active replication of HTLV-I in HTLV-I-associated myelopathy. **Journal of Neurological Science**. 103(2):203-8, 1991.

NAM, S.H.; COPELAND, T.D.; HATANAKA, M.; OROSZLAN, S. Characterization of ribosomal frameshifting for expression of pol gene products of Human T-cell leukemia virus type I. **Journal of Virology**. vol 61, n. 1, p. 196-203. 1993.

NAM, S.H.; KIDOKORO, M.; SHIDA, H.; HATANAKA, M. Processing of gag Precursor Polyprotein of Human T-Cell Leukemia Virus Type I by Virus-Encoded Protease. **Journal of Virology**. vol 62, n. 10, p. 3718- 3728, Oct. 1988.

NICOLI F, CHACHAGE M, CLOWES P, BAUER A, KOWOUR D, ENSOLI B, CAFARO A, MABOKO L, HOELSCHER M, GAVIOLI R, SAATHOFF E,

GELDMACHER C. Association between different anti-Tat antibody isotypes and HIV disease progression: data from an African cohort. *BMC Infect Dis*. Jul 22;16:344. doi: 10.1186/s12879-016-1647-3. PMID: 27450538; PMCID: PMC4957276. 2016

NIINUMA, A.; HIGUCHI, M.; TAKAHASHI, M.; OIE, M.; TANAKA, Y.; GEJYO, F. Aberrant activation of the interleukin-2 autocrine loop through the nuclear factor of activated T cells by nonleukemogenic human T-cell leukemia virus type 2 but not by leukemogenic type 1 virus. *Journal of Virology*. vol 79, pg11925–11934. 2005.

NITTA, T.; TANAKA, M.; SUN, B.; HANAI, S. AND MIWA, M. The genetic background as a determinat of human T-cell leukemia virus type 1 proviral load. *Science*. vol. 309, pg 161- 165, 2003.

NOBRE, V.; GUEDES, A.C.; MARTINS, M.L.; BARBOSA-STANCIOLI, E.F.; SERUFO, J.C.; PROIETTI, F.A.; RIBAS, J.G.; FERREIRA, C.E.; LAMBERTUCCI, J.R.; GIPH Interdisciplinary Group on HTLV-1/2 Research. Dermatological findings in 3 generations of a family with a high prevalence of human T cell lymphotropic virus type 1 infection in Brazil. *Clin Infect Dis*. Nov 15;43(10):1257-63. doi: 10.1086/508177. Epub 2006 Oct 16. PMID: 17051489. 2006

NOBRE, V.; GUEDES, A.C.; PROIETTI, F.A.; MARTINS, M.L.; NASSIF, G.; SERUFO, J.C.; LAMBERTUCCI, J.R.; GIPH (HTLV-1/2Research Interdisciplinary Group). Increased prevalence of human T cell lymphotropic virus type 1 in patients attending a Brazilian dermatology clinic. *Intervirolgy*. 50(4):316-8. doi: 10.1159/000105445. Epub 2007 Jul 9. PMID: 17622792. 2007

OHTSUKI, Y.; AKAGI, T.; TAKAHASHI, K.; MIYOSHI, I. Ultrastructural study on type C virus particles in a human cord T-cell line established by co-cultivation with adult T-cell leukemia cells. *Archives of Virology*. vol 63, p. 69-73. 1982.

OKAYAMA, A.; KORBER, B.; CHEN, Y. M. A.; LEE T. H.; SHIOIRI, S.; TACHIBANA, N.; TSUDA, K.; MUELLER, N.; MCLANE, M. F.; MAAYAN, S.; ORGAD, S.; ERNST, J.; MARLINK, R.; AND ESSEX, M. Unusual pattern of antibodies to human T-cell leukemia virus type-I in family members of adult T-cell leukemia patients. *Blood*. vol. 78 (12), p. 3323- 3329. 1991.

OLIVEIRA, P. D.; FARRÉ, L.; BITTENCOURT, A. L. Adult T-cell leukemia/lymphoma. *Revista da Associação Médica Brasileira*. vol 62. 2016.

OSAME, M. Pathological mechanisms of Human T-cell lymphotropic virus type I associated myelopathy (HAM/TSP). *Journal of Neurovirology*. vol 8, p. 359- 364. 2002.

OSAME, M.; USUKU, K.; IZUMO, S.; IJICHI, N.; IGATA, A. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet*, vol 1, pg 1031-1032, 1986.

OVERBAUGH, J., A. D. MILLER, AND M. V. EIDEN. Receptors and entry cofactors for retroviruses include single and multiple transmembrane-spanning proteins as well as newly described glycoposphatidylinositol-anchored and secreted proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. vol. 65, p. 371–389, 2001

PAHO. Pan American Health Organization. Desenvolvido por Regional Office for the Americas of the World Health Organization, 2021. International health policy forum for the elimination of HTLV. Disponível em: <<https://www.paho.org/en/international-health-policy-forum-elimination-htlv>>. Acesso em 02 jan. 2024.

PAIS-CORREIA, A.M.; SACHSE, M.; GUADAGNINI, S.; ROBBIATI, V.; LASSERRE, R.; GESSAIN, A.; GOUT, O.; ALCOVER, A.; THOULOZE, M.I. Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses. **Nature Medicine**. vol 16, pg 83–89. 2010.

PAIVA LP, COELHO-DOS-REIS JGA, TRINDADE BC, PERUHYPE-MAGALHÃES V, SILVA ARAÚJO MS, GONÇALVES JJ, NOGUEIRA AC, PEREIRA MARTINS J, LOPES RIBEIRO Á, STARLING AL, ALCÂNTARA LCJ, RIBEIRO MA, CARNEIRO-PROIETTI ABDF, SABINO EC, ALVES BICALHO K, TEIXEIRA-CARVALHO A AND MARTINS-FILHO AO. A New Flow Cytometry-Based Single Platform for Universal and Differential Serodiagnosis of HTLV-1/2 Infection. **Front. Immunol.** 13:795815. doi: 10.3389/fimmu.2022.795815. 2022.

PEREIRA-SANTOS, T.A.; ROCHA, A.S.; LOPES-RIBEIRO, Á.; CORRÊA-DIAS, L.C.; MELO-OLIVEIRA, P.; REIS, E.V.D.S.; DA FONSECA, F.G.; BARBOSA-STANCIOLI, E.F.; TSUJI, M.; COELHO-DOS-REIS, J.G.A. Diversity of HLA-A2-Restricted and Immunodominant Epitope Repertoire of Human T-Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1) Tax Protein: Novel Insights among N-Terminal, Central and C-Terminal Regions. **Biomolecules**, 13, 545. 2023

PIQUE, C.; JONES, K.S. Pathways of cell-cell transmission of HTLV-1. **Frontiers in Microbiology**. vol 3, n. 378, pg 1-14. 2012.

POIESZ, B.L.; RUSCETTI, F.W.; GAZDAR, A.F.; BUNN, P.A.; MINNA, J.D.; GALLO, R.C. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. **Medical Sciences**, v. 77, n. 12, p. 7415-7419. 1980.

PRINCLER, G.L.; JULIAS, J.G.; HUGHES, S.H.; DERSE, D. Roles of viral and cellular proteins in the expression of alternatively spliced HTLV-1 pX mRNAs. **Virology**. vol 317, p. 136-145. 2003.

PROIETTI, A.B.F.C. *et al.* *Cadernos Hemominas*. Belo Horizonte: Fundação Hemominas. vol XVI, 6. ed. 480 p. 2015.

QUAGLIARELLO; V. J.; MA, A.; STUKENBROK, H.; PALADE, G. E. Ultrastructural localization of albumin transport across the cerebral microvasculature during

experimental meningitis in the rat. **Journal of Experimental Medicine**. vol 174. 1991.

RACINE R, MCLAUGHLIN M, JONES DD, WITTMER ST, MACNAMARA KC, WOODLAND DL, et al. IgM production by bone marrow plasmablasts contributes to long-term protection against intracellular bacterial infection. **J Immunol**. 186:1011–21. 10.4049/jimmunol.1002836. 2011

RAMILO, O.; SAEZ-LLORENS, X.; MERTSOLA, J. et al. Tumor necrosis factor alpha/cachectin and interleukin 1 beta initiate meningeal inflammation. **Journal Experimental Medicine**. vol 172, p. 497–507. 1990.

RAMIREZ E, FERNANDEZ J, CARTIER L, VILLOTA C, RIOS M. Defective human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) provirus in seronegative tropical spastic paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy (TSP/HAM) patients. **Virus Res**. Feb;91(2):231-9. doi: 10.1016/s0168-1702(02)00276-9. PMID: 12573502. 2003

RAMOS, J.M.; DE MENDOZA, C.; SORIANO, V. Spanish HTLV Network. HTLV-1 infection and health outcomes. **Lancet Infect Dis**., 20(4):407-408. DOI: 10.1016/S1473-3099(20)30133-X. 2020

RICHARDSON MW, MIRCHANDANI J, DUONG J, GRIMALDO S, KOCIEDA V, HENDEL H, KHALILI K, ZAGURY JF, RAPPAPORT J. Antibodies to Tat and Vpr in the GRIV cohort: differential association with maintenance of long-term non-progression status in HIV-1 infection. **Biomed Pharmacother**. Jan;57(1):4-14. doi: 10.1016/s0753-3322(02)00327-x. PMID: 12642031. 2003

RODGERS-JOHNSON, P.; GAJDUSEK, D.C.; MORGAN, O.S.; ZANINAVIC, V.; SARIN, P.S.; GRAHAM, D.S. HTLV-I and HTLV-III antibodies and tropical spastic paraparesis. **Lancet**. vol 2, pg 1246-1249, 1985.

RODRIGUEZ SK, SARR AD, OLORUNNIPA O, POPPER SJ, GUEYE-NDIAYE A, TRAORÉ I, DIA MC, MBOUP S, KANKI PJ. The absence of anti-Tat antibodies is associated with risk of disease progression in HIV-2 infection. **J Infect Dis**. Sep 15;194(6):760-3. doi: 10.1086/507042. Epub 2006 Aug 17. PMID: 16941341. 2006

ROMANELLI, L.C.F.; CAMELLI, P.; MARTINS, M.L.; GONÇALVES, D.U.; PROIETTI, F.A.; RIBAS, J.G.R.; ARAÚJO, M.G.; CARNEIRO-PROIETTI, A.B.F. Incidence of Human T Cell Lymphotropic Virus Type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in a long-term prospective cohort study of initially asymptomatic individuals in Brazil. **Aids Research and Human Retroviruses**. vol 29, p. 1-4. 2013a.

ROMANELLI, M.G.; DIANI, E.; BERGAMO, E.; CASOLI, C.; CIMINALE, V.; BEX, F.; BERTAZZONI, U. Highlights on distinctive structural and functional properties of HTLV Tax proteins. **Frontiers in Microbiology**. vol 4. 2013b.

ROSADAS C., VICENTE A. C., ZANELLA L., CABRAL-CASTRO M. J., PERALTA J. M., PUCCIONI-SOHLER M. Human T-lymphotropic virus type 2 subtype b in a

patient with chronic neurological disorder. **Journal of Neurovirology**. 20, 636–639. doi: 10.1007/s13365-014-0280-4. 2014

ROSADAS C., PUCCIONI-SOHLER M., OLIVEIRA A.C.P., CASSEB J., SOUSA M., TAYLOR G.P. Adult T-cell leukaemia/lymphoma in Brazil: a rare disease or rarely diagnosed? **Br J Haematol** [Internet]; 188(4):e46-9. 2020.

ROSADAS C., CATERINO-DE-ARAUJO A., TAYLOR G.P. Specificity of HTLV screening tests and its impact in health care programs costs: the perspective of antenatal screening in Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**. 54:e0853–2020 10.1590/0037-8682-0853-2020. 2021

ROSS, T. M.; MINELLA, A. C.; FANG, Z. Y.; PETTIFORD, S. M.; GREEN, P. L. Mutational analysis of human T-cell leukemia virus type 2 Tax. **Journal of Virology**. vol 71, pg 8912–8917. 1997

RUDOLPH, D. L.; COLIGAN, J. E.; LAL, R. B. Detection of antibodies to trans-activator protein (p40tax1) of human T-cell lymphotropic virus type I by a synthetic peptide-based assay. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, vol. 1 (2), pg 176-181. 1994.

SABOURI, A.H.; USUKU, K.; OSAME, M. Impaired function of Human Tlymphotropic vírus type 1 (HTLV-1)- specific CD8+ T cells in HTLV-associated neurological disease. **Blood**. vol 22. 2008

SALEMI, M.; DESMYTER, J.; VANDAMME, A.M. Tempo and Mode of Human and Simian T-Lymphotropic Virus (HTLV/STLV) Evolution Revealed by Analyses of Full-Genome Sequences. **Molecular Biology Evolution**. vol 17, p. 374–386. 2000.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. & Cold Spring Harbor Laboratory. *Molecular Cloning – A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 3v. 1989.

SATOU Y, YASUNAGA J, YOSHIDA M, MATSUOKA M. HTLV-I basic leucine zipper factor gene mRNA supports proliferation of adult T cell leukemia cells. **Proc Natl Acad Sci USA**. Jan 17;103(3):720-5. doi: 10.1073/pnas.0507631103. Epub 2006 Jan 9. Erratum in: Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Jun 6;103(23):8906. PMID: 16407133; PMCID: PMC1334651. 2006

SCHIERHOUT, G.; MCGREGOR, S.; GESSAIN, A. et al. Association between HTLV-1 infection and adverse health outcomes: a systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. **Lancet Infect Dis**., 20(1):133-143. DOI: 10.1016/S1473-3099(19)30402-5. 2020

SCHNEIDER, J.; YAMAMOTO, N.; HINUMA, Y.; HUNSMANN, G. Precursor Polypeptides of Adult T-Cell Leukemia Virus: Detection with Antisera against Isolated

Polypeptides gp68, p24 and p19. **Journal of General Virology**, vol.65, p. 2249-2258, 1984.

SEIKI, M.; HATTORI, S.; HIRAYAMA, Y.; YOSHIDA, M. Human adult T-cell leukemia virus: Complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. **National Academy Sciences**, vol. 80, p. 3618-3622, 1983.

SHIMOTHONO, K.; TAKAHASHI, Y.; SHIMIZU, N.; GOJOBORI, T.; GOLDE, DW.; CHEN, ISY, MIWA, M. & SUGIMURA, T. Complete nucleotide sequence of an infections clone of human T-cell leukemia virus type II: an open reading frame for the protease gene. **National Academy Sciences**. United States of America, vol. 82, p. 3101- 3105, 1985.

SHINZATO O, KAMIHIRA S, IKEDA S, KONDO H, KANDA T, NAGATA Y, NAKAYAMA E, SHIKU H. Relationship between the anti-HTLV-1 antibody level, the number of abnormal lymphocytes and the viral-genome dose in HTLV-1-infected individuals. **Int J Cancer**. May 8;54(2):208-12. doi: 10.1002/ijc.2910540208. PMID: 8098012. 1993

SILVA, S.M.; OLIVEIRA, M.B.; MARTINEZ, E.Z. Distribution of serological screening markers at a large hematology and hemotherapy center in Minas Gerais, Southeastern Brazil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. Jul-Sep;38(3):206-13. doi: 10.1016/j.bjhh.2016.05.005. Epub 2016 Jun 11. PMID: 27521858; PMCID: PMC4997899. 2016

SODROSKI, J.; PATARCA, R.; PERKINS, D.; BRIGGS, D. Sequence of Envelope Glycoprotein Gene of Type II Human Lymphotropic Virus. **Science**, Boston, vol.225, p.421- 423, 1984.

STARLING, A. L. B. Perfil de citocinas plasmáticas e dosagem da carga proviral em indivíduos infectados pelo HTLV-1: estudo comparativo entre portadores assintomáticos e pacientes com HAM/TSP. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, **Programa de Pós-Graduação em Infectologia e Medicina Tropical**. Belo Horizonte. 75f. 2010.

SWITZER, W. M.; SALEMI, M.; QARI, S. H.; JIA, H.; GRAY, R. R.; KATZOURAKIS, A. Ancient, independent evolution and distinct molecular features of the novel human T-lymphotropic virus type 4. **Retrovirology**. vol 6. 2009.

TAKENOUCHI, N. *et al.* Usefulness of proviral load measurement for monitoring of disease activity in individual patients with human T-lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical paraparesis. **Journal of Neurovirology**. pg 929-935. 2003.

TANAJURA D, CASTRO N, OLIVEIRA P, NETO A, MUNIZ A, CARVALHO NB, ORGE G, SANTOS S, GLESBY MJ, CARVALHO EM. Neurological Manifestations in Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1)-Infected Individuals Without

HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis: A Longitudinal Cohort Study. **Clin Infect Dis**. Jul 1;61(1):49-56. doi: 10.1093/cid/civ229. Epub 2015 Mar 27. PMID: 25820277; PMCID: PMC4542911. 2015

TARASEVICH, A.; FILATOV, A.; PICHUGIN, A.; MAZUROV, D. Monoclonal antibody profiling of cell surface proteins associated with the viral biofilms on HTLV-1 transformed cells. **Acta Virologica**. vol 59, pg 247–256. 2015.

TAYLOR, G.P.; MATSUOKA, M. Natural history of adult T-cell leukemia/lymphoma and approaches to therapy. **Oncogene**. vol 24, p. 6047- 6057. 2005.

TAYLOR, G.P. Pathogenesis and treatment of HTLV-I associated myelopathy. **Sexually Transmitted Infections**, v.74, p. 316-322, 1998.

TAYLOR, C.T.; COLGAN, S.P. Regulation of immunity and inflammation by hypoxia in immunological niches. **Nat Rev Immunol**. Dec;17(12):774-785. doi: 10.1038/nri.2017.103. Epub 2017 Oct 3. PMID: 28972206; PMCID: PMC5799081. 2017

TIE, F.; ADYA, N.; GREENE, W.C.; GIAM, C.Z. Interaction of the human T-lymphotropic virus type 1 Tax dimer with CREB and the viral 21-base-pair repeat. **Journal of Virology**. vol 70, pg 8368-8374. 1996

THEBAULT, S.; BASBOUS, J.; HIVIN, P.; DEVAUX, C.; MESNARD, J.M. HBZ interacts with JunD and stimulates its transcriptional activity. **FEBS Letters**. vol 562, pg 165–170. 2004.

TOMARAS GD, YATES NL, LIU P, QIN L, FOU DA GG, CHAVEZ LL, et al. Initial B-cell responses to transmitted human immunodeficiency virus type 1: virion-binding immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies followed by plasma anti-gp41 antibodies with ineffective control of initial viremia. **J Virol**. 82:12449–63. 10.1128/JVI.01708-08. 2008

TRENTIN, B.; REBEYROTTE, N.; MAMOUN, R.Z. Human T-cell leukemia virus type 1 reverse transcriptase (RT) originates from the *pro* and *pol* open reading frames and requires the presence of RT-RNase H (RH) and RT-RH-Integrase proteins for its activity. **Journal of Virology**. vol 78, n. 8, p. 6504-6510. 1998.

TSUJI, T.; SHEEHY, N.; GAUTIER, V.W.; HAYAKAWA, H.; SAWA, H.; HALL, W.W. The Nuclear Import of the Human T Lymphotropic Virus Type I (HTLV-1) Tax Protein Is Carrier- and EnergyIndependent. **Journal of Biology and Chemistry**. vol 282, 13875–13883. 2007.

UCHIYAMA T. Human T cell leukemia virus type I (HTLV-I) and human diseases. **Annual Review of Immunology**. vol 15, pg 15-37.1997

VAN-PROOYEN, N.; GOLD, H.; ANDERSEN, V.; SCHWARTZ, O.; JONES, K.; RUSCETTI, F.; LOCKETT, S.; GUDLA, P.; VENZON, D.; FRANCHINI, G. Human

Tcell leukemia virus type 1 p8 protein increases cellular conduits and virus transmission. **PNAS**, v. 107, n. 48, p. 20738-20743. 2010.

VERDONCK, K.; GONZÁLES, S.V.; VANDAMME, A.M.; VANHAM, G.; GOTUZZO, E. Human T-lymphotropic virus 1: recente knowledge about na ancient infection. **The Lancet Infectious Diseases**. vol 7, n. 4, p. 266-281. 2007.

WATANABE, T. Current status of HTLV-1 infection. **International Journal of Hematology**. vol 94, n. 5, p. 430-434. 2011.

WATANABE, T. Adult T-cell leukemia (ATL): Molecular basis for clonal expansion and transformation of HTLV-1-infected T cells. **Blood**. vol 9. 2017.

WICKHAM, H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York, 2016

WOLFE, N.D.; HENEINE, W.; CARR, J.K.; GARCIA, A.D.; SHANMUGAM, V.; TAMOUFE, U.; TORIMIRO, J.N.; PROSSER, A.T.; LEBRETON, M.; MPOUDINGOLE, E.; MCCUTCHAN, F.E.; BIRX, D.L.; FOLKS, T.M.; BURKE, D.S.; SWITZER, W. Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. **National Academy Sciences**. vol. 102 (22), p. 7994-7999, 2005.

YAMADA, A.; YASUNAGA, J.I.; LIANG, L.; ZHANG, W.; SUNAGAWA, J.; NAKAOKA, S.; IWAMI, S.; KOGURE, Y.; ITO, Y.; KATAOKA, K.; NAKAGAWA, M.; IWANAGA, M.; UTSUNOMIYA, A.; KOH, K.R.; WATANABE, T.; NOSAKA, K.; MATSUOKA, M. Anti-HTLV-1 immunity combined with proviral load as predictive biomarkers for adult T-cell leukemia-lymphoma. **Cancer Sci**. Jan;115(1):310-320. doi: 10.1111/cas.15997. Epub 2023 Nov 10. PMID: 37950425; PMCID: PMC10823268. 2024

YANG L.; KOTOMURA, N.; HO, Y.K.; ZHI, H.; BIXLER, S.; SCHELL, M.J. et al. Complex cell cycle abnormalities caused by human T-lymphotropic virus type 1 Tax. **Journal of Virology**. vol 85. 2011.

YAKOVA, M.; LEZIN, A.; DANTIN, F.; LAGATHU, G.; OLINDO, S.; JEAN-BAPTISTE, G.; ARFI, S.; AND CESAIRE, R. Increased proviral load in HTLV-I-infected patients with rheumatoid arthritis or connective tissue disease. **Retrovirology**. vol. 2, pg 4. 2005.

YOKOTA T, CHO MJ, TACHIBANA N, MCLANE MF, TAKATSUKI K, LEE TH, MUELLER N, ESSEX M. The prevalence of antibody to p42 of HTLV-I among ATLL patients in comparison with healthy carriers in Japan. **Int J Cancer**. Jun 15;43(6):970-4. doi: 10.1002/ijc.2910430603. PMID: 2786510. 1989

YOSHIBA, M.; OSAME, M.; KAWAI, H.; TOITA, M.; KUWASAKI, N.; NISHIDA, Y.; HIRAKI, Y.; TAKAHASHI, K.; NOMURA, K.; SONODA, S., et al. Increase replication of HTLV-I in HTLV-I-associated myelopathy. *Annual Neurology*. vol. 26 (3), pg. 331-335, 1989.

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

YOUNIS, I.; GREEN, P.L. The human T-cell leukemia virus Rex protein. **Frontier Bioscience**. vol 10, p. 431-445. 2005.

ZAGURY JF, SILL A, BLATTNER W, LACHGAR A, LE BUANEC H, RICHARDSON M, RAPPAPORT J, HENDEL H, BIZZINI B, GRINGERI A, CARCAGNO M, CRISCUOLO M, BURNY A, GALLO RC, ZAGURY D. Antibodies to the HIV-1 Tat protein correlated with nonprogression to AIDS: a rationale for the use of Tat toxoid as an HIV-1 vaccine. **J Hum Virol**. 1998 May-Jun;1(4):282-92. PMID: 10195253.

ZHAO G, LONDON E. An amino acid "transmembrane tendency" scale that approaches the theoretical limit to accuracy for prediction of transmembrane helices: relationship to biological hydrophobicity. **Protein Sci**. 2006 Aug;15(8):1987-2001. doi: 10.1110/ps.062286306. PMID: 16877712; PMCID: PMC2242586.

ZUCKER-FRANKLIN D, PANCAKE BA, BROWN WH. Prevalence of HTLV-I Tax in a subset of patients with rheumatoid arthritis. **Clin Exp Rheumatol**. Mar-Apr;20(2):161-9. PMID: 12051394. 2002

## 9. ANEXOS

## Aprovação em Comitê de Ética da Fundação HEMOMINAS

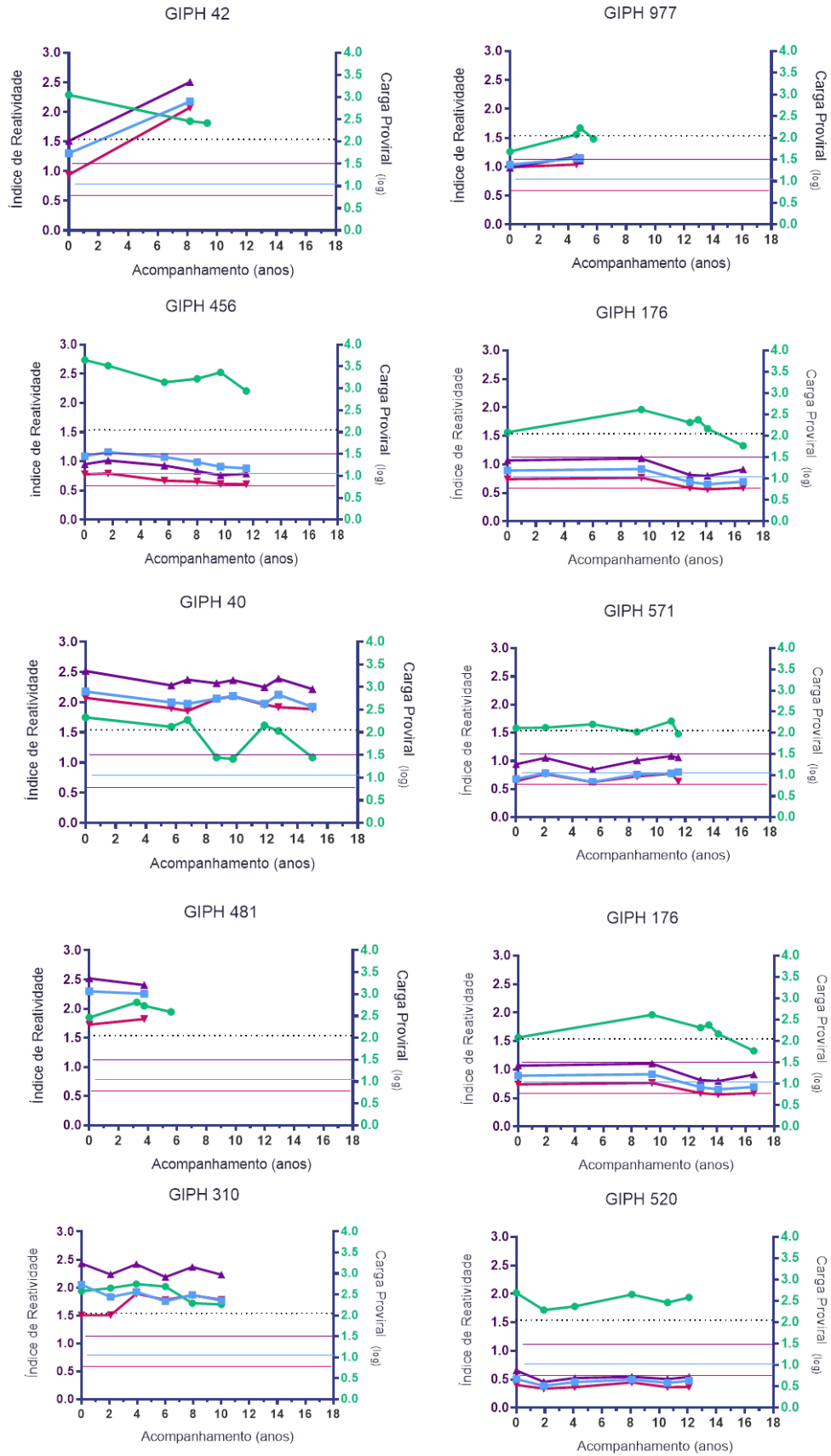


MINISTÉRIO DA SAÚDE  
Conselho Nacional de Saúde  
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP  
Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hemominas

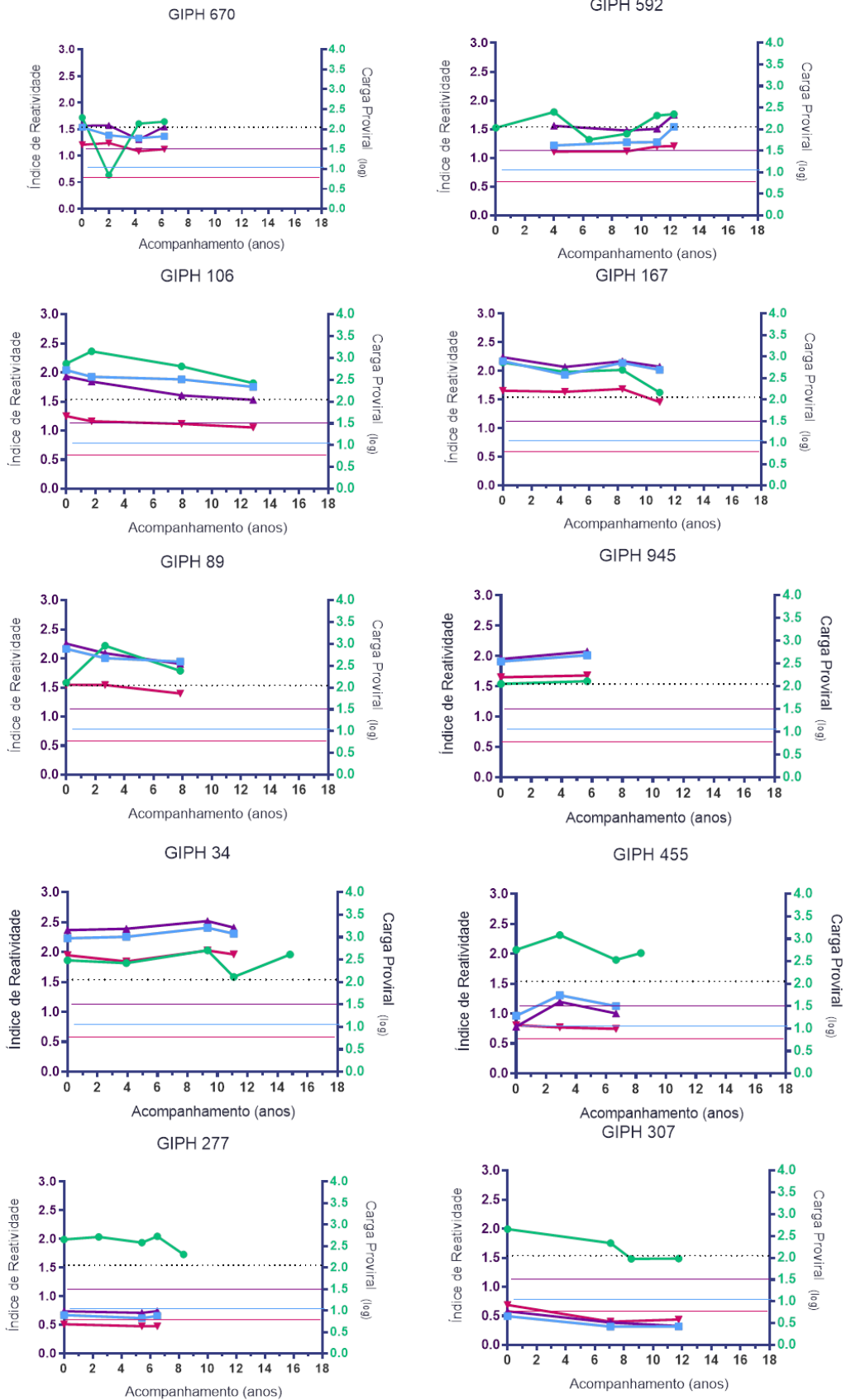
## PARECER CONSUBSTANCIADO

1. Título do Projeto de Pesquisa: <b>Aspectos Clínicos e Epidemiológicos da Infecção pelo HTLV I/III em doadores de Sangue da Fundação Hemominas</b>	
<b>SUJEITOS DA PESQUISA</b>	
2. Número de sujeitos : <b>Indeterminado por se tratar de coorte aberta</b>	3. Grupos Especiais: <18 anos ( ) Portador de deficiência mental ( ) Embrião/feto ( ) Relação de dependência (estudantes, militares, presidiários...) ( ) Outros ( ) Não se aplica ( x )
<b>PESQUISADOR RESPONSÁVEL</b>	
4. Nome: <b>Anna Bárbara de Freitas Carneiro Proietti</b>	
5. Instituição a que pertence: <b>Hemocentro Belo Horizonte (Fundação Hemominas)</b>	
<b>INSTITUIÇÃO (S) ONDE SERÁ REALIZADO</b>	
6. Nome: <b>Fundação Hemominas</b>	
7. Unidade/Órgão: <b>Serviço de Pesquisa</b>	
8. Participação Estrangeira: ( ) Sim ( x ) Não	
9. Projeto Multicêntrico: Sim ( ) Não ( x ) Nacional ( ) Internacional ( )	
<b>PATROCINADOR</b> Não se aplica ( x )	
10. Nome:	
<b>COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP</b>	
11. Data de Entrada: <b>29/02/1997</b>	12. Registro no CEP: <b>003</b>
15. Objetivos: <b>Estabelecer prevalência de alterações clínico-laboratoriais que possam estar relacionadas com o HTLV-I/III e verificar aspectos epidemiológicos entre o grupo com sorologia positiva e outros dois grupos: o de sorologia indeterminada e de sorologia negativa</b>	
17. Comentário dos Relatores: <b>O projeto foi analisado por este comitê em 29/10/1997 tendo por base a portaria 196/96 do Ministério da Saúde.</b>	
18. Parecer: <b>Por estar adequado às Normas da Resolução 196/96, a pesquisa está aprovada.</b>	
19. Conclusão: <b>Aprovado ( x )</b> Pendência ( ) Não Aprovado ( ) Data: <b>29/10/1997</b> Data: ____/____/____ Data: ____/____/____	
20. Encaminho a CONEP: Os dados acima para registro ( ) O projeto para apreciação ( ) Data: ____/____/____	21. Coordenador  Comitê de Ética em Pesquisa FUNDAÇÃO HEMOMINAS Assinatura

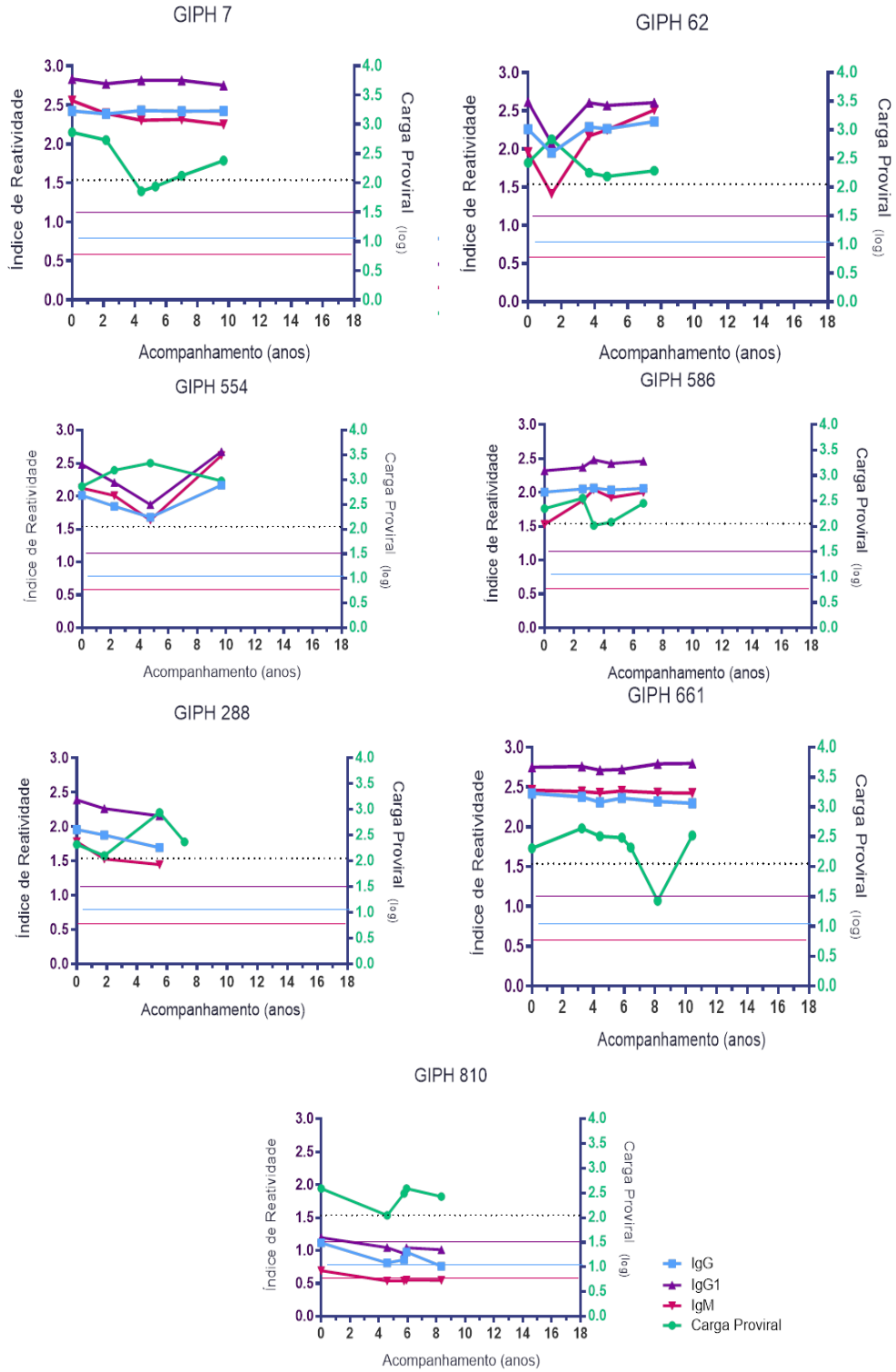
### Gráficos individuais – Assintomáticos - Mulheres com Carga Proviral Alta



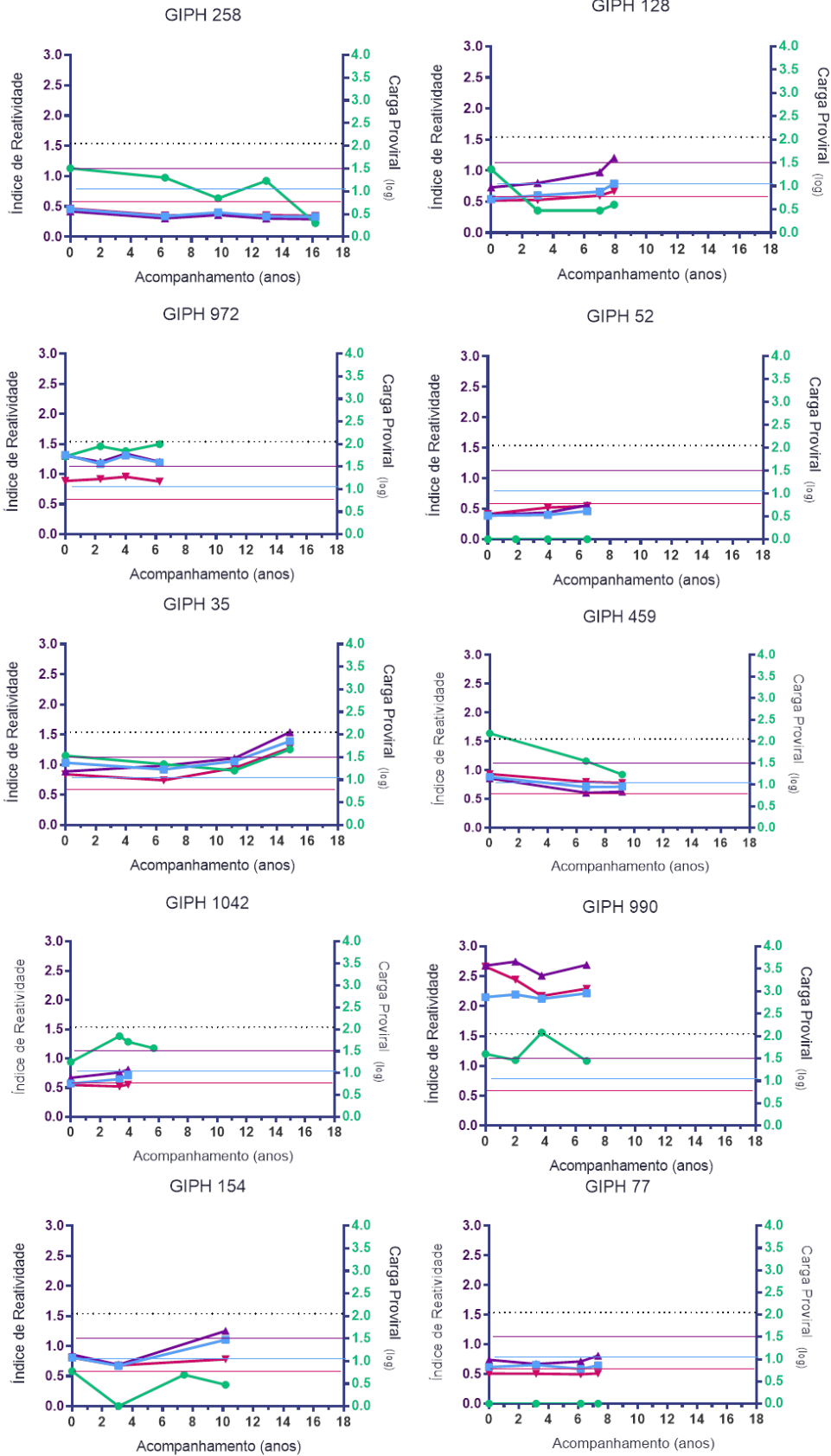
Gráficos individuais – Assintomáticos - Mulheres com Carga Proviral Alta



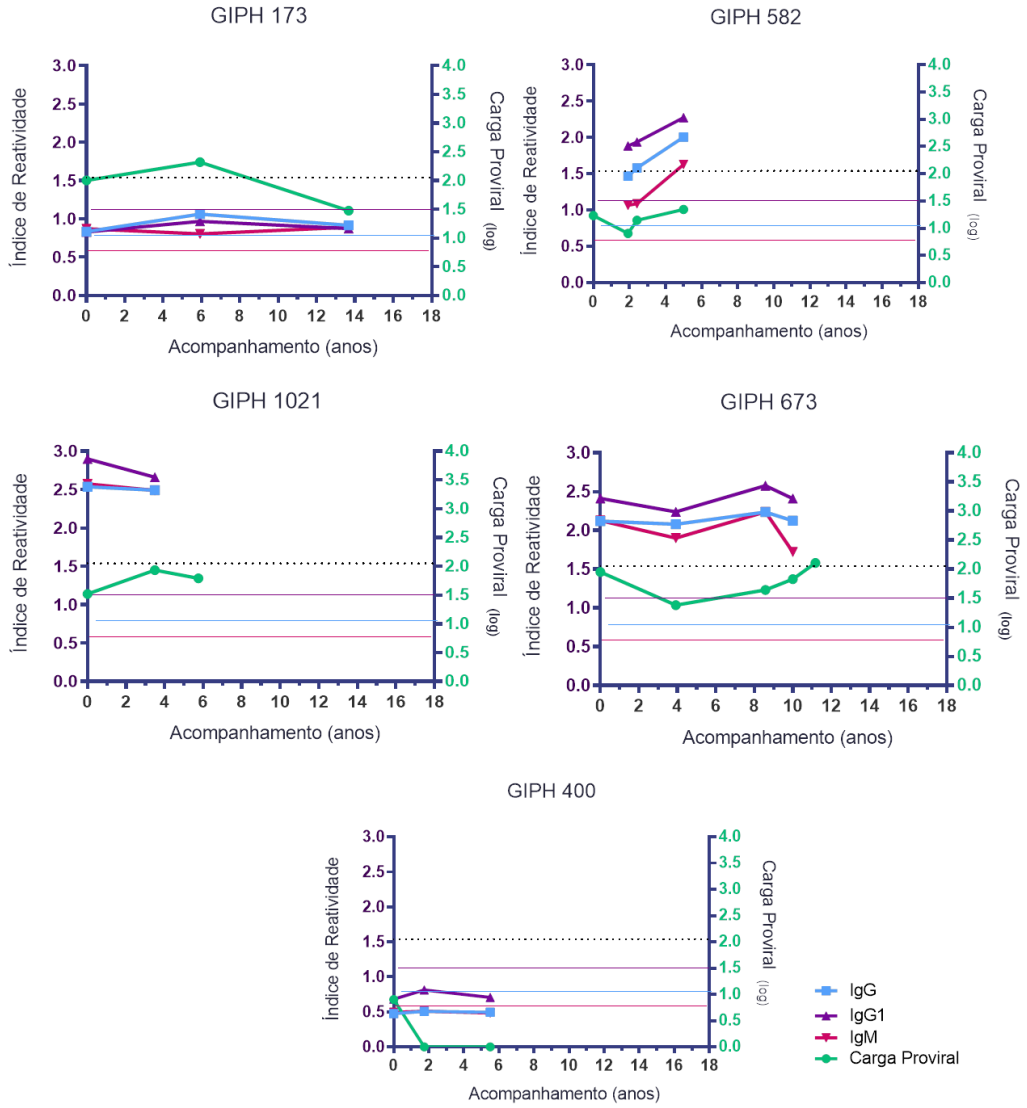
Gráficos individuais – Assintomáticos - Mulheres com Carga Proviral Alta



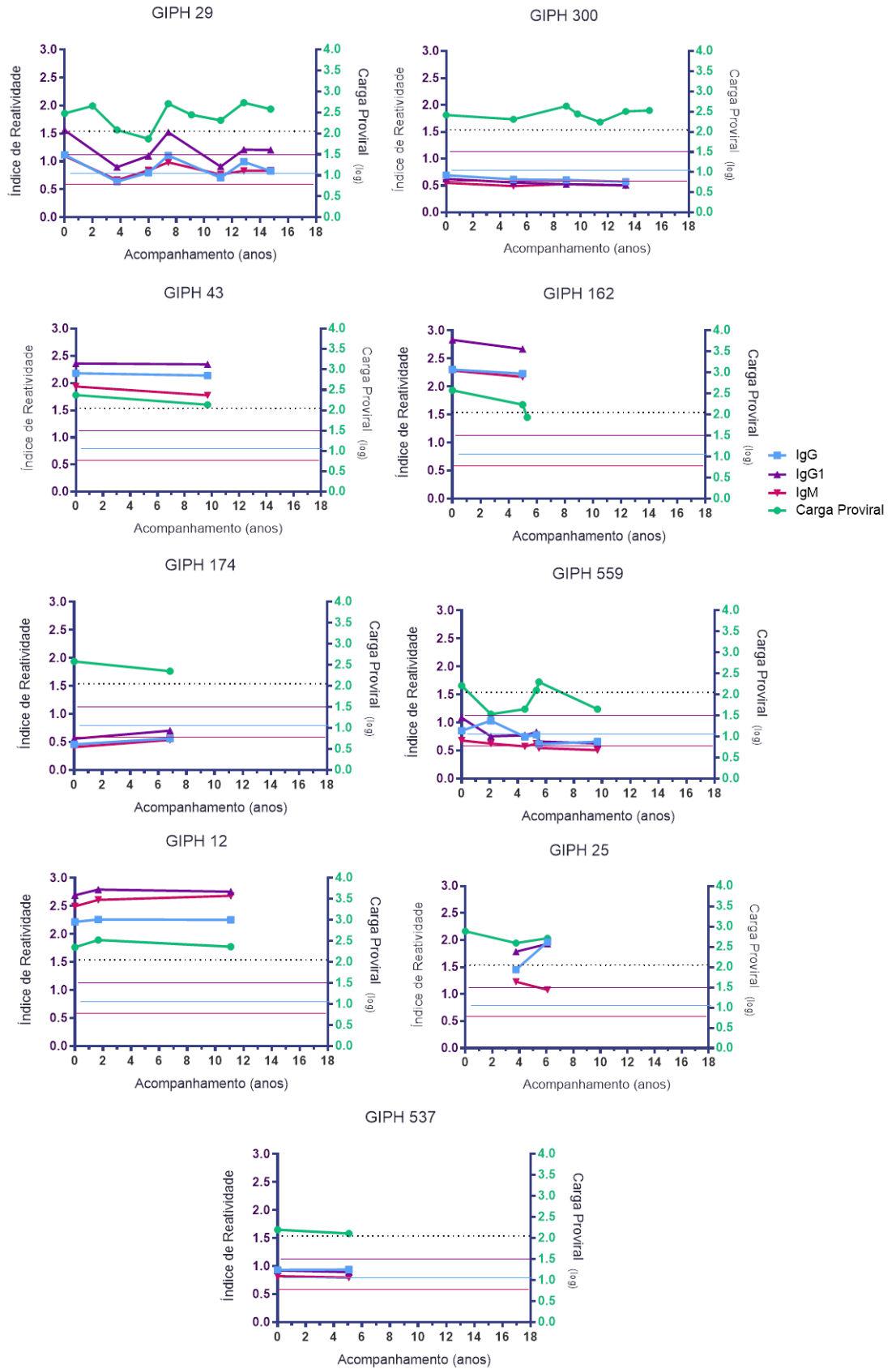
Gráficos individuais – Assintomáticos - Mulheres com Carga Proviral Baixa



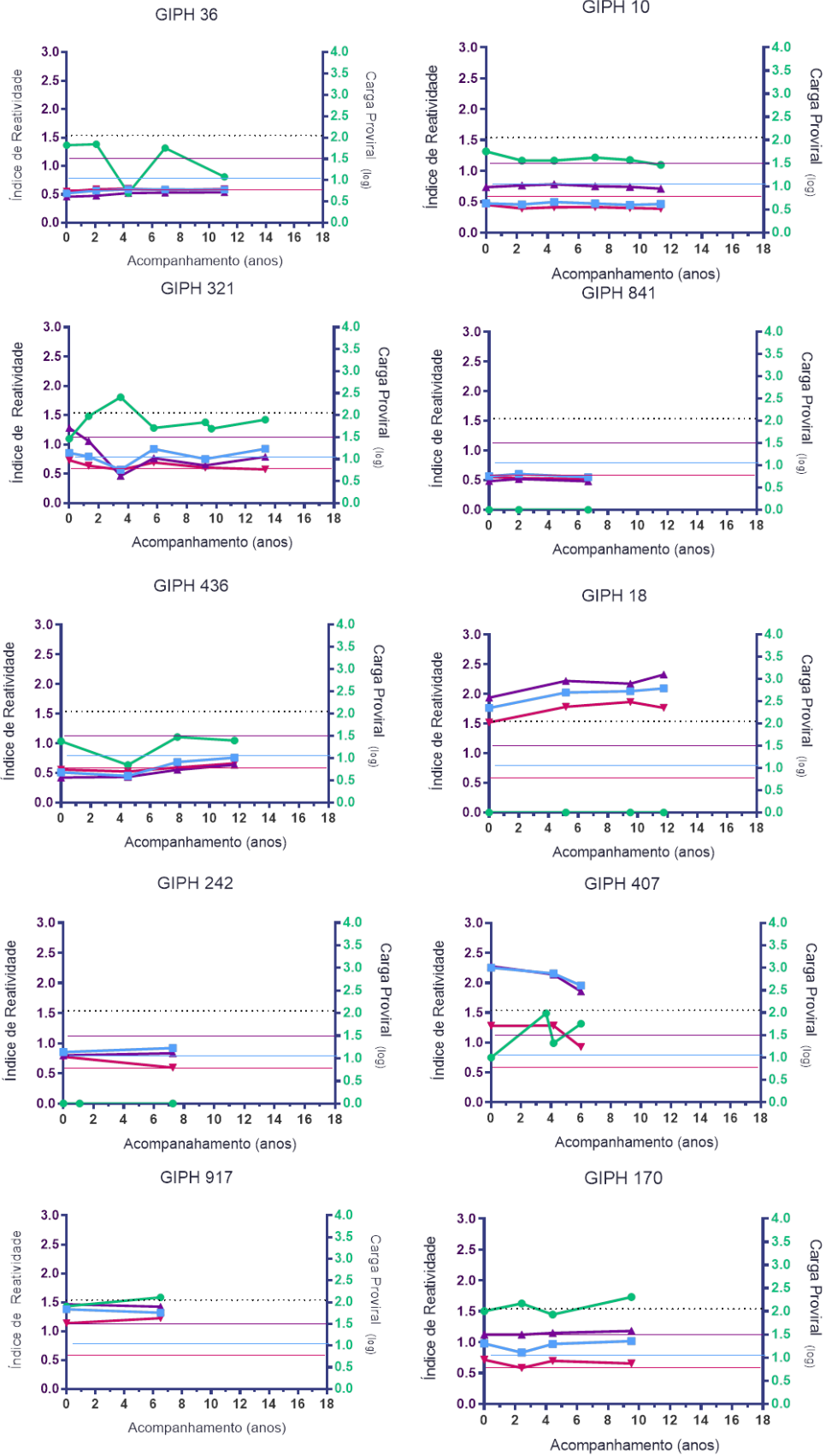
Gráficos individuais – Assintomáticos - Mulheres com Carga Proviral Baixa



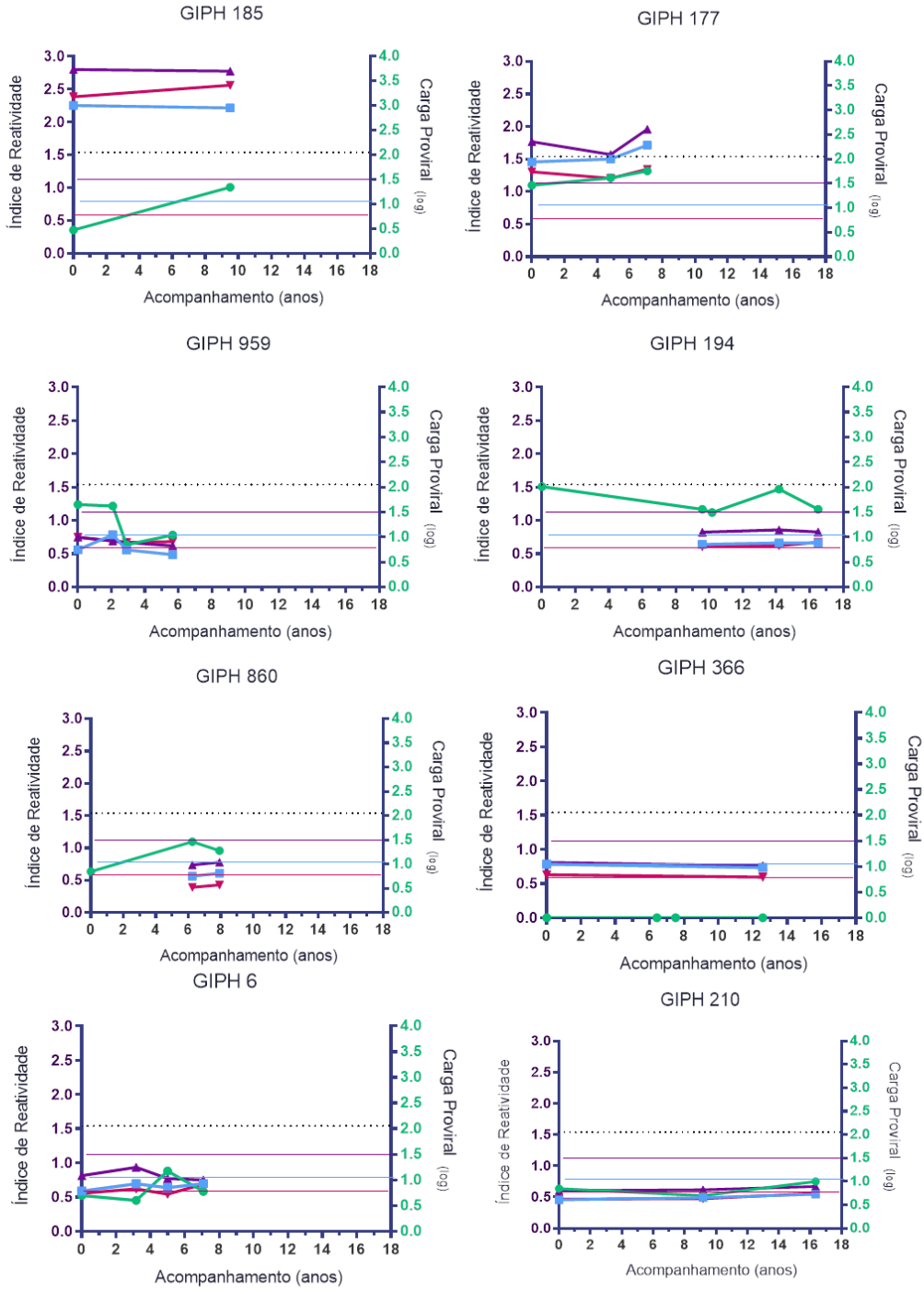
Gráficos individuais – Assintomáticos - Homens com Carga Proviral Alta



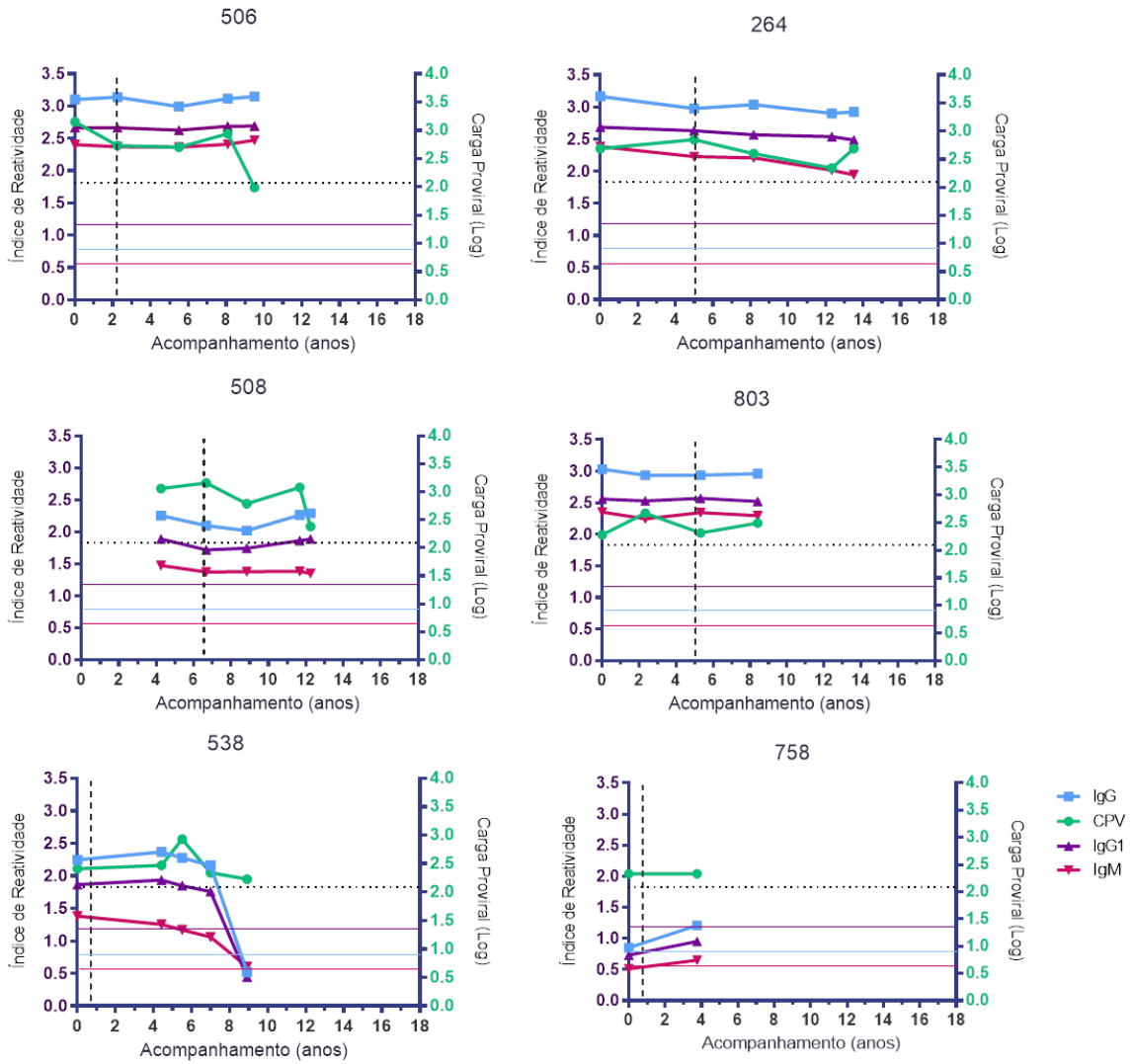
Gráficos individuais – Assintomáticos - Homens com Carga Proviral Baixa



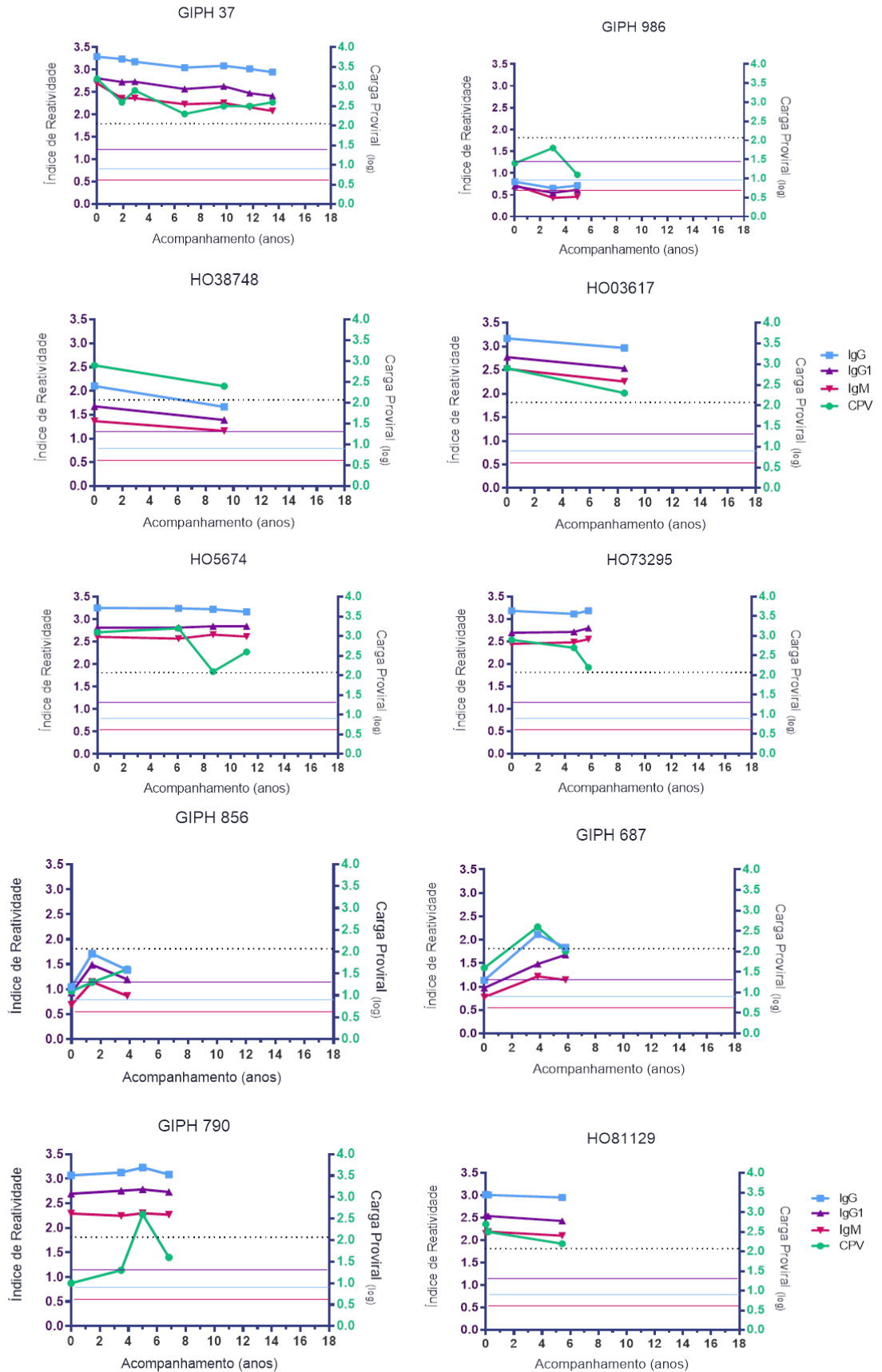
Gráficos individuais – Assintomáticos - Homens com Carga Proviral Baixa



Gráficos individuais – iHAM



### Gráficos individuais – HAM/TSP



## ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

- Coautoria no artigo de Pereira-Santos, T.A  
Referência: Pereira-Santos, T.A.; **da Rocha, A.S.**; Lopes-Ribeiro, Á.; Corrêa-Dias, L.C.; Melo-Oliveira, P.; Reis, E.V.d.S.; da Fonseca, F.G.; Barbosa-Stancioli, E.F.; Tsuji, M.; Coelho-dos-Reis, J.G.A. Diversity of HLA-A2-Restricted and Immunodominant Epitope Repertoire of Human T-Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1) Tax Protein: Novel Insights among N-Terminal, Central and C-Terminal Regions. **Biomolecules** 2023, 13, 545. <https://doi.org/10.3390/biom13030545>
- Coautoria no artigo de Daian e Silva, D.S.O.,  
Referência: Daian e Silva, D.S.O., Cox, L.J., **Rocha, A.S. et al.** Preclinical assessment of an anti-HTLV-1 heterologous DNA/MVA vaccine protocol expressing a multiepitope HBZ protein. **Viol J** 20, 304 (2023). <https://doi.org/10.1186/s12985-023-02264-z>
- Coautoria no artigo de Marcos Callisto  
Referência: Marcos Callisto, Ricardo Solar, **Anderson Santos da Rocha**, André Araújo da Paz, Bárbara Martins Dolabela, Breno Felisberto, Elisângela Cristina da Silva Costa, Estêvão Emerick de Oliveira Eller, Heitor Felipe Lopes de Castro, Isadora Gerheim, Juliana Carmem Lombello, Karoline Hellen Madureira, Luísa Couto Gonçalves de Souza, Norma Senna, Rafael Marques, Rafael Melo Caffaro, Sara Akemi Ponce Otuki, Gisele Moreira Dos Santos, Pedro Henrique Monteiro do Amaral, ... Tarcisio Nunes. (2023). Avaliação Ecológica Rápida de Qualidade de Água e Bioindicadores Bentônicos no Parque Nacional da Serra do Gandarela, Minas Gerais. *Revista Espinhaço* 21, 12(1). <https://doi.org/10.5281/zenodo.7996142>
- Coautoria no resumo expandido de COX, L. J.  
Referência: COX, L. J. ; Franco, GM ; **ROCHA, A. S.** ; Fonseca, F. ; MARTINS, M. L. ; FRAGA, V. G. ; FUJIWARA, R. T. ; BARBOSA-STANCIOLI, EDEL FIGUEIREDO . PEPTIDE SCREENING FOR DEVELOPMENT OF A RAPID DIFFERENTIAL TEST FOR HTLV-1 AND HTLV-2. In: XV SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE HTLV NO BRASIL, 2022, Campo Grande. **Revista de Patologia Tropical**, 2022. v. 51

- Autoria de resumo publicado em Anal  
Referência: **ROCHA, A. S.**; Franco, GM ; COX, L. J. ; COELHO-DOS-REIS, JORDANA G. A. ; Romanelli, L. C. ; MARTINS, M. L. ; BARBOSA-STANCIOLI, EDEL FIGUEIREDO . CLINICAL SYMPTOMS AND SIGNS IN ASYMPTOMATIC HTLV-1 INFECTED CARRIERS: EVALUATION DURING A FOLLOW-UP STUDY IN THE GIPH COHORT IN MINAS GERAIS STATE. In: XV SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE HTLV NO BRASIL, 2022, Campo Grande. **Revista de Patologia Tropical**. Goiânia, 2022. v. 51.
- Apresentação Oral em Evento  
Evento: XVI SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE HTLV NO BRASIL. Long-term Follow-up of anti-Tax IgM, IgG1 and IgG antibodies in asymptomatic HTLV-1- infected carriers in GIPH cohort. 2023. (Simpósio).