

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR

Avaliação de perfil inflamatório e carga proviral em portadores de HTLV-1

NATHÁLIA CRISTINA MOREIRA PEREIRA

BELO HORIZONTE

2016

NATHÁLIA CRISTINA MOREIRA PEREIRA

Avaliação de perfil inflamatório e carga proviral em portadores de HTLV-1

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular, Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dra. Débora Marques de Miranda; Adjunta do Departamento de Pediatria; Faculdade de Medicina da UFMG.

Co-Orientadora: Prof^a. Dra. Daniela Valadão Freitas Rosa.

Belo Horizonte

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

P436a Pereira, Nathália Cristina Moreira.
Avaliação de perfil inflamatório e carga proviral em portadores de HTLV-1 [manuscrito]. / Nathália Cristina Moreira Pereira. - - Belo Horizonte: 2016.
79f.: il.
Orientador: Débora Marques de Miranda.
Coorientador: Daniela Valadão Freitas Rosa.
Área de concentração: Medicina Molecular.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Vírus 1 Linfotrópico T Humano . 2. Paraparesia Espástica Tropical. 3. Citocinas. 4. Carga Viral. 5. Inflamação. 6. Dissertações Acadêmicas. I. Miranda, Débora Marques de. II. Rosa, Daniela Valadão Freitas. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.
NLM: QW 168

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à Deus, por guiar os meus passos e me dar a sabedoria necessária para fazer as escolhas certas e ampliar o meu conhecimento.

À Prof^a. Dra. Débora Marques de Miranda, minha orientadora e grande mentora, pelo suporte indescritível, inspiração e exemplo de profissionalismo. Obrigada por me impulsionar a buscar o meu melhor, sempre receptiva e sorridente. Sempre irei me espelhar na Sra. ao longo de toda minha carreira.

À Pós Dra. Daniela Valadão Freitas Rosa, minha co-orientadora, que esteve presente em todos os momentos, sempre solícita e sábia. Agradeço, pois cresci imensamente ao seu lado, como profissional e pessoa, obrigada pelo grande apoio em todas as horas.

Ao Pós Dr. Luiz Alexandre Viana Magno, pelas horas de estudo desde o princípio desta jornada, pela dedicação e prazer em ensinar, um grande profissional no qual pude contar em todos os momentos de execução deste trabalho.

Ao Prof. Marco Aurélio Romano Silva, pela oportunidade de fazer parte do grupo INCT de Medicina Molecular.

Ao Prof. Maicon de Albuquerque, por acreditar no meu potencial e me abrir as portas de um futuro próspero, um grande mestre.

Ao Dr. Luiz Claudio, Dr. Manuel, Renata e ao Hemominas por trabalharem junto a mim neste projeto.

Aos meus demais colegas de laboratório, Cinthia, Erika, Eduardo, Hèlia, Kevin, Luiza, Matheus, Michelle, Monique, Patrícia de Araújo e em especial ao meu braço direito Taynná, sem vocês eu não teria tantas histórias e sorrisos para compartilhar. Tenham a certeza que vocês tornaram os meus dias mais alegres e completos.

Aos pacientes que confiaram em nós a realização deste estudo e tornaram este trabalho possível.

Aos meus colegas de faculdade e todos amigos, agradeço pela força, compreensão, horas de estudo e diversão. Obrigada por contribuírem com a realização desta dupla jornada.

Aos meus familiares, pelas orações e torcida, toda energia positiva vinda de vocês com certeza me ajudaram a vencer.

Aos meus pais e irmão, por estarem incondicionalmente ao meu lado. Graças a vocês foi possível que eu desse cada um dos meus passos e mesmo em meio a algumas dificuldades nunca hesitaram, sempre me incentivando a seguir o meu caminho. DEDICO A VOCÊS ESTA CONQUISTA!

RESUMO

O HTLV-1 (Vírus linfotrófico de células T Humanas) é um retrovírus associado a algumas condições clínicas, dentre elas destacam-se a mielopatia associada ao HTLV/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP) e a leucemia de células T do adulto. O foco do presente estudo é a HAM/TSP, doença caracterizada por um início insidioso e evolução lenta e progressiva. Geralmente acomete indivíduos na quarta e quinta décadas de vida, cursando com comprometimento urinário, intestinal, sexual, evoluindo para fraqueza nos membros inferiores, distúrbios de marcha, perda da força muscular e espasticidade muscular. O quadro clínico resulta da resposta do sistema imune ao vírus, o que caracteriza a patogênese da doença; mecanismos imunoprotetivos, imunopatológicos, altos níveis de citocinas pro-inflamatórias e carga proviral são variáveis que em conjunto determinam o curso clínico. Estudos sugerem que a carga proviral pode estar relacionada com o desenvolvimento de HAM/TSP, sendo que pacientes com a doença apresentam altos níveis de carga proviral quando comparados ao grupo assintomático. A relação de citocinas pro-inflamatórias e a complicação para forma HAM/TSP também é descrita, onde a inflamação instalada no tecido do sistema nervoso central, pode ser uma das causas dos sintomas desencadeados após a instalação da doença.

O presente estudo comparou a carga proviral e a expressão de citocinas liquoróricas e plasmáticas, entre dois grupos, portadores do vírus sem comprometimento neurológico e portadores do vírus com comprometimento neurológico. Resultados encontrados corroboram com a literatura, onde a carga proviral é maior em amostras de líquido de pacientes com comprometimento neurológico comparado ao grupo assintomático. Em relação à dosagem de citocinas, os níveis de ITAC, IL-5, IL-8, TNF-alpha apresentam-se elevados no líquido e apenas ITAC no plasma dos pacientes com comprometimento neurológico. Dessa forma, é possível sugerir que carga proviral e citocinas pró-inflamatórias estão associadas com o desenvolvimento de HAM/TSP e estudos complementares são necessários para determinar biomarcadores que auxiliem na predição da evolução da doença.

Palavras-chave: HTLV-1, mielopatia associada ao HTLV (HAM), paraparesia espástica tropical (TSP), citocinas, carga proviral, inflamação.

ABSTRACT

HTLV-1 (Human T-cell lymphotropic virus) is a retrovirus associated with some clinical conditions, among them HTLV-associated / tropic spastic paraparesis (HAM / TSP) and adult T-cell leukemia. The focus of the present study is HAM / TSP, a paraparesis characterized by an insidious onset and slow and progressive evolution. It usually affects individuals in the fourth and fifth decades of life, presenting with urinary, intestinal and sexual impairment, progressing to weakness in the lower limbs, gait disturbances, loss of muscle strength and muscle spasticity.

The clinical picture results from the imbalance of immune system response to the virus, which characterizes the pathogenesis of the disease; Immunopathogenic mechanisms, high levels of pro-inflammatory cytokines and proviral load are variables that together determine the clinical course. Studies suggest that the proviral load may be related to the development of HAM / TSP, and patients with the disease present high levels of the proviral load when compared to the asymptomatic group. The relationship of proinflammatory cytokines and the complication to HAM / TSP form is also described, where the inflammation installed in central nervous system tissue may be one of the causes of the symptoms triggered by the onset of the disease.

The present study compared the proviral load and the expression of liquid and plasma cytokines between two groups, carriers of the virus without neurological impairment and carriers of the virus with neurological impairment. Results corroborate with the literature, where the proviral load is higher in CSF samples from patients with neurological impairment compared to the asymptomatic group. About the cytokine dosage, levels of ITAC, IL-5, IL-8, TNF-alpha are high in CSF and only ITAC in plasma of patients with neurological impairment. Thus, it is possible to suggest that proviral loading and proinflammatory cytokines are associated with the development of HAM / TSP and further studies are needed to determine biomarkers to aid in predicting disease progression.

Keywords: HTLV-1 associated myelopathy (HAM), spastic paraparesis tropical (TSP), cytokines, proviral load inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição geográfica do HTLV-1.....	17
Figura 2. Figura 1. HTLV-1/ II ensaio imunoenzimático (EIA), taxas de prevalência de triagem sorológica (1.000 / doações) em doadores de sangue de capitais dos 26 estados e no Distrito Federal do Brasil.....	18
Figura 1. (Artigo) Carga proviral em plasma.....	41
Figura 2. (Artigo) Carga proviral em líquido.....	41
Figura 3. (Artigo) Níveis plasmáticos de ITAC nos grupos 1 e 2.....	42
Figura 4. (Artigo) Níveis de citocinas líquoricas.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Níveis de citocinas plasmáticas nos grupos 1 e 2.....	50
Tabela 2. Níveis de citocinas líquóricas nos grupos 1 e 2.....	51

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Função geral das citocinas e quimiocinas estudadas.....	25
Quadro 2: Escala EDSS completa.....	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATL - leucemia de células T do adulto

DST - Doença sexualmente transmissível

EDSS - Escala Expandida do Estado de Incapacidade de Kurtzke

EIA - Ensaio imunoenzimático

GIPH - Grupo Interdisciplinar de Pesquisas em HTLV

GMCSF - Fato estimulante de colônias de granulo-monócitos

HHV - Vírus Herpes Humano

HTLV - vírus linfotrópico de células T humana

IFN- γ - interferon-gama

IL-1 β - Interleucina 1 beta

IL-2 – Interleucina 2

IL-4 - Interleucina 4

IL-6 – Interleucina 6

IL- 8 Interleucina 8

IL-9 – Interleucina 9

IL-10 – Interleucina 10

IL-12 - Interleucina 12

IL-13 - Interleucina 13

IL-17 a – Interleucina 17 a

IL-21 – Interleucina 21

ITAC – Interferon-alfa quioatratador de células T induzíveis

LCR - Líquido cefalorraquidiano; líquor

OMDS - Pontuação de Osame de deficiência motora

TNF- α - fator de necrose tumoral alfa

TSP - paraparesia espástica tropical

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 HTLV.....	15
1.2 EPIDEMIOLOGIA.....	16
1.3 TRANSMISSÃO.....	18
1.4 DOENÇAS ASSOCIADAS.....	18
1.5 HAM/TSP.....	19
1.6 PATOGÊNESE.....	20
1.6.1 Resposta imunológica associada ao HTLV; citocinas, carga proviral e inflamação.....	20
1.6.2 Função das citocinas e quimiocinas estudadas.....	24
1.7 CLASSIFICAÇÃO EDSS	26
2. OBJETIVOS	29
2.1 GERAL.....	30
2.2 ESPECÍFICOS.....	30
3. ARTIGO	31
4. DISCUSSÃO	59
4.1 AMOSTRA.....	60
4.2 CITOCINAS PLASMÁTICAS.....	61
4.3 CITOCINAS LIQUÓRICAS.....	61
4.4 CARGA PROVIRAL.....	63
5. CONCLUSÃO	65
6. LIMITAÇÕES	67
7. REFERÊNCIAS	69
8. ANEXOS	77

1) INTRODUÇÃO

1.1 HTLV

O vírus linfotrópico de células T humana-1 (HTLV-1 - "Human T cell lymphotropic vírus 1"), foi o primeiro retrovírus humano descrito, tendo sido inicialmente associado com a leucemia de células T do adulto (ATL) no Japão em 1977 (POIEZ e *cols.*, 1980). São conhecidos quatro tipos do vírus HTLV: HTLV-1, HTLV-2, HTLV-3 e HTLV-4. HTLV-3 e HTLV-4 foram encontrados até o momento apenas em primatas. Os mais estudados são os tipos HTLV-1 e HTLV-2. O HTLV-2 não foi associado com nenhuma doença, por outro lado o HTLV-1 é associado a várias patologias humanas, entre elas a leucemia/linfoma de células T (ATLL) do adulto e paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV (SOUZA e *cols.*, 2006).

Gessain e *cols.*, em 1985, demonstraram que pacientes portadores de paraparesia espástica tropical (TSP), na região da Martinica, apresentavam sorologia positiva para HTLV-1 em 68% dos casos. Em 1986, uma condição neurológica similar foi descrita no Japão e denominada mielopatia associada ao HTLV-1 (HAM). Posteriormente, Román e Osame (1988) concluíram tratar-se da mesma doença, passando a ser usado o termo mielopatia associada ao HTLV/ paraparesia espástica tropical (HAM/TSP) (Romanelli e *cols.*, 2010). A relação entre HAM/TSP e HTLV-1 foi mais tarde observada em muitas regiões do mundo e, finalmente, em 1988, o vírus foi isolado por MacHann e *cols.* 1988.

O HTLV-1 é um vírus da família *retroviridae*, cujo genoma é constituído por RNA de fita simples, é replicado por meio de um processo denominado transcrição reversa, onde moléculas de DNA de fita dupla são geradas a partir do RNA, através da ação da enzima transcriptase reversa (FOX e *cols.*, 2016).

Inicialmente a partícula viral necessita se ligar à superfície celular. Após essa interação, o vírus torna-se capaz de penetrar na célula, liberando todo o seu conteúdo no citoplasma. Neste, a fita simples de RNA viral é transcrita à DNA de fita dupla pela transcriptase reversa. A dupla fita de DNA linear migra para o núcleo e integra-se no genoma do hospedeiro. Integrado, o provírus utiliza a maquinaria celular para a transcrição primária do RNA genômico. Parte do RNA viral sintetizado

é processada para gerar o RNAm que será traduzido nas proteínas virais apropriadas no citoplasma (FOX e cols., 2016).

1.2 EPIDEMIOLOGIA

Ao longo dos 20 anos que se seguiram à descoberta do HTLV-1, muita informação foi adquirida sobre a sua epidemiologia e as suas formas de transmissão (PROIETTI e cols., 2006). Na população humana a infecção pelo vírus HTLV-1, é a mais prevalente entre os vírus HTLV em todo o mundo (PROIETTI e cols., 2006).

O número exato de infectados pelo HTLV no mundo não é conhecido. Estima-se que de 15 a 20 milhões de pessoas estão infectadas, na maioria pelo HTLV-1, com uma distribuição mundialmente heterogênea. (Romanelli e cols., 2010). De acordo com Ferreira Jr. e cols. (2007), em regiões como Japão, Caribe, África Ocidental e Central, Sudeste dos Estados Unidos, Melanesia e América do Sul observam-se altas taxas desta infecção. A figura 1 demonstra, em vermelho, as áreas que são consideradas endêmicas para infecção pelo HTLV-1.



Figura 1. Distribuição geográfica do HTLV-1. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822002000400015>. Acesso em: 01 de nov. de 2016.

No Brasil, o vírus está presente em todos os estados onde foi pesquisado, com prevalências variadas, com estimativas de, aproximadamente, 2,5 milhões de

peças infectadas (Romanelli e cols., 2010). Segundo Santos e cols. (2009), no Brasil, a infecção pelo HTLV-1 é considerada endêmica, porém com baixo índice de prevalência na população geral, sendo mais elevadas nos estados do Maranhão, Bahia, Pernambuco e Pará. Salvador tem uma das maiores prevalências do vírus, variando de 1,35% a 1,80% (SANTOS, 2013). A Figura 2 mostra a localização geográfica dos 27 bancos de sangue que participaram do estudo de Soares e cols. (2005), bem como a média das taxas de prevalência de HTLV-1/2 para o período 1995-2000.



Figura 2. HTLV-1/II ensaio imunoenzimático (EIA), taxas de prevalência de triagem sorológica (1.000 / doações) em doadores de sangue de capitais dos 26 estados e no Distrito Federal do Brasil. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2005000300027>. Acessado em: 14 de jan. de 2016.

Nota-se diante da figura 2 que existe uma heterogeneidade geográfica importante entre as taxas de prevalência médias. As taxas de prevalência no Brasil são menores nas cidades da região Sul e maiores nas regiões Norte e Nordeste (Catalan-Soares e cols. 2005).

Muito do que se sabe a respeito da distribuição do HTLV-1 no mundo deve-se ao reconhecimento das doenças associadas com HTLV-1, como de células T de adultos leucemia / linfoma (ATL) e/ou mielopatia associada ao HTLV.

1.3 TRANSMISSÃO

A transmissão do HTLV-1 ocorre, principalmente, por três vias; horizontal, através do contato sexual desprotegido, sendo a infecção mais frequentemente transmitida do homem para a mulher. Vertical, da mãe para o filho, caracterizada por transmissão transplacentária, durante o parto e pela amamentação. Parenteral, ocorrendo através da transfusão de sangue contaminado e bem através do uso de seringas contaminadas (GONÇALVES *e cols.*, 2010).

De acordo com Gotuzzo *e cols.* (2007) em áreas endêmicas do HTLV-1 a transmissão de mãe para filho é considerada o fator mais importante para sustentar a endemicidade. A transmissão vertical do HTLV-1 ocorre, na maioria das vezes, através da amamentação, infecção transplacentária e durante o parto. Roucoux *e cols.* (2005) observaram que a maioria dos estudos longitudinais de transmissão sexual do HTLV-1 têm-se centrado em populações de alto risco, como indivíduos com comportamento sexual de risco e portadores de doenças sexualmente transmissíveis (DST).

1.4 DOENÇAS ASSOCIADAS

O HTLV-1 é o agente etiológico da leucemia/linfoma de células T do adulto e da paraparesia espástica tropical ou mielopatia associada ao HTLV-1 (HAM/TSP). Está associado também a outras condições clínicas, como artropatias, polimiosites, uveítes, dermatite infecciosa, síndrome de Sjögren, entre outras. Dermatite infecciosa em crianças e estrongiloidíase tem sido descritas em portadores do HTLV-1, e em pacientes com HAM/TSP, geralmente em áreas endêmicas como o Japão e bacia do Caribe. As diversas manifestações clínicas podem depender de tipo e magnitude da resposta imune do hospedeiro para os antígenos do HTLV-1 e do local ou órgão no qual a reação inflamatória acontece (FERREIRA JR *e cols.*, 2007).

Estas manifestações clínicas ocorrem em menos de 5% dos pacientes infectados pelo HTLV-1 (SOUZA, 2012). Os portadores, em sua maioria, permanecem assintomáticos por toda a vida. Fatores genéticos e imunológicos do hospedeiro

são os principais responsáveis pelo aparecimento das doenças associadas (ROMANELLI *e cols.*, 2010).

1.5 HAM/TSP

Segundo Moreira (2010), aproximadamente 5% dos pacientes infectados evoluem para ATLL, e 2 a 3% evoluem para HAM/TSP. A HAM/TSP é uma doença desmielinizante crônica progressiva que afeta a medula espinal e a substância branca do cérebro. Menos de 5% dos portadores crônicos do HTLV-1 desenvolverão essa complicação.

Os sintomas de disfunção vésico-intestinal e sexual podem ser uma das primeiras queixas do paciente. Geralmente, caracteriza-se por urge-incontinência urinária, constipação intestinal e disfunção erétil na população masculina. Durante o curso da doença, disfunção da bexiga é muito comum, incontinência ou retenção urinárias que antecedem a paraparesia por muitos anos (ARAÚJO E SILVA, 2006).

Os distúrbios de marcha, fraqueza e enrijecimento dos membros inferiores são consequentes à diminuição gradual da força muscular e da espasticidade nos miótomos acometidos. O paciente diminui gradativamente a deambulação, necessitando, ao longo do tempo, de auxílio para locomoção (bengalas e andadores) até evoluir para o uso da cadeira de rodas. O tempo médio de evolução descrito na literatura varia de poucos meses a várias décadas (DOMINGUES *e cols.*, 1995).

De acordo com Araújo e Silva (2006), depois de um ou dois anos de doença há progressão do comprometimento neurológico indicando início da fase inflamatória. A progressão da doença degenerativa, HAM/TSP, é mais rápida em mulheres do que em homens.

Outro fator importante que parece influenciar no aparecimento da doença é a carga proviral. Pacientes com carga proviral elevada apresentam o aparecimento dos sintomas mais rapidamente em relação aqueles com cargas baixas, possivelmente

indicando um aumento da proliferação ou migração de linfócitos HTLV-1-infectado ao SNC (ARAUJO; SILVA, 2006).

1.6 PATOGÊNESE

1.6.1 Resposta imunológica relacionada ao HTLV-1; citocinas, carga proviral e inflamação.

Diversas teorias a cerca da patogênese da doença são investigadas e as expectativas concentram-se no campo da imunologia/biologia molecular. Como se sabe, o vírus HTLV-1 é linfocitotrópico e interfere no funcionamento da imunidade celular. As teorias inflamatória e imunológica apoiam-se no achado de anticorpos séricos e líquóricos contra o HTLV. A teoria desmielinizante e citotóxica vírus-induzida é atualmente a mais aceita. Os linfócitos são ativados na paraparesia espástica tropical, atravessam a barreira hemato-encefálica, iniciando assim o processo inflamatório no SNC que resulta em lesão celular (CARTIER *e cols.*, 1997).

Embora a resposta imune seja fundamental para a defesa contra agentes infecciosos, têm sido acumuladas nos últimos anos evidências de que em muitas doenças infecciosas os principais aspectos patológicos não estão relacionados com uma ação direta do agente agressor, mas sim com uma resposta imune desbalanceada. Em muitas dessas situações existe uma reação de hipersensibilidade com resposta imune exacerbada e não modulada que tem como consequência dano tecidual (COOKE *e cols.*, 2004).

Alguns parâmetros como alta carga proviral, elevada linfoproliferação espontânea *in vitro*, altos títulos de anticorpos e linfócitos T CD8⁺ específicos para antígenos do HTLV-1, tanto no soro quanto no fluido cerebrospinal, parecem estar associados com a presença de HAM/TSP (PROIETTI *e cols.*, 2002).

Em termos de resposta imune associada a infecção pelo HTLV-1, sabe-se que a imunidade inata promove a defesa inicial, numa resposta rápida e inespecífica que não requer exposição prévia. A imunidade adquirida é mais lenta, demora alguns dias para começar a agir, requer contato prévio com antígeno e gera memória. (COOKE e cols., 2004).

As células integrantes da resposta imunológica inata são: macrófagos, células dendríticas, neutrófilo, basófilo, eosinófilo, mastócito e células *natural killer* (NK). As células NK são muito importantes pelo fato delas liberarem grânulos que são efetivos no ataque contra células infectadas por vírus. As células integrantes do sistema imune adaptativo são os linfócitos T e B, que ao serem expostas aos antígenos podem diferenciar-se, as células B em plasmócitos e os linfócitos T em células T citotóxicas ou T auxiliares (ABBAS, 2008).

A resposta mediada pelas células T é extremamente efetiva no mecanismo de defesa contra agentes intracelulares, como vírus, protozoários, fungos e bactérias intracelulares. As células T podem exercer sua função através da citotoxicidade mediada por células CD8⁺ ou através da secreção de citocinas que vão ativar macrófagos para destruir os agentes intracelulares (MACHADO e cols., 2004). Embora seja latente na maioria das células T, a infecção pelo HTLV induz a ativação de linfócitos os quais respondem através de mecanismos múltiplos de resposta imune celular e humoral (PROIETTI e cols., 2002).

A resposta Th1 está relacionada com a defesa contra protozoários, bactérias intracelulares e vírus, enquanto a resposta Th2 é mais efetiva contra os helmintos e bactérias extracelulares. Essas respostas são também antagônicas, desde que o IFN-gamma (IFN-g) modula negativamente a resposta Th2, e a Interleucina 4 (IL-4) e a interleucina 10 (IL-10) modulam negativamente a resposta Th1, o que permite uma homeostasia no sistema imune e uma resposta imunológica balanceada (MILLS e cols., 2004).

HTLV-1 infecta predominantemente as células T que levam a linfoproliferação e a produção excessiva de citocinas pro-inflamatórias (SANTOS e cols., 2013). Células T que produzem interleucina 2 (IL-2) e INF-g, chamadas Th1, aumentam a imunidade mediada por células T. IFN-g ativa macrófago e interleucina 2 (IL-2) estimula o crescimento de células T antígeno-específicas. Células T que

produzem IL-4, IL-5 e IL-10, chamadas Th2, aumentam a resposta humoral. IL-4 estimula a produção de IgE e ambas, IL-4 e IL-10 estimulam células B e inibem ativação de macrófago (SIELING e *co/s.*, 2002).

Citocinas produzidas pelos diferentes subgrupos de linfócitos; Th1/Th2, exercem função regulatória antagônica da resposta imune. Indivíduos infectados com o HTLV-1, por apresentarem forte resposta imune do tipo 1, podem estar susceptíveis a doenças autoimunes e inflamatórias. Como esta forte resposta tipo 1 pode inibir a produção de citocinas por células Th2, indivíduos infectados pelo HTLV-1 são mais susceptíveis a doenças causadas por helmintos e podem ter reduzidas as manifestações de natureza alérgica (MILLS e *co/s.* 2004).

As células T infectadas induzem a ativação e proliferação celular com produção de concentrações elevadas de citocinas associadas com a resposta Th1, como Interleucina 2, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon-gama. Tem sido demonstrado que tanto células CD4⁺ e CD8⁺ infectadas infiltram a medula e produzem citocinas tais como IFN-gamma, TNF-alfa e IL-6, considerados mediadores inflamatórios importantes do dano tecidual em HAM/TSP (SANTOS e *co/s.*, 2004).

Coelho dos Reis e *co/s.* (2013), sugerem evidências de que o perfil imunológico de pacientes com HAM/TSP é composto por uma resposta imunológica exacerbada. O aumento dos níveis de citocinas de tipo-1, tais como IFN-g, TNF-alfa, IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-9 e IL-13, encontrados em pacientes com HAM/TSP são exemplos de tais evidências. Segundo Starling (2010), resume-se que durante a infecção pelo HTLV-1 a resposta imune parece variar de forma qualitativa e quantitativa entre os indivíduos. Aqueles com carga proviral elevada que se mantêm assintomáticos, estariam mantendo uma resposta balanceada Th1/Th2, enquanto aqueles que não apresentam um padrão equilibrado de resposta Th1/Th2 desenvolveriam os sintomas das complicações consequentes da infecção viral.

Tratando-se de carga proviral, Romanelli e *co/s.* (2010) abordam que dentre os fatores de risco para a passagem da condição de portador assintomático para a presença de mielopatia e de outras doenças imunomediadas destaca-se uma carga proviral elevada como o fator mais evidente.

O número de linfócitos T citotóxicos (CTLs) específicos HTLV-1 é positivamente correlacionado com a carga proviral em portadores HTLV-1 assintomáticos e em pacientes com HAM/TSP. No entanto, o mecanismo de regulação subjacente da carga viral ainda é incerto (Fuzzi e *co/s.*, 2014).

Fuzzi e *co/s.* (2014), relatam que a carga viral resultante da expansão clonal de células T CD4⁺ infectadas com HTLV-1 pode levar a um aumento da expressão de antígenos virais, aumentando assim a ativação das células T CD8⁺ específicas do HTLV-1.

Quando se trata do Sistema Nervoso Central, observamos a existência de um tipo celular diferenciado, a micróglia, responsável pela fagocitose, atuando como os macrófagos, porém presentes apenas no SNC (HENRIQUES, 2014).

Os linfócitos são ativados na HAM/TSP, atravessam a barreira hematoencefálica, iniciando assim o processo inflamatório no SNC que resulta em lesão celular. Como estas células CD8⁺ inflamatórias são encontrados no sistema nervoso central, a presença de infecção por HTLV-1 leva à produção de citocinas inflamatórias e quimiocinas, que podem danificar o sistema nervoso central (FUZZI e *co/s.* 2014). Fuzzi e *co/s.* (2014) ressaltam que em pacientes com HAM/TSP, há uma predominância de citocinas Th1 (IFN-g) e uma redução nas citocinas Th2 (IL-4 e IL-10), o que resulta em inflamação do tecido nervoso.

A evolução para HAM/TSP está diretamente relacionada a resposta imunológica. A resposta imune hiperestimulada, com a alta produção de citocinas inflamatórias, leva a inflamação tecidual o que é uma possível justificativa para a evolução da forma HAM/TSP.

O desequilíbrio entre os tipos de resposta Th1 e Th2 podem estar ligados ao desenvolvimento da doença em 2-3% dos infectados, contudo, ainda não se sabe ao certo a natureza e mecanismos destes fatores, mas como relatado em ROMANELLI e *co/s.* (2010) acredita-se que na tentativa de controlar o agente infeccioso, a resposta imunológica ocasiona dano ao tecido nervoso, decorrente de resposta pró-inflamatória exacerbada.

Quadro 1: Função geral das citocinas e quimiocinas estudadas.

Nome	Nome Original	Função
CXCL11	ITAC	Recrutamento de células T efetoras
GMCSF	Fato estimulante de colônias de granulo-monócitos	Atuam promovendo maturação de células da medula óssea em células dendríticas e monócitos.
CX3CL1	FRACKTALCINA	Recrutamento de células T, células NK e macrófagos; ativação de CTL e células NK.
INF-gamma	Interferon gamma	expressão aumentada de MHC de classe I em estado viral, ativação das células natural killer.
TNF-alpha	Fator de necrose tumoral alpha	Ativação de células endoteliais na inflamação, coagulação. Ativação de neutrófilos, do centro da febre (hipotálamo), estimula a síntese de proteínas de fase aguda no fígado, catabolismo das gorduras e músculos e apoptose celular.
CCL20	MIP3alfa	Fator quimiotático para linfócitos T e B, bem como células dendríticas imaturas.
IL-1B	Interleucina 1 beta	Ativação de linfócitos.
IL12	Interleucina 12	Diferenciação das células T em Th1, síntese de INF-gamma e atividade citotóxica aumentada em células T e células NK.
IL-13	Interleucina 13	Em células B estimulam a troca de isótopo para IgE, produção aumentada de muco nas células epiteliais, síntese aumentada de colágeno nos fibroblastos e macrófagos.

IL-17A	Interleucina 17 a	Regula as atividades de NF-kappaB e proteínas quinases.
IL-2	Interleucina 2	Proliferação de células T, síntese aumentada de citocinas, potencializa apoptose, promove desenvolvimento de células T reguladoras, sobrevivência. Proliferação e ativação de células NK. Proliferação de células B e síntese de anticorpo.
IL-4	Interleucina 4	Estimula a troca de isótopo em células B para IgE. Diferenciação para resposta Th2 em células T. Inibição da ativação dos macrófagos mediada por interferon gamma. Proliferação de mastócitos.
IL-5	Interleucina 5	Ativação e produção aumentada dos eosinófilos. Proliferação de células B e produção do IgA.
IL-6	Interleucina 6	Estimula a síntese de proteínas de fase aguda no fígado. Proliferação de células produtoras de anticorpos.
IL-7	Interleucina 7	Indução de linfócitos T e B.
IL-8, CXCL8	Interleucina 8	Recrutamento de neutrófilos.
IL-10	Interleucina 10	Inibição da produção de IL-12 e expressão de co-estimuladores e moléculas de MHC de classe II nos macrófagos e células dendríticas.
IL-21	Interleucina 21	Estimula a proliferação de células NK e células T citotóxicas.

1.6 CLASSIFICAÇÃO EDSS

O impacto da gravidade da doença é apresentado por duas escalas comumente utilizadas: Escala Expandida do Estado de Incapacidade de Kurtzke (EDSS) e a Pontuação de Osame de deficiência motora (OMDS).

A EDSS é uma escala que mede funcionalidade e baseia-se em medidas de oito áreas do sistema nervoso central conhecidas como sistemas funcionais. Os passos iniciais na escala medem o grau de disfunção nestes sistemas, como a dormência transitória na face ou dedos, ou os distúrbios visuais. Os passos finais medem a incapacidade no que se refere à mobilidade, usando, sobretudo a distância percorrida a pé.

Os sistemas funcionais (SF) avaliados no âmbito da escala EDSS são:

- Funções Piramidais - movimento voluntário
- Funções do Tronco Cerebral - movimento dos olhos, sensação e movimento da face, engolir (relacionada a origem dos nervos cranianos)
- Funções Visuais (ou Ópticas)
- Funções Cerebrais (ou Mentais) - memória, concentração, humor
- Funções Cerebelares - coordenação do movimento ou equilíbrio
- Funções Sensitivas (verificação da funcionalidade das vias espinotalâmicas e funículo posterior)
- Funções Intestinais e Vesicais

Quadro 2: Escala EDSS completa

0- Exame neurológico normal (todos indicadores de grau 0 nos sistemas funcionais (SF))
1.0- Ausência de incapacidade funcional, sinais neurológicos mínimos num dos SF
1.5- Ausência de incapacidade funcional, sinais neurológicos mínimos em mais de um SF
2.0- Incapacidade funcional mínima num SF
2.5- Incapacidade funcional mínima em dois SF
3.0- Incapacidade funcional moderada num SF ou incapacidade ligeira em três ou quatro SF, embora com plena capacidade ambulatória
3.5- Plena capacidade ambulatória, mas com incapacidade funcional moderada num SF, e um ou dois SF com grau 2, ou dois SF com grau 3, ou cinco SF com grau 2
4.0- Plena capacidade ambulatória sem necessidade de assistência, plena independência funcional, atividade durante cerca de 12 horas por dia, apesar de alguma incapacidade funcional relativamente grave, caracterizada por um SF com grau 4 (os restantes SF com graus 0 ou 1) ou combinações de graus inferiores ultrapassando os limites dos níveis anteriores. Capacidade ambulatória num percurso de cerca de 300 metros sem assistência ou descanso
4.5- Plena capacidade ambulatória sem assistência, atividade normal durante a maior parte do dia, capacidade de trabalhar durante um dia completo, eventualmente com algumas limitações à atividade plena ou com necessidades de assistência mínima; estado caracterizado por uma incapacidade funcional relativamente grave, apresentando um SF com grau 4 (os restantes com grau 0 ou 1), ou combinações de grau inferior, ultrapassando os limites dos níveis anteriores. Capacidade ambulatória num percurso de cerca de 300 metros sem assistência ou descanso
5.0- Capacidade ambulatória num percurso de cerca de 200 metros sem assistência ou descanso; incapacidade funcional suficientemente grave para afetar adversamente o desempenho das atividades diárias (por exemplo, realizar o trabalho de um dia sem tomar medidas especiais). Um SF com grau 5 isolado, os restantes com grau 0 ou 1; ou combinações de graus inferiores, que ultrapassam geralmente os indicados para o nível 4.0

<p>5.5- Capacidade ambulatória num percurso de cerca de 100 metros sem assistência ou descanso; incapacidade funcional suficientemente grave para impedir o desempenho das atividades diárias. Um SF com grau 5 isolado, os restantes com grau 0 ou 1; ou combinações de graus inferiores, que ultrapassam geralmente os indicados para o nível 4.0</p>
<p>6.0- Apoio unilateral intermitente ou constante (bengala, canadiana ou outras próteses) necessário para andar cerca de 100 metros, com ou sem descanso. Combinações com mais de dois SF com grau 3+</p>
<p>6.5- Apoio bilateral constante (bengalas, canadianas ou outras próteses) necessário para andar cerca de 20 metros sem descanso. Combinações com mais de dois SF com grau 3+</p>
<p>7.0- Incapacidade de andar mais de 5 metros, mesmo com apoios, necessidade de utilizar uma cadeira de rodas; doente desloca-se sozinho na cadeira de rodas pelo menos 12 horas por dia. Combinações com mais de um SF com grau 4+; muito raramente, grau piramidal 5 isolado</p>
<p>7.5- Incapacidade de dar mais de alguns passos; necessidade de utilizar uma cadeira de rodas; doente poderá necessitar de ajuda nas suas deslocações; doente consegue manipular a cadeira, mas não consegue agüentar numa cadeira de rodas normal durante o dia inteiro; poderá necessitar de uma cadeira de rodas elétrica. Combinações com mais de um SF com grau 4+</p>
<p>8.0- Doente essencialmente confinado ao seu leito ou cadeira, ou deambulando de cadeira de rodas com ajuda de terceiros, podendo estar fora da cama durante a maior parte do dia; Preservação de muitas das funções necessárias para cuidar de si próprio; de uma maneira geral, ainda consegue usar os braços de forma eficaz. Combinações com mais de dois SF, normalmente com grau 4+ em diversos sistemas funcionais</p>
<p>8.5- Doente essencialmente confinado ao leito durante a maior parte do dia; ainda consegue usar o(s) braço(s) de maneira eficaz; preservação de alguma capacidade para cuidar de si próprio. (equivalentes habituais de SF são combinações, normalmente com grau 4+ em diversos sistemas funcionais)</p>
<p>9.0- Doente acamado e totalmente dependente; capaz de comunicar e de comer. Combinações de SF maioritariamente de grau 4+</p>
<p>9.5- Doente acamado e totalmente dependente, incapaz de comunicar e de comer. Combinações de SF quase todos com grau 4+</p>
<p>10.0- Morte devida à Esclerose Múltipla.</p>

1) OBJETIVOS

2.1 Geral

Realizar estudo de caso-controle para avaliar o perfil inflamatório (sérica e líquórica) e carga proviral (sérica e líquórica) entre os grupos com sintomas neurológicos e o grupo assintomático portador de HTLV-1.

2.2 Específicos

1. Comparar os resultados de fatores inflamatórios dosados nas amostras de plasma e líquido cefalorraquidiano (LCR) com sintomas neurológicos e comprometimentos característicos do desenvolvimento da HAM/TSP.
2. Comparar as expressões da carga viral em plasma e liquor, analisando em qual dos dois tipos de amostra é mais representativo para evolução da doença.
3. Avaliar entre os resultados obtidos um possível biomarcador inflamatório que demonstre indícios do surgimento das complicações relacionadas a infecção pelo HTLV-1.

3) ARTIGO

To submit to Clinical Experimental Immunology (3.4)

Antibodies evaluation in seric and liquoric fluid in HTLV patients follow-up: does it hide any immunopathologic cue?

Nathália Cristina Moreira Pereira,

Luiz Cláudio Romanelli, MD

Maicon Rodrigues Albuquerque, PhD

Marina Lobato Martins, PhD

Luiz Alexandre Magno, PhD

Anna Barbara de Freitas Carneiro Proietti, PhD, MD

Rodrigo Nicolato PhD, MD

Ana Cristina Simões e Silva, PhD, MD

Marco Aurélio Romano Silva, PhD, MD

Daniela Valadão Rosa, PhD

Debora Marques de Miranda PhD, MD

1. Molecular Medicine National Institute of Science and Technology
2. Hemominas
3. Universidade Federal de Minas Gerais

ABSTRACT

Human T-cell leukemia virus type-I (HTLV-1) is a causal agent of a broad clinical spectrum of lymphoproliferative diseases partially modulated by an immune response. Considering the immune findings and the potential correlation between immune markers and disease progression, in this study we hypothesized that different clinical groups have their profile of immune mediators variable according to the severity. To answer this question, we analyze nineteen markers and establish the means of immune response in liquor and plasma markers in different clinical stages longterm followed. One of the most interesting findings was the ITALC/CXCL11, which is increased in plasmic and liquoric symptomatic HTLV-individuals. A proinflammatory cytokines, such as TNF-alpha and Interferon-gamma are also increased in liquoric samples from symptomatic patients. Analysed all potential factors of longterm prediction, liquoric levels of Interferon gamma emerge as predictive of the presence of neurologic symptoms for HTLV-1.

Key-words: HTLV-1, HAM/TSP, imune markers, Interferon-gamma, ITAC.

INTRODUCTION

Human T-cell leukemia virus type-I (HTLV-1) is carried by 10-20 million people around the world (ROMANELLI *et al.*, 2010). This retrovirus is a causal agent of a broad clinical spectrum of lymphoproliferative diseases, such as Adult T-cell leukemia (ATL), Tropical Spastic Paraparesis (TSP) or HTLV-associated myelopathy (HAM), arthritis, uveitis, dermatitis, and mild immunosuppression (Uchiyama *et al.*, 1977; Gessain *et al.*, 1985; Osame *et al.*, 1986; Mochizuki *et al.*, 1992). The HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic myelopathy TSP/HAM affects less than 2 - 5% of individuals infected with HTLV-1, but it is the most severe expression of this infection (SOUZA *et al.*, 2012). Myelopathy presentations consist on a spectrum of presentations including spastic paraplegia or paraparesis, coursing with progressive upper motor neuron involvement and mild sensory deficit and sphincteric disturbance (Höllsberg & Hafler, 1993; Gessain & Gout, 1992; Osame *et al.*, 1987). Neuropathologic findings of HAM/TSP of the spinal cord consist in degeneration of white matter in and outside the spinal cord, both white and gray matter of spinal cord presents chronic progressive inflammatory process, mostly at the lateral funiculus (Gonçalves *et al.*, 2008).

The pathogenesis of this TSP/HAM is not entirely understood but involves the HTLV-1 infection of astrocytes, microglia, and monocytes/macrophages and subsequent activation of infected cells. The immune response is driven by a load of viral infection and includes an increased proinflammatory cytokine production, such as TNF-alfa and interferon-gamma (Yamano *et al.*, 2002, Nagai *et al.*, 1998; Nagai *et al.*, 2001; Murphy *et al.*, 1989). Mechanism of infection of central nervous system and their resident cells still to be investigated, but seems to be

shared with disorder evolving autoimmunity. There is immunopathological evidence of lymphocytic infiltration of central nervous system (CNS), foamy macrophages, astrocytes proliferation and fibrillary gliosis in individuals infected with HTLV (MATSUURA *et al.*, 2010). The expression of inflammatory cytokines seems to reduce the duration of the disease becoming undetectable (Jacobson, 2002). The load of HTLV-1 in CD4 and CD8 T-Cell population appears to infiltrate CNS, promoting immunopathological changes that tend to result in disease progression (MELAMED *et al.*, 2015). Among the potential immunopathological findings in peripheral blood lymphocytes and liquor were already detected high levels of interferon (IFN)- γ , tumor necrosis factor (TNF)- α , and interleukin (IL)-6 in patients with HAM/TSP that seems to contribute for the breakthrough of the brain-blood-barrier and result in immunopathology and neurologic symptoms (LUNA *et al.*, 2011).

Considering the immune findings and the potential correlation between immune markers and disease progression, in this study we hypothesized that different clinical groups long-term followed-up could have their particular immune mediator's profile variable according to the severity. There is an intention to identify differences between the immune findings of patients with neurological findings suggestive of progression of disease (HAM/TSP) comparing them with the HTLV-asymptomatic group. To fulfill this aim, we analyzed nineteen markers and established the means of immune response in liquor and plasmatic markers in different clinical stages in a case-control matched sample followed for about ten years.

MATERIAL AND METHODS

Sample

This study evaluated 48 individuals infected with HTLV-1 (17 males and 31 females, mean age of 50.8, SD=11.1 years). Subjects were recruited at the GIPH cohort (1997-2015). This is an open cohort formed mainly by patients who found out to be infected with either HTLV-1 or HTLV-2 while donating blood at the Hemominas Foundation, in Belo Horizonte, Brazil. Currently, about 400 subjects are being followed by the cohort. Our sample of 48 HTLV-1 infected subjects was selected by convenience as being representative of the whole cohort, with a mean follow up time of 9.74 years (SD=5.08). The project was evaluated by an ethical board and all subjects gave an informed consent to participate of this study. Exclusion criteria evolves patients with any clinical or sorologic sign of co-infection with other neurotropic viruses (e.g. HIV), syphilis, hepatitis B and C, Chagas disease, if their neurologic disease was due to other causes (stroke, neurocysticercosis, brain trauma, neurodevelopmental delay, etc) and formal years of study less than four. Inclusion criteria allows inclusion only with confirmed diagnosed. Diagnosis of HTLV-1 infection was performed with positive sorology in ELISA, confirmed by Western Blot (WB HTLV 2.4, Genelabs Diagnostics, Singapore) or real-time PCR (Andrade *e cols.*, 2010). Patients were classified according to the Expanded Disability Status Scale (EDSS) (KURTZKE, 1983; WEINSHENKER *et al.*, 1989). The EDSS quantifies neurological disability and allows to observe changes in the level of disability over time. The EDSS scale ranges from 0 to 10 in 0.5 unit increments that represent higher levels of disability. Because the selected HTLV-1 patients presented a high variation in clinical symptoms, subjects were segmented into two different groups: (Group 1) EDSS

= 0, (Group 2) EDSS = 1-10. Group 1 is the group with no symptoms of neurological disease while Group 2 seems a progression to neurological commitment. In group 2, among 25 subjects, eight are symptomatic.

Immunological measurements

Biological Sample

Following lumbar puncture, CSF was collected in a polypropylene tube and centrifuged at 1,500 × g for 10 minutes. Supernatant was aliquoted in five vials and stored at -80 °C. CSF samples were obtained from all patients, except 2 patients from group 3. Plasma was extracted from peripheral blood collected in EDTA collection tubes. Blood samples were centrifuged at 3,000 × g, at 4°C, for 15 minutes, and plasma was aliquoted in six vials and kept at -80 °C until analyzed. Blood samples were obtained from all patients, except one, also in group 3.

Immunobead assay was performed

Immunobead assay Milliplex MAP human high sensitivity T cell assay (EMD Millipore) was used to quantify expression levels of 19 cytokines in plasma and CSF. The HSTCMAG-28K kit was designed to detect the following analytes: ITAC, GM-CSF, Fractalkine, IFN-gamma, TNF- α , MIP-3 α , IL-1b, IL-12, IL-13, IL-17A, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-21. In a 96-well plate according to the manufacturer instructions. Plates were read using a Luminex 100/200 system. An acquisition gate between 8,000 and 15,000 was set to discriminate against any double events and to ensure that only single microbeads were measured. About 50 beads per assay were individually collected for each well, which was used to generate the median fluorescence intensity (MFI) for a given

marker. MFIs were converted to concentrations (pg/mL) using the equation derived from standard range of each analyte using Milliplex Analyst Software. Each sample was measured in duplicate. Analyses were carried out in samples without being thawed and re-frozen.

Proviral Load

Quantitative PCR was performed as detailed described at Furtado *et al.* (2012) at Hemominas for plasmatic and liquoric sample. HTLV-1 proviral load was quantified by a real-time SYBR Green PCR method. SK110 (5'-CCCTACAATCCAACCAGCTCAG-3') and SK111 (5'-GTGGTGAAGCTGCCATCGGGTTTT-3') primers albumin gene (141 bp) was quantified in parallel, using the ALB-S (5'-GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGT-3') and ALB-AS (5'-AAACTCATGGGAGCTGCTGGTT-3') primers. The value for the HTLV-1 proviral load was reported as $[(\text{pol average copy number})/(\text{albumin average copy number}/2)]^{104}$ and expressed as the number of HTLV-1 copies/10⁴ cells.

Statistical analysis

To verify the distribution of the data was used D'agostino-pearson test. The descriptive analysis was based on the distribution of the same, being used mean and standard deviation for the data showed normal distribution and median and interquartile range when the data did not show normal distribution. For the characterization of the sample was also used absolute and relative frequency. Inferential analysis was also based on the distribution data. To Groups 1 and 2 comparisons were used independent T-test for data with normal distribution and the nonparametric Mann-Whitney test in data without normal distribution.

Analyzes were considered statistic significant if $p < 0.05$ and all procedures were performed in Graphpad Prism statistical package.

For prediction analysis, a Binary logistic regression with Forward LR Stepwise method was used. Our choice to the Forward LR Stepwise is based to the fact that, the best our knowledge, this is the first study that in the field and so we have no past research to tell us which variables to expect to be reliable predictors (FIELD, 2005).

RESULTS

Demographic data

48 individuals were included, 17 (35,41%) were male and 31 (64,58%) female. Twenty-three were from Group 1 (1:2 male:female ratio) and 25 from Group 2 (1:4 male:female ratio). Comparison between Groups 1 and 2 in number of years of education, ranging from 4 to 16 years, [$t(46) = 0.80$; $p = 0.42$; $es = 12:07$] and age [$t(46) = 0.47$; $p = 0.64$; $es = 00:18$], does not show significant differences between compared groups.

Proviral load

Proviral load levels were measured both in plasma and in cerebrospinal fluid. In the analysis comparing plasma between Groups 1 and 2, there was no statistically significant difference ($U = 201.50$, $p = 0.25$; $s = 0.22$) (Figure 1). The results of proviral load levels in cerebrospinal fluid were statistically significant different ($U = 132$, $p = 0.03$; $s = 0.19$). Group 2 (median = 449.00; IQ = 1342) showed higher values than Group 1 (median = 0; IQ = 382.00) (Figure 2).

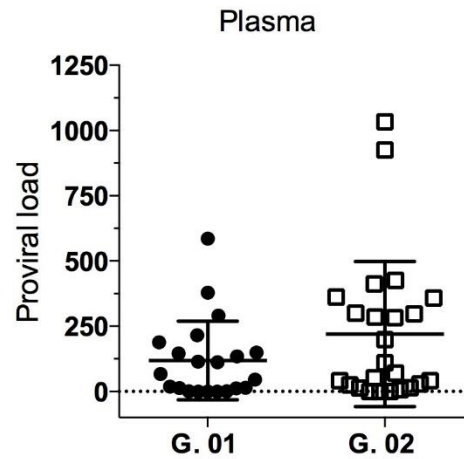


Figure 1. Plasmatic Proviral load.

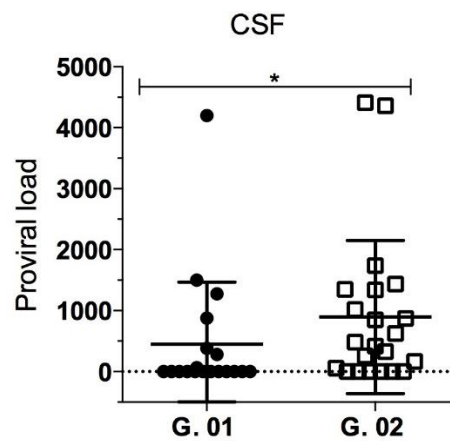


Figure 2. Liquoric proviral load. Group 2>G1, $p=0.03$.

Cytokine analysis in plasma

Cytokine levels were quantified by Milliplex Kit Human High Sensitivity Map Cell - 19SK through the Luminex 200. The cytokines were measured for 19 analytes: ITAC, GMCSF, FRACKTAL, IFN- gamma, IL -10, MIP3 -alpha, IL- 12p70, IL -13, IL -17A, IL- 1beta, IL -2, IL -21, IL -4, IL -23, IL -5, IL -6, IL -7, IL -8, TNF- alpha. In comparisons between groups, the results show a statistically significant difference only in ITAC seric levels (Figure 3) [$t(39) = 2.59$; $p = 0.01$; $es = 00:38$]

with higher expression observed in group 2 (mean = 11:52 ; sd = 4.10) than group 1 (mean = 8.42 , sd = 3.48). No other cytokines shown significant differences ($p > 0.05$) between these groups (Table 1, supplementary material).

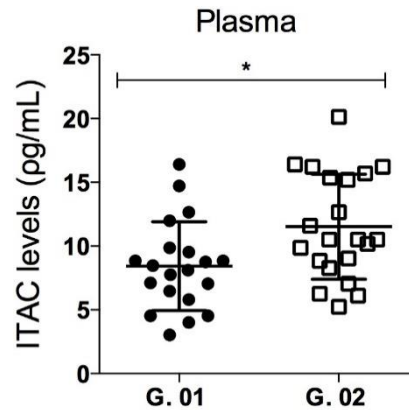


Figure 3. Plasmatic ITAC levels (in pg/mL) in group 1 and 2, $p=0.01$.

Cytokine analysis in cerebrospinal fluid

Cytokines were quantified using the Luminex 200, using the kit Milliplex Map Human High Sensitivity Cell - 19SK. The cytokines were measured 19: ITAC, GMCSF, FRACKTAL, IFN- gamma, IL -10, MIP3 -alpha, IL- 12p70, IL -13, IL -17A, IL- 1beta, IL -2, IL -21, IL- 4, IL -23, IL -5, IL -6, IL -7, IL -8 and TNF- alpha. Differences statistically significant were found in the liquoric levels of ITAC, IFN-gamma, IL -5, IL -8 and TNF -alpha in comparisons between groups 1 and 2 (Figure 4). Group 2 showed higher levels for all them than group 1. Regarding the other analytes measured no statistically significant difference was found ($p > 0.05$), these are shown in Table 2, supplementary material.

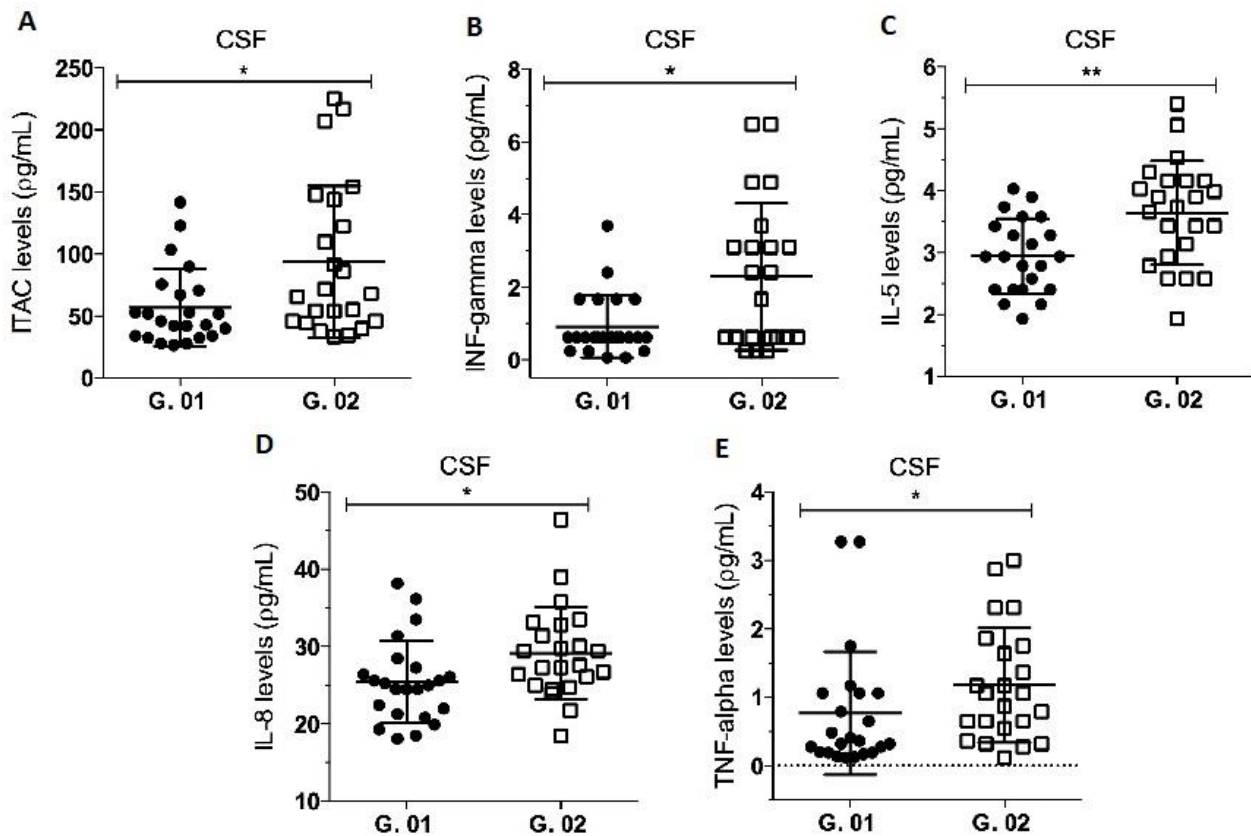


Figure 4. Cytokine levels in CSF. **A)** ITAC levels (pg/ml) ($U = 150.50$, $p = 0.01$; $s = 0:35$), group 2 (median = 67.74, CI = 97.93) > Group 1 (median = 45.87, CI = 36.86). **B)** INF-gamma levels (pg/ml) ($U=154$, $p = 0.010$; $s = 0:40$), Group 2 (median = 2.04, CI = 2.62) > Group 1 (median = 0.62, CI = 1.05). **C)** IL-5 (pg/mL) [$t(43) = 3.20$; $p = 0.002$; $s = 0:44$], group 2 (mean = 3.64, sd = 0.85) > Group 1 (mean = 2.95, SD = 0.60). **D)** IL -8 levels (pg/ml) ($U = 156.50$, $p = 0.016$; $s = 0:31$), Group 2 (median = 27.58, CI = 7.79) > Group 1 (median = 25.02, CI = 6:01). **E)** TNF -alpha levels (pg /ml) ($U = 160.5$, $p = 0:02$; $s = 0:23$), Group 2 (median = 6.1; CI = 1.20) > Group 1 (median = 0:36; CI = 0.87).

A binary logistic regression model with Forward LR Stepwise method was performed to ascertain the effects of Immunological measurements and proviral load, both in liquor or on the likelihood that participants have symptoms of neurological disease. The final binary logistic regression model with only liquoric

IFN γ variable was statistically significant $\chi^2(1) = 9.818$, $p = .002$. The model explained 29.0% (Nagelkerke R^2) of the variance of the symptoms of neurological disease and correctly classified 67.5% of cases. Increasing IFN γ in liquor values was associated with an increased likelihood of exhibiting neurological disease [$\beta = .779$ (SE= .330); Exp (β)=2.180; 95%CI for Exp (β) = 1.142-4.159].

In a ROC, using a cutoff of 1,67 for liquoric levels of Interferon-gamma, AUC sensitivity was 52.2% and specificity was 91.3% to identify neurological damage.

DISCUSSION

In this study we focused on comparison of cytokines released in long-term HTLV carriers in seric and liquor samples. This study has 64.58% of sample participants females while 35.41% were males. This higher frequency of HTLV-1 carriers in females is similar to the population ratios. Not only transmission rates, but also neurological complications are most common in women: HAM/TSP affects two-to-three times more women than men what is reflected in symptomatic group with four times more women than men (CARVALHO *et al.*, 2015). There is accounted for a greater efficiency of transmission during the sexual intercourse and to higher rates of blood transfusions (PROIETTI *et al.*, 2015; CHAVANCE *et al.*, 1989). In countries with high prevalence of HTLV-1, prevalences increases with age having a cumulative risk of new reinfections throughout the lifetime. In order to have a good comparison group, this present study had controled and matched age as well as the time of infection, so the two groups differ only for the presence of neurologic symptoms.

Differences of proviral load between the two groups were expected, in CSF symptomatic patients (Group 2) have higher load compared to asymptomatic (Group 1). The proviral load in patients with HAM/TSP has been reported as 10 to 100 times higher than in asymptomatic HTLV-1 seropositive individuals (Jeffery *et al.*, 1999; Nunes, 2008, Grassi *et al.*, 2011 and Vallinoto *et al.*, 2015). Therefore it is usually suggested that the proviral load is related to progression of neurologic disease and determine presence of HAM /TSP (Furtado *et al.*, 2012). In logistic regression model including proviral load as a possible predictive variable to progression to HAM, this factor does not predict to neurologic symptomatic disorder. Indirectly, a viral load interfere, since HTLV-1 mainly infects CD4⁺ cells, but also infects CD8⁺ T cells, dendritic cells, monocytes and B cells, resulting in persistent activation of lymphocytes and cytokine production (Souza *et al.*, 2016).

The crucial point for neuropathogenesis of HTLV seems to be the higher presence of some specific Treg cells, the Foxp3-CD4⁺CD25⁺CCR4⁺ T cells infiltrating the central nervous system (CNS). IFN- γ -producing Foxp3-CD4⁺CD25⁺CCR4⁺ T cells are not common in health individuals, but in HAM/TSP these cells are increased in CSF as part of immune dysregulation result of HTLV-1 infection (Araya *et al.*, 2011). These cells express INT-gamma, that is highly expressed (Hanon *et al.*, 2001; Montanheiro *et al.*, 2009) and stimulates a strong Th1 response. Among the 19 cytokines assayed in CSF samples from long-term infected groups, a statistically significant difference was observed between the two groups in the levels of ITAC/CCL11, IFN-gamma, IL-5, IL-8 and TNF-alpha. In CNS tissue, retroviral proteins activate not only Tregs,

but also astrocytes and microglia causing release of proinflammatory cytokines, such as IFN-gamma, IL-5 and TNF-alpha what seems to contribute to neurotoxicity. The mechanism and the cellular source of IL-8 is not well established in HTLV infection, but seems important to keep the clinical course progression and indeed it does not seem to respond to corticosteroids (BANGHAM, 2000). Th1-like response results in an increase of proinflammatory cytokines helping to understand chronic degenerative injuries of the spinal cord (reviewed in Ribas *et al.*, 2012). The cytotoxicity affects the formation of the myelin sheath resulting in lesions associated with clinical symptoms of HAM/TSP (Ribas e Melo, 2002).

Consistent with Th1 response, in this study was observed in seric samples an increase of ITAC/CXCL11 in plasma samples in Group 2 compared to individuals of Group 1. ITAC/CXCL11 is a chemotactic factor for activated T lymphocytes, induced by IFN-gamma. ITAC/CXCL11 usually are not found away from lymphocytes tissues in normal condition, but they have been identified in conditions evolving cell mediated immune-response. Nagasaka *e cols.* (2016) conducted a study with patients infected with Human Herpes Virus (HHV). Among all the plasmatic cytokines assayed, only CXCL11 levels were significantly higher in HHV group compared to non-HHV groups. In studies with hepatitis virus C the concentrations of ITAC/CXCL11, as well other CXCR3-related chemokines, ITAC/CXCL11 were associated with hepatic fibrosis stages (Zeremski *et al.*, 2008) and the persistence of inflammatory damage. ITAC/CXCL11 role in neuroinflammation is even less known than the other ligands to CXCR3, but it seems to attract activated lymphocytes into the CNS and determine the CNS viral

load in viral encephalitis (Muller M *et al.*, 2010). Besides of cautions about the unknown function, there are some expectations the control of CXCR3 ligands could be interesting to manage the neuroinflammation (Muller M *et al.*, 2010). Recently, a study observed HTLV has a preference for specific CD4⁺ cells (mostly Tregs) which in response to virus proteins express CXCR3 and interferon-gamma. In fact they observe a substantial amount of CD4⁺CD25⁺CCR4⁺CXCR3⁺ cell population in the CSF of HAM/TSP patients, besides of these cells were not the most frequent in their blood sample (Araya *et al.*, 2014). In this same study, they use, in cultured cells from HAM/TSP patients, a KM2760 treatment targeting CCR4 results in lower viral load, reduced expression of INF-gamma and decrease of CCR4⁺ cells in CSF (Araya *et al.*, 2014). Other studies also observed an increase of CXCL9 and CXCL10, what are the same family of CXCR3 ligands (Guerreiro *et al.*, 2006). So, CXCR3 and their ligands seems a potential interesting target for diagnosis or for treatment. However, all this is very new and more studies in animal models still necessary to have more impressions about how this can be helpful for HAM/TSP treatment. Besides of these concerns, their data is very compatible with our data, that in long-term infection observed increase of expression of CXCR3-ligand/ITAC in both CSF and seric and, interferon gamma and other proinflammatory cytokines in CSF.

Increased of expression of viral proteins and of production of inflammatory cytokines, such as TNF-alpha and IL-8 differ in a group with or without neurologic symptoms (Cabral *et al.*, 2012; Araujo and Silva, 2006; Journo and Mahieux, 2011; Castro-Costa *et al.*, 2009; Goncalves *et al.*, 2008; Nagai *et al.*, 2001; Best *et al.*, 2009; Gallo, 2011). Vallinoto *e cols.* (2015) observed an increase in

expression also of plasmatic TNF-alpha, IL-6, IL-10 and IL-8 in HAM/TSP group. Considering the cronicity of this infection, we do not observe much changes in plasmatic sample, but in cerebral fluid liquid where the infection damage still active in symptomatic Group with an intense production of proinflammatory cytokines suggesting the disease still active and possibly progressing despite of an installed treatment. Patientes with use corticosteroids what certainly modifies the imune response, but does not seems to control the proinflammatory mediation in CNS. These potential treatments focused on specific targets might improve the prognosis and the chances of success of treatment.

All potential predictive factors that seems related to the progression for HAM/TSP were included in a regression logistic model as a possible predictive variable, however only INF-g was confirmed as a predictive fator for neurologic complication. Usually, Interferon-gamma is increased in chronic active lesions and decreases with the inactive state; also features the ability to activate monocytes and macrophages, releasing immunoregulatory mediators of inflammatory processes (UMEHARA *e cols.*, 1994). INF-g role in resident cells in CNS is not well undestood, some initial studies points to that this cytokine may have different roles in brain and spinal cord and also an important regulatory role in brain-blood-barrier. There is doubts if INF-g is a neuroprotector or an indutor to neurodegeneration and demyelination in diseases more studied, such as multiple sclerosis. These controversies came from potential roles of interferon-gamma in glial cells and other resident cells in CNS. Their apparenly dual roles in brain tissue are explained as a fine-tunning modulator of the balance between inflammatory and anti-inflammatory conditions (Ottum *et al.*, 2016). About facts,

interferon-gamma is found an increased expression during and after an demyelination event and studies in vitro show its role as a inducator of production of CCL2, CXCL9, and CXCL10 (Salmaggi *et al.*, 2002). About induction of ITAC/CXCL11 or regulatory role over this molecule we could not find none study, but since the CXCL family is intrinsecally correlated in terms of actions it seems something to be done. More than an activation, a failure to donwmodulate the immune response in HAM/TSP individuals plays an important role in the pathogenesis of inflammatory diseases of the central nervous system such as multiple sclerosis (Santos *et al.*, 2006). So the knowlegde of interferon gamma modulatory factor seems a key factor not only for HTLV pathogenesis, but for immunopathogenesis of demyelinating inflammatory diseases (Ottum *et al.*, 2016).

Supplementary material

CYTOKINES LEVELS IN PLASMA - MEDIAN (IQ) OR MEAN (SD)*			
CYTOKINES	GROUP 01	GROUP 02	P. value (p<0.05)
GMCSF (pg/ml)	6.76 (19.13)	9.66 (18.14)	0.33
FRACKTAL (pg/ml)*	54.12 (30.74)	47.94 (15.66)	0.43
INF-gamma (pg/ml)*	5.13 (2.53)	5.01 (2.22)	0.87
IL-10 (pg/ml)	0.94 (0.90)	0.84 (0.77)	0.73
MIP-3alpha (pg/ml)	3.72 (1.31)	3.60 (0.73)	0.22
IL-12 p70 (pg/ml)	0.39 (1.31)	0.90 (2.06)	0.10
IL-13 (pg/ml)*	5.33 (3.24)	4.17 (2.44)	0.52
IL-17 A (pg/ml)	4.72 (3.86)	4.05 (2.43)	0.16
IL-1 beta (pg/ml)	0.51 (0.26)	0.58 (0.18)	0.16
IL-2 (pg/ml)	1.09 (1.32)	1.61 (1.01)	0.10
IL-21 (pg/ml)	0.70 (0.79)	0.79 (0.5)	1.00
IL-4 (pg/ml)	1.74 (2.34)	1.43 (1.53)	0.50
IL-23 (pg/ml)*	70.42 (39.84)	65.26 (24.22)	0.59
IL-5 (pg/ml)	0.50 (0.64)	0.46 (0.38)	0.88
IL-6 (pg/ml)*	0.66 (0.42)	0.94 (0.55)	0.06
IL-7 (pg/ml)	0.37 (1.75)	0.23 (0.88)	0.49
IL-8 (pg/ml)	2.09 (1.53)	1.82 (0.98)	0.60
TNF-alpha (pg/ml)	0.60 (1.03)	0.57 (0.48)	1.00

Table 1. Cytokine levels in groups 1 and 2 in plasma without statistically significant difference.

*Mean and standard deviation.

CYTOKINES LEVELS IN CSF - MEDIAN (IQ) OR MEAN (SD)			
CYTOKINES	GROUP 01	GROUP 02	P. value (* p<0.05)
GMCSF (pg/ml)	0.66 (0.28)	0.73 (0.30)	0.97
FRACKTAL (pg/ml)*	142.2 (31.59)	142.4 (31.48)	0.98
IL-10 (pg/ml)	4.43 (4.42)	5.12 (1.27)	0.36
MIP-3alpha (pg/ml)	31.76 (6.87)	29.45 (10.79)	0.43
IL-12 p70 (pg/ml)	0.81 (1.35)	1.09 (0.97)	0.06
IL-13 (pg/ml)*	4.36 (2.42)	4.77 (2.58)	0.58
IL-17 A (pg/ml)	0.19 (0.03)	0.19 (0.14)	0.41
IL-1 beta (pg/ml)*	0.28 (0.03)	0.291 (0.03)	0.28
IL-2 (pg/ml)*	1.06 (0.39)	1.25 (0.49)	0.15
IL-21 (pg/ml)*	3.02 (2.02)	3.32 (1.68)	0.59
IL-4 (pg/ml)	0.40 (0.30)	0.40 (0.24)	0.38
IL-23 (pg/ml)	25.19 (18.11)	37.75 (36.10)	0.10
IL-6 (pg/ml)*	4.99 (1.15)	4.86 (1.38)	0.74
IL-7 (pg/ml)*	7.00 (5.06)	8.18 (4.93)	0.43

Table 2. Cytokine levels in cerebrospinal fluid in Groups 1 and 2 with no statistically significant difference. *Mean and standard deviation.

Acknowledgements:

The authors would like to thank all members of Interdisciplinary HTLV Research Group for their collaboration. This study was supported by INCT-MM that is financed by the Brazilian agencies for research development: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

References:

Ana Flávia Endres Nunes. Doença neurológica pelo vírus linfotrópico de células T-humana HTLV: Achados clínico-funcionais e virológicos de pacientes do núcleo de medicina tropical, 2008.

Anna Bárbara de Freitas Carneiro Proietti [recurso eletrônico] – Cadernos hemoninas, HTLV, 6.ed. atual. e aum. – Belo Horizonte: FUNDAÇÃO HEMOMINAS, 2015.

Andrade RG, Ribeiro MA, Namen-Lopes MS, Silva SM, Basques FV, Ribas JG, Carneiro-Proietti AB, Martins ML. 2010. Evaluation of the use of real-time PCR for human T cell lymphotropic virus 1 and 2 as a confirmatory test in screening for blood donors. *Rev Soc Bras Med Trop* 43:111–115.

Araya N, Sato T, Ando H, Tomaru U, Yoshida M, Coler-Reilly A, Yagishita N, Yamauchi J, Hasegawa A, Kannagi M, Hasegawa Y, Takahashi K, Kunitomo Y,

Tanaka Y, Nakajima T, Nishioka K, Utsunomiya A, Jacobson S, and Yamano Y. HTLV-1 induces a Th1-like state in CD4+CCR4+ T cells. *J Clin Invest.* 2014;124(8):3431–3442. doi:10.1172/JCI75250.

Carvalho LD, Gadelha SR, Marin LJ, Brito-Melo GE, Martins CP, Fonseca FG, Barbosa-Stancioli EF. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2015 Nov-Dec;48(6):759-61. doi: 10.1590/0037-8682-0068-2015.

Castro-Costa CM, Araújo AQ, Barreto MM, Takayanagui OM, Sohler MP, da Silva EL, de Paula SM, Ishak R, Ribas JG, Roviroso LC, Carton H, Gotuzzo E, Hall WW, Montano S, Murphy EL, Oger J, Remondegui C, Taylor GP. Proposal for diagnostic criteria of tropical spastic paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy (TSP/HAM). *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2006 Oct;22(10):931-5.

Castro-Costa CM, Araújo Ade Q, Câmara CC, Ferreira AS, Santos Tde J, de Castro-Costa SB, Alcântara RN, Taylor GP. Pain in tropical spastic paraparesis/HTLV-1 associated myelopathy patients. *Arq Neuropsiquiatr.* 2009 Sep;67(3B):866-70.

Chavance M, Fréry N, Valette I, Monplaisir N, Schaffar L. Cohort effect of HTLV-1 seroprevalence in southern Japan. *The Lancet*, 1989.

Fujio Umehara, M.D., Shujo Izumo, M.D., Alicia T. Ronquillo, M. D., Kenji Matsumuro, M.D., Eiichi Sato, M.D., Mitsuhiro Osame, M.D. 1994. Cytokine expression. In spinal cord lesions in HTLV-1 associated myelopathy. *Journal of Neuropathology and experimental neurology.* Vol. 53: 72-77.

Furtado Mdos S, Andrade RG, Romanelli LC, Ribeiro MA, Ribas JG, Torres EB, Barbosa-Stancioli EF, Proietti AB, Martins ML. 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. *J Med Virol.* 2012;84(4):664-71.

Gessain A, Barin F, Vernant JC, Gout O, Maurs L, Calender A, de The G. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet.* 1985; 2:407–410.

Gessain A, Gout O. Chronic myelopathy associated with human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I). *Ann Intern Med* 1992; 117: 933-946.

Gonçalves DU, Proietti FA, Barbosa-Stancioli EF, Martins ML, Ribas JG, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Peruhype-Magalhães V, Carneiro-Proietti AB. 2008. HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) inflammatory network. *Inflamm Allergy Drug Targets* 7:98–107.

Goon PK, Hanon E, Igakura T, Tanaka Y, Weber JN, Taylor GP, Bangham CR. High frequencies of Th1-type CD4(+) T cells specific to HTLV-1 Env and Tax proteins in patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Blood.* 2002 May 1;99(9):3335-41

Grassi MF, Olavarria VN, Kruschewsky Rde A, Mascarenhas RE, Dourado I, Correia LC, de Castro-Costa CM, Galvão-Castro B. Human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) proviral load of HTLV-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) patients according to new diagnostic criteria of HAM/TSP. *J Med Virol.* 2011 Jul;83(7):1269-74. doi: 10.1002/jmv.22087

Gudo ES, Silva-Barbosa SD, Linhares-Lacerda L, Ribeiro-Alves M, Real SC, Bou-Habib DC, Savino W. HAM/TSP-derived HTLV-1-infected T cell lines promote morphological and functional changes in human astrocytes cell lines:

possible role in the enhanced T cells recruitment into Central Nervous System.

Virol J. 2015 Oct 12;12:165. doi: 10.1186/s12985-015-0398-x.

Guerreiro JB, Santos SB, Morgan DJ, Porto AF, Muniz AL, Ho JL, Teixeira AL Jr, Teixeira MM, Carvalho EM. Levels of serum chemokines discriminate clinical myelopathy associated with human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) disease from HTLV-1 carrier state. *Clin Exp Immunol.* 2006;145(2):296-301.

Hanon E, Goon P, Taylor GP *et al.* High production of IFN- γ but not IL-2 by human T-lymphotropic virus type I-Infected peripheral blood mononuclear cells. *Blood* 2001; 98:721–6.

Höllsberg P, Hafler DA. Pathogenesis of diseases induced by human lymphotropic virus type I infection. *N Engl J Med* 1993; 328: 1173-1182.

Jeffery KJ, Usuku K, Hall SE, Matsumoto W, Taylor GP, Procter J, Bunce M, Ogg GS, Welsh KI, Weber JN, Lloyd AL, Nowak MA, Nagai M, Kodama D, Izumo S, Osame M, Bangham CR. HLA alleles determine human T-lymphotropic virus-I (HTLV-I) proviral load and the risk of HTLV-I-associated myelopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 30;96(7):3848-53.

Lima CM, Santos S, Dourado A, Carvalho NB, Bittencourt V, Lessa MM, Siqueira I, Carvalho EM. Association of Sicca Syndrome with Proviral Load and Proinflammatory Cytokines in HTLV-1 Infection. *J Immunol Res.* 2016;8402059. doi: 10.1155/2016/8402059.

Liu X & Kumar A. Differential signaling mechanism for HIV-1 Nef-mediated production of IL-6 and IL-8 in human astrocytes. *Sci Rep.* 2015: 5; 9867 | DOI: 10.1038/srep09867 1

Liu X & Kumar A. Immunopathogenesis of Human T Cell Lymphotropic Virus Type I–Associated Neurologic Disease. *J Infect Dis.* 2002; 186 (Supplement 2): S187-S192. doi: 10.1086/344269

M. Nagai, K. Usuku, W. Matsumoto *e cols.*, “Analysis of HTLV-1 proviral load in 202 HAM/TSP patients and 243 asymptomatic HTLV-1 carriers: high proviral load strongly predisposes to HAM/TSP,” *Journal of NeuroVirology*, vol. 4, no. 6, pp. 586–593, 1998.

Mochizuki M, Watanabe T, Yamaguchi K, Yoshimura K, Nakashima S, Shirao M, Araki S, Takatsuki K, Mori S, Miyata N. Uveitis associated with human T-cell lymphotropic virus type I. *Am J Ophthalmol.* 1992;114:123–129.

Montanheiro PA1, Penalva de Oliveira AC, Smid J, Fukumori LM, Olah I, da S Duarte AJ, Casseb J. The elevated interferon gamma production is an important immunological marker in HAM/TSP pathogenesis. *Scand J Immunol.* 2009; 70(4):403-7.

Muller M, Carter S, Hofert MJ, Campbell IL. The chemokine receptor CXCR3 and its ligands CXCL9, CXCL10 and CXCL11 in neuroimmunity – a tale of conflict and conundrum. *Neuropathology and Applied Neurobiology.* 2010, 36, 368-387.

Murphy EL1, Hanchard B, Figueroa JP, Gibbs WN, Lofters WS, Campbell M, Goedert JJ, Blattner WA. Modelling the risk of adult T-cell leukemia/lymphoma in persons infected with human T-lymphotropic virus type I. *Int J Cancer.* 1989; 15;43(2):250-3.

Nagai M, Usuku K, Matsumoto W, Kodama D, Takenouchi N, Moritoyo T, Hashiguchi S, Ichinose M, Bangham CR, Izumo S, *e cols.* Analysis of HTLV-1 proviral load in 202 HAM/TSP patients and 243 asymptomatic HTLV-1 carriers:

High proviral load strongly predisposes to HAM/TSP. *J Neurovirol.* 1998; 4:586–593.

Nagai M1, Kubota R, Greten TF, Schneck JP, Leist TP, Jacobson S. Increased activated human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) Tax11-19-specific memory and effector CD8+ cells in patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: correlation with HTLV-1 provirus load. *J Infect Dis.* 2001.15; 183(2):197-205.

Nakamura T1. HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP): the role of HTLV-I-infected Th1 cells in the pathogenesis, and therapeutic strategy. *Folia Neuropathol.* 2009;47(2):182-94.

Ottum PA, Arellano G, Reyes LI, Iruretagoyena M, Naves R. Opposing Roles of Interferon-Gamma on Cells of the Central Nervous System in Autoimmune Neuroinflammation. *Front Immunol.* 2015; 6: 539.

Osame M, Usuku K, Izumo S, Ijichi N, Amitani H, Igata A, Matsumoto M, Tara M. HTLV-1 associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet.* 1986; 1:1031–1032.

Osame M, Matsumoto M, Usuku K, Izumo S, Ijichi N, Amitani H, Tara M, Igata A. Chronic progressive myelopathy associated with elevated antibodies to human T-lymphotropic virus type I and adult T-cell leukemia-like cells. *Ann Neurol* 1987; 21: 117-122.

Ribas JG, Melo GC. Human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-associated myelopathy. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2002 Jul-Aug;35(4):377-84.

Salmaggi A, Gelati M, Dufour A, Corsini E, Pagano S, Baccalini R, e cols. Expression and modulation of IFN-gamma-inducible chemokines (IP-10, Mig, and I-TAC) in human brain endothelium and astrocytes: possible relevance for the immune invasion of the central nervous system and the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Interferon Cytokine Res* (2002) 22(6):631–40. doi:10.1089/10799900260100114

Souza A, Santos S, Carvalho LP, Grassi MF, Carvalho EM. Impairment of the humoral and CD4⁺ T cell responses in HTLV-1-infected individuals immunized with tetanus toxoid. *Hum Immunol*. 2016 Jun 6. pii: S0198-8859(16)30112-4. doi: 10.1016/j.humimm.2016.06.003

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*. 2015 Jul 1;61(1):49-56. doi: 10.1093/cid/civ229.

Tendler CL, Greenberg SJ, Burton JD, e cols. Cytokine induction in HTLV-1-associated myelopathy and adult T-cell leukemia: alternate molecular mechanisms underlying retroviral pathogenesis. *J Cell Biochem* 1991;46: 302–11.

Uchiyama T, Yodoi J, Sagawa K, Takatsuki K, Uchino H. Adult T-cell leukemia: Clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood*. 1977; 50:481–492.

Vallinoto AC, Santana BB, Sá KS, Ferreira TC, Sousa RC, Azevedo VN, Feitosa RN, Machado LF, Ishak MO, Ishak R. HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical

Spastic Paraparesis Is Not Associated with SNP rs12979860 of the IL-28B Gene. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:804167. doi: 10.1155/2015/804167.

Yamano Y, Nagai M, Brennan M, Mora CA, Soldan SS, Tomaru U, Takenouchi N, Izumo S, Osame M, Jacobson S (2002). Correlation of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) mRNA with proviral DNA load, virus-specific CD8(+) T cells, and disease severity in HTLV-1-associated myelopathy (HAM/TSP). *Blood* 99: 88–94.

Zaninovic V1. On the etiology of tropical spastic paraparesis and human T-cell lymphotropic virus-I-associated myelopathy. *Int J Infect Dis.* 1999;3(3):168-76.

Zeremski M, Petrovic LM, Chiriboga L, *et al.* Intrahepatic levels of CXCR3-associated chemokines correlate with liver inflammation and fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2008; 48:1440–50

4) DISCUSSÃO

4.1 Amostra

A coleta foi realizada por amostragem de conveniência na população que atende à coorte do GIPH, contudo a frequência de homens e mulheres espelha o mais frequentemente encontrado na literatura em relação aos infectados por HTLV e HAM/TSP. Entende-se que nos locais onde a infecção pelo HTLV-1 atinge índices elevados, observa-se que a soroprevalência está muito relacionada ao gênero e à idade. Ou seja, aumenta com a idade e apresenta-se mais elevada no gênero feminino, o que condiz com o presente estudo. Acredita-se que o aumento em relação à idade pode estar relacionado ao risco cumulativo de novas infecções ao longo do período de vida. No presente estudo, não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos 1 e 2 (sem comprometimento neurológico; com comprometimento neurológico, respectivamente) em relação a idade uma vez que os grupos foram pareados quanto à idade entre os grupos, considerando que essa é uma variável importante na progressão da doença.

Caracterizando os dois grupos, de acordo com critérios determinados em Castro costa e cols. (2006), dos 23 indivíduos do grupo 1, 21 são assintomáticos e 2 sintomáticos sem HAM (com sinais da infecção pelo HTLV-1, mas que ainda não são característicos da HAM/TSP). Pacientes sintomáticos e portadores de HAM/TSP apresentam comprometimento neurológico, o que leva aos sintomas característicos da evolução da doença, sendo assim o grupo 2 (com comprometimento neurológico) é formado por pacientes sintomáticos e portadores de HAM/TSP e grupo 1 (sem comprometimento neurológico) composto por pacientes assintomáticos e apenas 2 sintomáticos.

4.2 Citocinas plasmáticas

O presente estudo demonstrou aumento da quimiocina ITAC, também descrita como CXCL11, faz parte de uma família que atua sobre as células T estimulando a resposta Th1 (ABBAS, 2008) em amostras de plasma em indivíduos do grupo 2, em comparação com indivíduos do grupo 1. ITAC é um fator quimiotático para

linfócitos T ativados, induzido por INF-gama. Nagasaka e cols. (2016) realizou um estudo com pacientes infectados pelo Vírus Herpes Humano (HHV), que está associada com sintomas respiratórios, gastrointestinais, e as complicações neurológicas; tais como a convulsão febril e encefalite aguda. Dentre todas as citocinas dosadas, em plasma, no estudo relatado, apenas os níveis de CXCL11 foram significativamente maiores no grupo de HHV comparado aos grupos não-HHV. CXCL11 se liga especificamente ao receptor acoplado a proteína G, o receptor 3 CXC, que é altamente expresso em células T ativadas, células T de memória, e células NK. Uma vez que o HHV infecta as células T CD4⁺ ativadas na qual a CXCL11 e CXCL10 estão ligados podem expandir infecção por HHV e promover as manifestações clínicas da infecção. CXCL11 é induzida em um amplo espectro de doenças neuroimunes que afetam o sistema nervoso central, tais como a meningite bacteriana e viral, esclerose múltipla, e doença de Alzheimer (NAGASAKA e cols., 2016).

O HTLV-1 infecta predominantemente células T CD4⁺, mas também infecta células T CD8⁺, células dendríticas, monócitos e células B, resultando na proliferação espontânea de linfócitos e a produção de citocinas, na ausência de estímulos exógenos, tal como o IFN-gama, TNF-alfa e IL-6. Estudos demonstraram que portadores de HTLV-1 têm uma maior produção de citocinas em comparação com sujeitos não infectados (SOUZA e cols., 2016). Portanto esperava-se o aumento de citocinas como INF-gama, TNF-alfa e IL-6, por se tratar de citocinas chave no papel pro-inflamatório. Vallinoto e cols. (2015) encontrou correlação positiva, em amostras de plasma, entre TNF-alfa, IL-6, IL-10 e IL-8 no grupo de HAM/TSP. Estes resultados são uma consequência potencial das respostas imunes pró-inflamatórias tipicamente observadas neste grupo de pacientes.

4.3 Citocinas liquóricas

Dentre as citocinas dosadas nas amostras de líquido foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos com e sem sintomas neurológicos nos níveis de ITAC, INF-gama, IL-5, IL-8 e TNF-alfa. De

acordo com Moore (1989) o TNF-alfa e o INF-gama ajudam a entender as lesões crônico-degenerativas da medula. O TNF-alfa aumentado no líquido e no soro, revela-se citotóxico para os oligodendrócitos, células neuronais do sistema nervoso central responsáveis pela formação da bainha de mielina, esta citotoxicidade prejudica a formação da bainha de mielina das células neuronais o que leva a progressão dos sintomas clínicos que caracterizam HAM/TSP. Tratando-se de INF-gama, pode-se relacionar seu aumento devido ao fato de ele encontrar-se elevado nas lesões crônico-ativas e diminuído nas inativas; apresenta também a capacidade de ativar monócitos e macrófagos, liberando imuno-mediadores dos processos inflamatórios.

Outro dado coerente com os resultados deste estudo é o fato de TNF-alfa ser uma citocina com atividade pro-inflamatória significativa e desempenhar papel central na coordenação da resposta inflamatória. Células T liberam espontaneamente citocinas pro-inflamatórias neurotóxicas, tais como IFN-gama e TNF-alfa e elevados níveis destas citocinas foram demonstradas no soro e no líquido levam a lesões medulares em pacientes com HAM / TSP (GOON e *co/s.*, 2002).

Em relação ao aumento de IL-5, Lima e *co/s.* (2016) realizaram a dosagem desta citocina em plasma de pacientes com HTLV-1 com coinfeção por helmintos, porém não foi encontrada diferença significativa. Não observamos diferença significativa no plasma, mas houve diferenças significativas no líquido. A exposição a helmintos e bactérias extracelulares induz principalmente o desenvolvimento de resposta Th2, levando especialmente à produção das citocinas IL-4, IL-5, e IL-10, que atuam na ativação das células B, promovendo a produção de anticorpos (STARLING, 2010). Contudo os pacientes não foram avaliados quanto ao potencial de coinfeção com outros parasitas. Quando se trata de IL-8, observamos aumento da expressão deste analito no presente trabalho, o que corrobora com Gudo e *co/s.* (2015) que obteve dosagens elevadas tanto de IL-8, quanto de TNF-alfa em células T infectadas pelo vírus do HTLV-1.

Tratando da Escala Expandida do Estado de Incapacidade de Kurtzke, no trabalho de Osoegawa e *co/s.* (2005) entre as citocinas elevadas na esclerose múltipla, apenas IL-8 mostrou uma correlação positiva com a escala.

O principal dado encontrado no presente trabalho, em relação as citocinas estudadas, foi a expressão elevada de ITAC, em amostras de plasma e líquido, no grupo com comprometimento neurológico em relação ao grupo sem comprometimento neurológico. ITAC é encontrada em estágios pro-inflamatórios e é quimioatrator de monócitos e linfócitos provenientes da resposta Th1 (KAO e *cols.*, 2003). ITAC/CXCL11 é o fator quimiotático de linfócitos T ativados, induzido por IFN-g, se liga especificamente ao receptor acoplado a proteína G, o receptor 3 CXC, que é altamente expresso em células T activadas, células T de memória, e células NK (NAGASAKA e *co/s.*, 2016).

Em estudos com o vírus da hepatite C, as concentrações de ITAC / CXCL11, bem como outras quimioquinas relacionadas com o receptor CXCR3, foram associadas com fases da fibrose hepática (ZEREMSKI e *co/s.*, 2008) e a persistência do dano inflamatório. O papel de ITAC em neuroinflamação é muito menos conhecido do que os outros ligandos para CXCR3, mas parece atrair linfócitos activados no SNC e determinar a carga viral no SNC (MULLER e *co/s.*, 2010).

4.4 Carga proviral

A carga proviral tem sido considerada um possível marcador de evolução da doença, sendo bem estabelecido que a infecção por HTLV-1 está associada com uma alta carga proviral no sangue periférico e que em pacientes portadores de HAM/TSP a carga proviral é ainda mais elevada no líquido em relação ao plasma. Este dado corrobora com nossos resultados, que observaram carga proviral elevada no líquido em relação ao plasma no grupo sintomático. Outro resultado importante foi a diferença da carga proviral entre os dois grupos no líquido, sendo maior no grupo com comprometimento neurológico (grupo 2) em relação ao grupo sem comprometimento neurológico (grupo 1). Grassi e *co/s.* (2011),

compararam 4 grupos, onde a média de carga proviral de HTLV -1, em plasma, foi maior em HAM possível, HAM provável e HAM definida, quando comparados aos indivíduos assintomáticos. Dessa forma associado à inespecificidade dos sinais e sintomas encontrados, mais uma vez mostra-se adequada a nossa classificação de grupos apenas conforme a presença ou não de sintomas neurológicos.

Nunes *et al.* (2008) também observaram que a carga proviral foi maior em portadores sintomáticos comparado a portadores assintomáticos. E no estudo de Vallinoto *et al.* (2015) em que a carga proviral foi significativamente maior em pacientes com HAM/TSP do que em indivíduos assintomáticos.

Dessa forma parece-nos bastante consistente e esperado que haja uma discrepância entre a carga viral plasmática ou líquórica dos pacientes com ou sem sintomas neurológicos. Sugere-se que a carga proviral pode ser avaliada como um possível fator preditivo para o desenvolvimento e evolução da infecção assintomática para sintomática e possível desenvolvimento de HAM/TSP.

5) CONCLUSÕES

A análise de carga viral e citocinas líquóricas e plasmáticas em estudo caso-controle entre pacientes portadores de HTLV-1 que evoluíram ou não para complicações e apresentação neurológica mostra alguns fatores consistentes e promissores. Na comparação de grupos, a carga viral parece de fato ser um fator de diferenciação entre os grupos, assim como as citocinas líquóricas em especial da família CXCL9-11 que precisam ser amplamente investigadas. Estudos subsequentes de busca de fatores de predição da evolução para complicações neurológicas precisam ser realizados para que sejam melhor conhecidas as razões da evolução para quadro grave e irreversível.

6) LIMITAÇÕES

Dentre as limitações do presente estudo a principal é referente ao tamanho da amostra, que ao se apresentar em número reduzido, permite considerar os resultados encontrados apenas para os grupos estudados.

Fatores como idade, gênero, IMC, comorbidades, medicamentos utilizados, tempo de infecção, que não foram totalmente controlados, são também fatores de limitação do estudo, pelo fato de poderem influenciar no perfil inflamatório apresentado pelos pacientes.

7) REFERÊNCIAS

ABBAS et al. *Imunologia Celular E Molecular*. Elsevier Brasil, 2005.

ARAÚJO, Q. C. Abelardo; SILVA, T. T. Marcus. The HTLV-1 neurological complex. *Lancet Neurol*. 2006 Dec;5(12):1068-76.

CARTIER et al. Clinical and neuropathological study of six patients with spastic paraparesis associated with HTLV-I: an axomyelinic degeneration of the central nervous system. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 56: 403-413, 1997

CARVALHO, L. D. et al . Are lipid disorders involved in the predominance of human T-lymphotropic virus-1 infections in women?. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Uberaba , v. 48, n. 6, p. 759-761, Dec. 2015 .

CATRO-COSTA et al. Proposal for diagnostic criteria of tropical spastic paraparesis/ HTLV-I-associated myelopathy (TSP/HAM). *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2006;22:931-5.

CATALAN-SOARES et al. Heterogeneous geographic distribution of human T-cell lymphotropic viruses I and II (HTLV-I/II): serological screening prevalence rates in blood donors from large urban areas in Brazil. *Cad de Saúde Pública* 21: 926-931

CHAVANCE, M. et al. Sex ratio of human T-lymphotropic virus type I infection and blood transfusion. *Am J Epidemiol*. 1990 Mar;131(3):395-9.

COELHO-DOS-REIS, J. G. A. et al. Immunological Profile of HTLV-1-Infected Patients Associated with Infectious or Autoimmune Dermatological Disorders. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 7, n. 7, jul. 2013.

COOKE et al. Infection and autoimmunity: are we winning the war, only to lose the peace? *Trends Parasitol.* 2004;20:316-21

DOMINGUES et al. Human T lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in Sao Paulo, Brazil. *Clin Infect Dis* 1995; 20:1540-1542

FERREIRA JR, O.C. Human T cell leukemia viruses: epidemiology, biology, and pathogenesis. *Blood Reviews*, v. 11, p. 91-104, 1997.

FIGUEIREDO, A. S.; ARAUJO JUNIOR, J. P. Vírus da leucemia felina: análise da classificação da infecção, das técnicas de diagnóstico e da eficácia da vacinação com o emprego de técnicas sensíveis de detecção viral. *Cienc. Rural*, Santa Maria , v. 41, n. 11, p. 1952-1959, Nov. 2011

FOX J. M.; MUTALIMA N.; MOLYNEUX E., et al. Seroprevalence of HTLV-1 and HTLV-2 amongst mothers and children in Malawi within the context of a systematic review and meta-analysis of HTLV seroprevalence in Africa. *Tropical Medicine & International Health.* 2016;21(3):312-324. doi:10.1111/tmi.12659.

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

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

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

GONÇAVES et al. Epidemiology, Treatment, and Prevention of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1-Associated Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*. 2010;23(3):577-589. doi:10.1128/CMR.00063-09.

GOTUZZO, et al. Frequent HTLV-1 infection in the offspring of Peruvian women with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis or strongyloidiasis. *Rev Panam Salud Publica*. 2007;22:223-30.

GRASSI M. F., et al. Human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) proviral load of HTLV-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) patients according to new diagnostic criteria of HAM/TSP. *J Med Virol*. Volume 83, pages 1269-1274, 2011.

GUDO et al. HAM/TSP-derived HTLV-1-infected T cell lines promote morphological and functional changes in human astrocytes cell lines: 53 possible role in the enhanced T cells recruitment into Central Nervous System. *Virol J*. 2015.

KAO et al. Elevated serum levels of the CXCR3 chemokine ITAC are associated with the development of transplant coronary artery disease. *Circulation*. 2003 Apr 22;107(15):1958-61.

LIMA et al. Association of Sicca Syndrome with Proviral Load and Proinflammatory Cytokines in HTLV-1 Infection. *Journal of Immunology Research* Volume 2016 (2016), Article ID 8402059, 6 pages.

MILLS K. H.; McGUIRK P. Antigen-specific regulatory T cells-their induction and role in infection. *Semin Immunol.* 2004;16:107-17.

MOORE et al. Tropical spastic paraparesis: a model of virus-induced, cytotoxic T-cell-mediated demyelination? *Annals of Neurology* 26: 523-530, 1989.

MOREIRA, C. F. C. Tese de doutorado. Aconselhamento clínico de indivíduos infectados pelo HTLV. Instituto de ciências biológicas. Belo Horizonte, 2010.

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

NAGASAKA M., et al. Comprehensive analysis of serum cytokines/chemokines in febrile children with primary human herpes virus-6B infection. *Japanese Society of Chemotherapy and The Japanese Association for Infectious Diseases.* V. 22, P. 593–598, 2016.

NOOKALA A. R., KUMAR A. Molecular mechanisms involved in HIV-1 Tat-mediated induction of IL-6 and IL-8 in astrocytes. *Journal of Neuroinflammation.* 2014;11:214. doi:10.1186/s12974-014-0214-3.

NUNES, Ana Flávia. Tese de doutorado. Doença neurológica pelo vírus linfotrópico de células T-humana HTLV: Achados clínico-funcionais e virológicos de pacientes do núcleo de medicina tropical, 2008.

OSOEGAWA et al. Platelet-activating factor receptor gene polymorphism in Japanese patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 161(1-2): 195-198, 2005.

POIEZ, B. J. *et al.* Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A.* 1980 Dec; 77(12): 7415–7419.

PROIETTI, A. B. F. C. *et al.* HTLV in the Americas: challenges and perspectives. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health* 19(1), 2006

ROMÁN GC, OSAME M. Identity of HTLV-I-associated tropical spastic paraparesis and HTLV-I-associated myelopathy. *Lancet.* 1988;1:651.

ROMANELLI, L. C. F.; CARAMELLI, P.; PROIETTI, A. B. de F. C. O vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1 (HTLV-1): Quando suspeitar da infecção?. *Rev. Assoc. Med. Bras., São Paulo,* v. 56, n. 3, p. 340-347, 2010 .

ROUCOUX et al. A Prospective Study of Sexual Transmission of Human T Lymphotropic Virus (HTLV) I and HTLV-II. *The Journal of Infectious Disease* 2005 191: 1490-1497.

SANTOS, B. S., *et al.* Exacerbated inflammatory cellular immune response characteristics of HAM/TSP is observed in a large proportion of HTLV-I asymptomatic carriers. *BMC Infectious Diseases.* V. 4, 2004.

SANTOS, B. S., *et al.* Immunological and Viral Features in Patients with overactive Bladder Associated with Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 Infection. *Journal of Medical Virology*, v. 84, p. 1809-1817, 2013.

SANTOS, E. L. *et al.* Caracterização molecular do HTLV-1/2 em doadores de sangue em Belém, Estado do Pará: primeira descrição do subtipo HTLV-2b na região Amazônica. *Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 42, n. 3, p. 271-276, 2009.

SANTOS, J. I. *et al.* Seroprevalence of HIV, HTLV- I/II and other perinatally-transmitted pathogens in Salvador, Bahia. *Rev Inst Med Trop*, v. 37, n. 4. p. 343-8, 1995. 23.

SANTOS, T. J. T. *et al.* Western blot seroindeterminate individuals for human T-lymphotropic virus I/II (HTLV-I/II) in Fortaleza (Brazil): a serological and molecular diagnostic and epidemiological approach. *Braz J Infect Dis*, v. 7, n. 3, p. 202-9, 2003.

SIELING P. A.; MODLIN R. L. Cytokine patterns at the site of mycobacterial infection. *Immunobiology* 191:378-387, 1994.

SOUZA. Diminuição da resposta imune ao toxoide tetânico em indivíduos infectados pelo htlv-1. Tese de doutorado. Programa de pós-graduação em ciências da saúde, Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Medicina da Bahia, 2012.

SOUZA, A., *et al.* Influência do HTLV-1 na incidência, resposta imune e manifestações clínicas de outras doenças infecciosas. *Gazeta médica da Bahia*, n 1 (143), p. 61-67, 2009.

SOUZA A., et al. Impairment of the humoral and CD4+ T cell responses in HTLV-1-infected individuals immunized with tetanus toxoid. *Human Immunology*, Volume 77, Issue 8, Pages 674-681, 2016.

SOUZA, L. A., *et al.* Molecular characterization of HTLV-1 among patients with tropical spastic paraparesis/HTLV-1 associated myelopathy in Belém, Pará. *Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 39, n. 5, p. 504-506, 2006.

STARLING, A. L. B. Dissertação de mestrado. 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. Faculdade de Medicina da UFMG. Belo Horizonte, 2010.

UMEHARA M. D., *et al.* Cytokine Expression in the Spinal Cord Lesions in HTLV-1-associated Myelopathy. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. Volume 53, Issue 1, 1994.

VALLINOTO et al. HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis Is Not Associated with SNP rs12979860 of the IL-28B Gene. *Mediators of Inflammation*. Volume 2015 (2015), Article ID 804167, 7 pages.

ZEREMSKI et al. Intrahepatic levels of CXCR3-associated chemokines correlate with liver inflammation and fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2008 Nov;48(5):1440-50.

8) ANEXOS

Ata de defesa



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DA ALUNA NATHÁLIA CRISTINA MOREIRA PEREIRA

Realizou-se, no dia 21 de novembro de 2016, às 14:00 horas, sala 526, 5º andar da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada *Avaliação de perfil inflamatório e carga proviral em portadores de HTLV-1 como fator de risco para a evolução de HAM/TSP*, apresentada por **NATHÁLIA CRISTINA MOREIRA PEREIRA**, número de registro **2014719009**, graduada no curso de BIOMEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em MEDICINA MOLECULAR, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Debora Marques de Miranda - Orientador (UFMG), Prof(a). Maicon Rodrigues Albuquerque (UFMG), Prof(a). Daniela Valadão Freitas Rosa – Coorientador (UFMG), Prof(a). Maria Aparecida Camargos Bicalho (UFMG).

A Comissão considerou a dissertação:

Aprovada

Reprovada

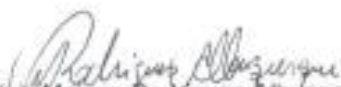
Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.
Belo Horizonte, 21 de novembro de 2016.



Prof(a). Debora Marques de Miranda (Doutor)



Prof(a). Daniela Valadão Freitas Rosa (Doutora)



Prof(a). Maicon Rodrigues Albuquerque (Doutor)



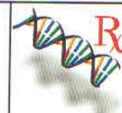
Prof(a). Maria Aparecida Camargos Bicalho (Doutor)

Folha de aprovação

VIA DO ALUNO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR



FOLHA DE APROVAÇÃO

Avaliação de perfil inflamatório e carga proviral em portadores de HTLV-1 como fator de risco para a evolução de HAM/TSP.

NATHÁLIA CRISTINA MOREIRA PEREIRA

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MEDICINA MOLECULAR, como requisito para obtenção do grau de Mestre em MEDICINA MOLECULAR, área de concentração MEDICINA MOLECULAR.

Aprovada em 21 de novembro de 2016, pela banca constituída pelos membros:

Prof(a). Debora Marques de Miranda - Orientador
UFMG

Prof(a). Daniela Valadão Freitas Rosa - Coorientador
UFMG

Prof(a). Marcon Rodrigues Albuquerque
UFMG
Prof(a). Maria Aparecida Camargos Bicalho
UFMG

Belo Horizonte, 21 de novembro de 2016.