



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – ICS
FACULDADE DE MEDICINA

ALLEF WILLIAM FRANÇA DE OLIVEIRA
MICHEL DOUGLAS SILVA DE SOUSA

**CORRELAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE TBET, GATA3 E FOXP3 COM O
DESENVOLVIMENTO DE MIELOPATIA EM PACIENTES PORTADORES DO
HTLV-1.**

BELÉM
2019

ALLEF WILLIAM FRANÇA DE OLIVEIRA
MICHEL DOUGLAS SILVA DE SOUSA

**CORRELAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE TBET, GATA3 E FOXP3 COM O
DESENVOLVIMENTO DE MIELOPATIA EM PACIENTES PORTADORES DO
HTLV-1.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Medicina da Universidade Federal do
Pará, como requisito parcial à obtenção do Título de
Bacharel em Medicina.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Hellen Thais Fuzii.

BELÉM
2019

ALLEF WILLIAM FRANÇA DE OLIVEIRA
MICHEL DOUGLAS SILVA DE SOUSA

**CORRELAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE TBET, GATA3 E FOXP3 COM O
DESENVOLVIMENTO DE MIELOPATIA EM PACIENTES PORTADORES DO
HTLV-1.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Medicina da Universidade Federal do
Pará, como requisito parcial à obtenção do Título de
Bacharel em Medicina.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Hellen Thais Fuzii.

BANCA EXAMINADORA:

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Hellen Thais Fuzii.
Núcleo de Medicina Tropical – NMT/UFPA.

Prof.^a Dr.^a Esther Iris Christina Freifrau von Ledebur.
Instituto de Ciências Biológicas – ICB/UFPA.

Prof.^a Dr.^a Luisa Caricio Martins.
Núcleo de Medicina Tropical – NMT/UFPA.

Aprovado em: ____/____/____

Conceito:

BELÉM
2019

AGRADECIMENTOS

A construção desse trabalho provém de um esforço múltiplo por diversos agentes envolvidos. A estes, refiro estas palavras de gratidão pelas suas contribuições ao desfecho desse trabalho.

Agradeço, sobretudo, à minha orientadora Prof.^a Dr.^a Hellen Thais Fuzii, “mãe científica”, pois são escassas as palavras que conceituam o que sinto e aprendi nesses anos de convivência. Com ela, pude perceber que, por mais que os obstáculos da pesquisa científica possam ser cruéis, a satisfação que a ciência pode proporcionar àqueles que se doam por ela, é indescritivelmente positiva.

Profunda gratidão à minha esposa Bruna e aos meus filhos Tássio e Thales. Sendo, sempre, o maior incentivo, me estimulam ao alcance dos melhores resultados em todas as áreas da minha vida. Nos seguramos e enfrentamos, juntos, nossos momentos mais obscuros. Que estejamos unidos, também, quando houver luz! E ela sempre virá.

À minha avó Aldenora e meus pais Antônio e Alcilene, pelas doações de si mesmo para a composição de quem eu sou. Seu plantio, durante a maior parte da minha existência, frutificou e permitiu que, hoje, eu pudesse usufruir de um doce sabor do fruto colhido.

Aos meus amigos, dos mais distantes aos mais próximos, com os quais vivi bons momentos durante esta trajetória. Aos amigos do laboratório de Imunopatologia, sobretudo, pela companhia, diversão e esforços essenciais ao desenvolvimento dessa e de outras pesquisas. À Jéssica, ao Eduardo, à Prof.^a Esther, ao Prof. Gilberto, à Elisa, Roberto, Carolina e outros, que não menciono aqui. Obrigado pela presença de todos durante esses momentos.

E, tão significativa quanto, profunda gratidão aos pacientes que, frente a um momento de dificuldade em suas vidas, se propuseram a participar dessa pesquisa e permitiram, assim, o aprimoramento da ciência sobre doenças que, muitas vezes, são incapacitantes aos seus acometidos. Que nossos esforços estejam sempre à altura do vosso.

Obrigado!

Allef William França de Oliveira.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da sabedoria, pois com toda sua magnitude tornou tudo possível.

À Família que me apoiou em todos os momentos, principalmente nos momentos mais difíceis e que entendeu os momentos de ausência.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Hellen Thais Fuzii que me proporcionou conhecimento e foi de grande importância na minha formação acadêmica, pois sem ela, este trabalho não teria sido possível.

Aos Pacientes que aceitaram contribuir com a pesquisa. Eles são a base para a geração do conhecimento e amadurecimento. Fica aqui a minha gratidão e respeito.

Obrigado!

Michel Douglas Silva de Sousa.

*“Porque não há nada oculto que não venha a ser
revelado, e nada escondido que não venha a ser
conhecido e trazido à luz.”*

Evangelho segundo o apóstolo Lucas, Capítulo 8:17

RESUMO

O vírus linfotrófico de células T humano do tipo 1 (HTLV-1) é um vírus endêmico em nossa região. Está associado ao desenvolvimento de diversas doenças e sintomas incapacitantes, a exemplo da Mielopatia Associada ao HTLV-1 (PET/MAH). A expressão gênica dos fatores de transcrição TBET, GATA3 e FOXP3, no desenvolvimento da mielopatia, aparenta ser determinante ao curso da doença. Este estudo, de caráter observacional, analítico e transversal, visou quantificar a expressão gênica desses fatores de transcrição nos pacientes, portadores do HTLV-1, que manifestaram mielopatia, em seus graus de evolução clínica. Participaram, desta pesquisa, pacientes, maiores de dezoito anos, diagnosticados com HTLV-1, atendidos e acompanhados no Laboratório de Clínica e Epidemiologia de Doenças Endêmicas, do Núcleo de Medicina Tropical da UFPA. Foram coletados dados clínicos e amostras de sangue dos pacientes para posterior isolamento e quantificação do RNA para síntese de cDNA e, em seguida, quantificar a expressão gênica de β -Actina, GAPDH, TBET, GATA3 e FOXP3. Os resultados mostraram 76 pacientes, sendo 39,47 % pacientes com PET/MAH, 35,53% Assintomáticos e 25% Monossintomáticos/Oligossintomáticos (MOS). Na correlação dos fatores de transcrição com as formas clínicas, houve maior expressão de TBET nos pacientes com PET/MAH, sem significância estatística ($p=0.4282$); os fatores GATA3 e FOXP3 se expressaram mais nos assintomáticos, com predomínio de GATA3 ($P=0.0007$). O GATA3 quando relacionado com o FOXP3, apresentou predomínio significativo nos indivíduos assintomáticos ($p=0,0019$) e MOS ($p=0,0209$). Conclui-se que o fator GATA3 parece ser determinante a um curso clínico diferente na evolução da mielopatia associada ao HTLV-1 (forma incompleta).

Palavras-chave: HTLV-1; PET/MAH; Fatores de transcrição.

ABSTRACT

Human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) is an endemic virus in our region. It is associated with the development of several disabling diseases and symptoms, such as HTLV-1 Associated Myelopathy (HAM/ TSP). The gene expression of the transcription factors TBET, GATA3 and FOXP3, in the development of this myelopathy, seems to be determinant to the course of the disease. This observational, analytical and cross-sectional study aimed to quantify the gene expression of these transcription factors in the steps of myelopathy manifestation, in patients with HTLV-1. Patients older than eighteen years old, diagnosed with HTLV-1, attended and followed up at the Laboratory of Clinical and Epidemiology of Endemic Diseases of the UFPA Tropical Medicine Center, participated in this study. Clinical data and blood samples were collected from patients for further isolation and quantification of RNA for cDNA synthesis and then quantification of the gene expression of β -Actin, GAPDH, TBET, GATA3 and FOXP3. The results showed 76 patients, 39.47% with HAM/ TSP, 35.53% Asymptomatic and 25% were Monosymptomatic/Oligosymptomatic patients (MOS). In the correlation of transcription factors with clinical forms, there was a higher expression of TBET in patients with HAM/ TSP, without statistical significance ($p = 0.4282$); the GATA3 and FOXP3 factors were expressed more in the asymptomatic ones, with predominance of GATA3 ($p = 0.0007$). GATA3, when related to FOXP3, showed a significant predominance in asymptomatic individuals ($p = 0.0019$) and MOS ($p = 0.0209$). It is concluded that the GATA3 factor seems to be determinant to a different clinical course in the evolution of myelopathy (incomplete form).

Keywords: HTLV-1; HAM/ TSP; Transcription Factor.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.

BCL-2	B-Cell lymphoma protein 2 (Célula-B de linfoma 2)
° C	Graus Celsius
CD	Cluster of differentiation (Grupamento de diferenciação)
cDNA	DNA complementar
CEP	Comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos
CT	Cycle threshold
CTL	Linfócitos T citolíticos
CxR	Carboxi-x-Rodamina
DEPC	Dietil Pirocarbonato
DNA	Deoxyribonucleic Acid (ácido desoxirribonucléico)
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate (Desoxirribonucleotídeos Trifosfato)
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ethylene Diamine TetrAcetic Acid.(ácido etilendiamino tetra-acético)
ELISA	Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay
Fig	Figura
FOXP3	Forkhead/winged helix transcription factor
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GATA3	GATA-binding protein 3
HBZ	HTLV-1 b-ZIP factor
HLA	Human Leukocyte Antigen (Antígeno Leucocitário Humano)

HTLV	Vírus linfotrópico de células T humanas
IFN- γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
LLcTA	Leucemia/linfoma de células T de adultos
LTR	Long Terminal Repeat (Terminal de longa repetição nucleotídica)
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MOS	Monossintomáticos/Oligossintomáticos
NF-kB	Nuclear factor kappa B
Ng	Nanograma
NK	Natural Killer
NMT	Núcleo de Medicina Tropical
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Phosphate buffered saline (Tampão fosfato-salino)
PCR	Polimerase chain reaction – reação em cadeia da polimerase
PET/MAH	Paraparesia espástica tropical/Mielopatia Associada ao HTLV
Pmol	Picomol
Qsp	Quantidade suficiente para
RNA	Ribonucleic Acid (ácido ribonucléico)
Rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	Real time PCR (PCR em tempo real)
qPCR	Quantitative PCR

SNC	Sistema nervoso central
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TGF- β	Transforming growth factor-beta (fator de transformação de crescimento – beta)
Th	T helper cell
μg	Micrograma
μL	Microlitro
TBET	Tbox transcription factor
TNF- α	Tumor necrosis fator - alfa (fator de necrose tumoral - alfa)
Treg	Células T regulatórias
UFPA	Universidade Federal do Pará
ZEB	Zinc-finger E-Box
WB	Western Blot

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Objetivo Geral.....	15
1.2 Objetivos Específicos.....	15
1.3 Justificativa	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1 HTLV-1	17
2.2 Epidemiologia.....	18
2.3 PET/MAH.....	19
2.4 Imunopatologia do HTLV-1	21
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1 Tipo de estudo.....	24
3.2 Ambiente da pesquisa.....	24
3.3 População e Amostra.....	24
3.4 Coleta de dados	24
3.5 Análise dos dados.....	28
3.6 Aspectos éticos.....	28
4 RESULTADOS	29
5 DISCUSSÃO	33
6 CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS	37
APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	43
APÊNDICE B – ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO.....	45
ANEXO A – CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS DE PET/MAH	57
ANEXO B – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA	58

1 INTRODUÇÃO

O vírus linfotrófico de células T humano do tipo 1 (HTLV-1) foi descrito pela primeira vez pela equipe de Robert Gallo em 1980 antes da descoberta do Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1 (HIV-1) (FUTSCH; MAHIEUX; DUTARTRE, 2018). A infecção pelo retrovírus HTLV-1 foi inicialmente associada com a leucemia/linfoma de células T do adulto (LLcTA) no Japão em 1977, sendo depois encontrado em outras partes do mundo. (OZAWA *et al.*, 2012; KROON; PROIETTI, 2015). Em seguida foi associada à Paraparesia Espástica Tropical, também conhecida como Mielopatia Associada ao HTLV-1 (PET/MAH) (SANTOS; SOARES; RIVEMALES, 2017; MOZHGANI *et al.*, 2018).

O número de pessoas infectadas pelo HTLV-1 é de aproximadamente de 10-20 milhões no mundo (GLÓRIA *et al.*, 2015; TAROKHIAN *et al.*, 2018). A distribuição do vírus não é uniforme no mundo, apresentando áreas altamente endêmicas, como o Japão, África Subsaariana, Caribe e América do Sul, Ilhas da Melanésia e Oriente Médio. (ENOSE-AKAHATA; VELLUCCI; JACOBSON, 2017; TAROKHIAN *et al.*, 2018). No Brasil, estima-se que existam aproximadamente 2,5 milhões de infectados, com prevalência que varia de 0,04 a 1%, sendo que os estados da Bahia, Pará e Maranhão apresentam as maiores taxas de prevalência para essa infecção em doadores de sangue (ECHEVARRIA-LIMA *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2018).

A PET/MAH é uma doença neuroinflamatória crônica, relacionada à resposta imunológica do hospedeiro à infecção. Tem um início insidioso e promove alterações motoras dos membros inferiores, o que leva a um distúrbio progressivo da marcha (SANTOS; SOARES; RIVEMALES, 2017). Manifesta-se com distúrbios autonômicos dos esfíncteres, como retenção e incontinência urinária, constipação, impotência nos homens e redução da libido em ambos os sexos. Os sintomas neurológicos são paraparesia espástica simétrica ou assimétrica, com hiperreflexia, clônus e sinal de Babinski nos membros inferiores, e hiperreflexia, mas raramente paresia nos membros superiores. (COSTA; SANTOS, 2003; NECO, 2015).

A fisiopatologia da PET/MAH ainda não é totalmente esclarecida. Acredita-se em três hipóteses para explicar o desenvolvimento da mielopatia associada ao HTLV-1 (MOZHGANI *et al.*, 2017; NECO, 2015). Na primeira ocorre citotoxicidade direta, na qual células T CD8+ infectadas pelo HTLV-1 seriam capazes de cruzar a barreira hematoencefálica e destruir as células da glia infectadas. Na segunda, ocorre mimetismo

molecular, no qual a ribonucleoproteína nuclear heterogênea (hnRNP-A1), uma proteína neuronal do hospedeiro, é bastante semelhante a TAX, a proteína mais importante do vírus, e desencadeia um intenso processo inflamatório autoimune com lesão dos neurônios. E a última chamada de “bystander” ou dano circundante, é a mais aceita e trata-se da capacidade que linfócitos T CD4+ infectados e linfócitos T CD8+ específicos para TAX teriam em atravessar a barreira hematoencefálica e produzir grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias e neurotóxicas, como IFN- γ e TNF- α , ocasionando inflamação e destruição tecidual (NECO, 2015; FUTSCH; MAHIEUX; DUTARTRE, 2017).

O perfil de citocinas em resposta a infecção pelo HTLV-1 mostra um padrão de resposta Th1, com produção elevada de TNF- α e IFN- γ . Contudo, células mononucleares de portadores assintomáticos produzem níveis elevados de citocinas regulatórias IL-5 e IL-10 quando comparados com controles saudáveis, denotando que o perfil de resposta imunológica em pacientes portadores do HTLV-1 é tanto do tipo Th1 como do tipo Th2, produzidas principalmente por células T CD4+ (SANTOS *et. al.*, 2006; SOUZA *et. al.*, 2012; ANDO *et. al.*, 2013; RAFATPANA *et. al.*, 2013). Entretanto, é amplamente documentado que a resposta imunológica no curso da infecção pelo HTLV-1 é o perfil Th1 (SOUZA-MACHADO *et. al.*, 2003; OZAWA *et. al.*, 2012; QUARESMA *et al.*, 2016).

Também foi descrito que o HTLV-1, nos pacientes com PET/MAH, pode interferir na função das células T reguladoras (células T CD4+ CD25+ Foxp3+) (ARAYA *et al.*, 2014; ENOSE-AKAHATA; VELLUCCI; JACOBSON, 2017). O vírus infecta células T-reg e modifica seu papel na regulação imunológica. A disfunção das células T-reg é associada à menor produção de citocinas reguladoras, IL-10 e TGF- β , que pode diminuir a ação anti-inflamatória, permitindo este caráter pró-inflamatório visto nesses (SAITO; BANGHAM, 2012; SOUZA *et al.* 2012; ARAYA *et al.*, 2014).

As células CD4 de cada perfil de resposta imunológica pode ser distinguido pela presença de fatores de transcrição relacionados a cada perfil. As células Th1 podem ser identificadas por expressar o fator de transcrição (TBET; codificado por TBX21) e são responsáveis por secretar a citocina pró-inflamatória IFN- γ , principalmente. As células Th2 apresentam a expressão da proteína 3 de ligação ao GATA (GATA3), com secreção das citocinas IL-4, -5 e -10. Já as Tregs são geralmente distinguidas pela expressão de FOXP3, com a secreção de citocinas reguladores, sobretudo IL-10 e TGF- β (ARAYA *et al.*, 2014).

Sendo a resposta imunológica importante no desenvolvimento da PET/MAH, o estudo das expressões dos fatores TBET, GATA3 e FOXP3 podem ajudar a entender melhor os

mecanismos envolvidos no desenvolvimento da doença. Com isso, foi avaliada a expressão de cada um destes fatores nos pacientes infectados por HTLV-1 que desenvolveram ou não PET/MAH.

1.1 Objetivo Geral

Avaliar a expressão de TBET, GATA3 e FOXP3 em pacientes infectados por HTLV-1 que desenvolveram ou não PET/MAH.

1.2 Objetivos Específicos

- 1) Quantificar a expressão de TBET, GATA3 e FOXP3 nos pacientes infectados com HTLV-1 assintomáticos, oligossintomáticos e que desenvolveram PET/MAH;
- 2) Comparar a expressão de TBET, GATA3 e FOXP3 entre os pacientes infectados com HTLV-1 assintomáticos, oligossintomáticos e que desenvolveram PET/MAH;
- 3) Correlacionar a expressão de TBET, GATA3 e FOXP3 nos pacientes infectados com HTLV-1 assintomáticos, oligossintomáticos e que desenvolveram PET/MAH.

1.3 Justificativa

O HTLV-1 está relacionado a doenças proliferativas graves e aparece como agente etiológico de duas doenças principais: Leucemia/Linfoma de Células T do Adulto, uma doença neoplásica, e Paraparesia Espástica Tropical/Mielopatia Associada ao HTLV-1.

Este vírus é endêmico em várias partes do mundo. A soroprevalência desta infecção varia de acordo com a área geográfica, grupo étnico e comportamento de risco. A América do Sul é uma das áreas mais prevalentes para o HTLV-1. No Brasil o vírus encontra-se em todas as regiões brasileiras, sendo considerada região endêmica, possuindo cerca de 2,5 milhões de brasileiros infectados. As maiores Taxas de soroprevalência para HTLV-1 no Brasil está nos estados do Maranhão, Bahia e Pará. Ainda há poucos estudos sobre a prevalência do HTLV - 1 na população da região metropolitana de Belém.

Indivíduos acometidos pelo vírus, e que desenvolvem mielopatia associada, evoluem para um quadro clínico neurológico importante do ponto de vista funcional. Apresentam limitações que repercutem negativamente na qualidade de vida.

Os pacientes infectados por HTLV-1 apresentam o desequilíbrio entre as respostas Th1, Th2 e Treg, sendo que, este desequilíbrio é mais exuberante nos pacientes que desenvolvem alguma doença relacionada a este vírus, em destaque a PET/MAH.

O desenvolvimento do perfil imunológico depende da expressão dos fatores de transcrição relacionados a eles, como no perfil Th1, o fator TBET, no perfil Th2, o GATA3 e, no perfil Treg, FOXP3.

Embora existam algumas hipóteses que expliquem a fisiopatologia da mielopatia associada ao HTLV-1, a patogênese dessa doença ainda não é totalmente compreendida. Sabe-se que a resposta imunológica do hospedeiro é importante para o aparecimento do quadro clínico e o vírus pode interferir nas vias de sinalização da células infectada. Sendo assim, o estudo das expressões gênicas dos fatores de transcrição TBET, GATA3 e FOXP3 nos pacientes infectados por HTLV-1 pode ajudar a compreender melhor a fisiopatologia da PET/MAH.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 HTLV-1

O Vírus Linfotrópico de Células T Humanas (HTLV) é um retrovírus pertencente ao gênero *Deltaretrovirus*, da subfamília Orthoretrovirinae, com cerca de 80 a 100 nanômetros. Na maioria das vezes, não desenvolve manifestações clínicas ou doenças em seres humanos, sendo frequentemente detectado nas poucas vezes que desencadeia patologias (PEREIRA; MESQUITA, 2016).

Atualmente existem quatro tipos virais descritos na literatura. O HTLV-1 foi descrito como o primeiro retrovírus humano, observado na manifestação cutânea de um paciente com linfoma de células T e é o principal tipo viral causador de doenças e manifestações clínicas em humanos (ROMANELLI; CARAMELLI; PROIETTI, 2010; PEREIRA; MESQUITA, 2016). O HTLV-2 foi identificado em uma linhagem de células T de um paciente com tricoleucemia, dois anos após a descoberta do primeiro tipo. Apresenta-se como um tipo bem menos patogênico e foi essencial para a descoberta do tropismo viral pelas células brancas da linhagem linfoide. (RIBEIRO *et al.*, 2010; MS, 2013). Mais recentemente, dois outros tipos de HTLV foram descritos, HTLV-3 e HTLV-4, ambos identificados em indivíduos africanos (MAHIEUX; GESSAIN, 2011).

O HTLV-1 é assintomático na maioria dos indivíduos infectados. Quando ocorrem, são observadas diversas manifestações clínicas, como alterações neurológicas, oculares e motoras. As principais doenças causadas por este vírus são a Leucemia Linfoide de células T do Adulto e a Paraparesia Espástica Tropical/Mielopatia Associada ao HTLV-1, principais representações do acometimento viral em humanos. A transmissão viral entre os indivíduos pode ocorrer através do aleitamento materno, transmissão intrauterina ou perinatal (transmissão vertical); também por meio do contato sexual, além do uso de drogas injetáveis ou por transfusão sanguínea (horizontal) (ROMANELLI; CARAMELLI; PROIETTI, 2010; PEREIRA; MESQUITA, 2016).

A estrutura do HTLV-1 é semelhante à de outros retrovírus. É um vírus envelopado e seu genoma é constituído por duas fitas simples de RNA de polaridade positiva. Possui genes estruturais e não estruturais, como os genes *gag*, *pro*, *pol* e *env* e *pX*. O gene *pX*, é responsável em codificar as proteínas regulatórias TAX (p40), REX (p27), e outras proteínas, que são responsáveis processo de infecção e proliferação deste vírus. A proteína HBZ (*HTLV-1 b-ZIP factor*), codificada pelo gene *env*, em associação com a TAX, está

diretamente envolvida na patogênese viral e pode determinar perfis de resposta imunológica celular específicos (BOXUS; WILLEMS, 2009, 2012; QUARESMA *et al.*, 2016).

Após a entrada do vírus, na célula, o RNA genômico viral é transcrito em cDNA, através da transcriptase reversa, e o vírus é incorporado ao DNA do hospedeiro. O aumento do número de cópias do genoma viral ocorre através da expansão clonal das células infectadas e transmissão de células infectadas para as não infectadas, pela repetição do ciclo. A proteína TAX desempenha um papel importante, através do estímulo à proliferação celular, além de inibir a apoptose das células infectadas (SATOU; MATSUOKA, 2010).

2.2 Epidemiologia

Estima-se que o HTLV-1 é responsável pela infecção de 10 a 20 milhões de pessoas ao redor do mundo, variando conforme as estimativas de diversos estudos e desconsiderando casos não notificados. Além disso, estipula-se que aproximadamente 90% dos indivíduos soropositivos não manifestam sintomas clínicos (OZAWA *et al.* 2012; GLÓRIA *et al.*, 2015). Em relação às principais patologias causadas pelo HTLV-1, estima-se que 2 a 3% dos indivíduos desenvolvam LLcTA e o mesmo número também desenvolva a PET/MAH (SAITO, 2010; PEREIRA; MESQUITA, 2016).

No Brasil, o número de acometidos é estimado em torno de 2,5 milhões, com distribuição desigual entre as regiões (maior prevalência nas regiões Norte e Nordeste), sendo, assim, o país com maior número absoluto de casos (GLÓRIA *et al.*, 2015).

No Pará, o trabalho de Silva *et al.* (2018) apresentou uma prevalência de 2% de indivíduos infectados na região metropolitana da capital paraense, o que considera como endemia moderada. Os estudos de Sequeira *et al.* (2012) e Glória *et al.* (2015) apresentam maior procedência de pacientes oriundos da região metropolitana de Belém, 67,6% (pacientes gestantes) e 92,3% (população geral), respectivamente.

Em relação à transmissibilidade, observa-se que o aleitamento materno é a principal via de transmissão vertical, com o contágio de lactentes pelas mães contaminadas com o vírus (20-30% dos casos). Esta forma de contágio (vertical) é considerada a mais eficaz, com altas Taxas de transmissibilidade. Entretanto, os riscos biológicos ainda não são totalmente elucidados (MS, 2014).

2.3 PET/MAH

A PET/MAH é um distúrbio neurológico progressivo, crônico, que pode desencadear diversos sintomas, como alterações motoras simétricas dos membros inferiores, distúrbio progressivo da marcha e atinge, após alguns anos, uma estabilidade clínica (ENOSE-AKAHATA; VELLUCCI; JACOBSON, 2017).

Os primeiros sintomas a aparecer nos pacientes costumam ser disfunção vésico-intestinal como urge-incontinência urinária, constipação intestinal, e disfunção sexual na população masculina. Evolui gradativamente para dificuldade de deambular, espasticidade, hiperreflexia, clônus, disfunção esfinteriana, lombalgia. Podem estar presentes alterações cognitivas de leve a moderada intensidade suficiente para prejudicar a sua qualidade de vida (TAVARES, 2009; CHAMPS *et al.*, 2010).

Os indivíduos infectados pelo vírus são, em sua maioria, assintomáticos e aproximadamente 0,25 a 3,8% indivíduos infectados desenvolvem a doença. A doença acomete principalmente indivíduos nas 4ª e 5ª décadas de vida, raramente antes dos 20 anos ou após os 70 anos (SANTOS; MUNIZ; CARVALHO, 2009).

A fisiopatologia do vírus não é totalmente entendida, três hipóteses são mais aceitas para explicar o desenvolvimento da PET/MAH pelo HTLV-1 (MOZHGANI *et al.*, 2017). Entretanto, sabe-se que no mecanismo de infecção pelo vírus o alvo principal é o linfócito T CD4+, que possui um receptor na superfície na membrana celular que é o local de ligação do vírus (NECO, 2015).

Na primeira hipótese, ocorre citotoxicidade direta, na qual células T CD8+ infectadas pelo HTLV-1 seriam capazes de cruzar a barreira hematoencefálica e destruir as células da glia infectadas, através da liberação de citocinas (COSTA; SANTOS, 2003; NECO, 2015).

Na segunda, ocorre mimetismo molecular, no qual a ribonucleoproteína nuclear heterogênea (hnRNP-A1), uma proteína neuronal do hospedeiro, é bastante semelhante a Tax, a proteína mais importante do vírus, e desencadeia um intenso processo inflamatório autoimune com lesão dos neurônios (COSTA; SANTOS, 2003).

E a última chamada de “bystander” ou dano circundante, é a mais aceita e se baseia na ideia da capacidade que linfócitos T CD4+ infectados e linfócitos T CD8+

específicos para Tax teriam em atravessar a barreira hematoencefálica e produzir grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias, ocasionando inflamação e destruição tecidual (NECO, 2015; FUTSCH; MAHIEUX; DUTARTRE, 2017). Nesta hipótese, o sistema nervoso linfócitos infectados, gerando respostas imunológicas humorais e celulares, uma vez que citocinas (IL-1, IL-2 e IL-6), Fator de Ativação de Plaquetas (PAF) e Fator de Necrose Tumoral (TNF), quimiocinas como CXCL-9 e CXCL-10, fundamentais no recrutamento de células Th1, tem sido encontradas no soro dos pacientes. Sabe-se que o TNF-alfa é citotóxico para os oligodendrócitos e destrói a bainha de mielina (ARAYA *et al.*, 2014; NECO, 2015).

Os fatores determinantes no desenvolvimento e progresso da PET/MAH são: presença de alelos de HLA protetor (HLA-A02) ou indutor (HLA-DRB1-0101); carga viral elevada; a inibição da ação apoptótica do linfócito T citotóxico CD8+ pela bcl-2; relação da carga viral e resposta imunológica do hospedeiro (COSTA; SANTOS, 2003; SANTOS; MUNIZ ; CARVALHO, 2009).

A Organização Mundial da Saúde (OMS), em 1989, definiu critérios diagnósticos clínicos e laboratoriais para PET/MAH tais como: paraparesia espástica de evolução lenta e progressiva; presença de sinais piramidais; variáveis graus de distúrbios esfinterianos e sensitivos, associados à presença de anticorpos para o HTLV-I no sangue e no líquido cefalorraquidiano (LCR), porém há pacientes assintomáticos e pacientes que não fecham os critérios diagnósticos embora apresentem sintomas de mielopatia (TAVARES, 2009; KOYAMA *et al.*, 2019).

Castro-Costa *et al.* (2006) elaborou uma nova proposta diagnóstica para o diagnóstico da PET/MAH. Este modelo aborda sintomas clínicos desde o início da doença, incluindo casos de distúrbios oligossintomáticos/monossintomáticos, e achados laboratoriais que atestam a presença de proteínas do vírus anti-HTLV-I [pelo teste de Western Blot (WB) e/ou reação em cadeia de polimerase (PCR)] no LCR. Koyama *et al.* (2019) determinou, posteriormente, a divisão dos indivíduos, infectados pelo HTLV-1, quanto ao grau de mielopatia desenvolvida, em três grupos: Assintomáticos, Monossintomáticos/Oligossintomáticos (MOS) e pacientes com PET/MAH.

2.4 Imunopatologia do HTLV-1

Embora a maioria dos pacientes infectados pelo HTLV-1 não manifestem sintomas ou desenvolvam doenças, a infecção pelo vírus está diretamente relacionada a diversos acometimentos clínicos, como a PET/MAH, LLcTA, Síndrome de Sjögren, uveítes e outras manifestações, sobretudo, de caráter inflamatório (ROMANELLI; CARAMELLI; PROIETTI, 2010; QUARESMA *et al.*, 2016).

Em relação à resposta imunológica inata, as células NK são as responsáveis pela detecção e eliminação das células do hospedeiro infectadas pelo HTLV-1, bem como a sinalização para Células Apresentadoras de Antígenos (APC), desencadeando o início da resposta imunológica adquirida. A quantidade, de células NK está diretamente relacionada à carga viral, com ativação da replicação deste tipo celular. Observa-se que TAX desempenha um papel essencial nesta infecção aguda pelo HTLV-1, estimulando essa replicação celular e aumento da carga viral (JACOBSON, 2010; NORRIS *et al.*, 2010).

Alguns estudos mostram que TAX possui um papel essencial na infecção aguda pelo HTLV-1, porém, após esse momento inicial, seu gene é inativado e sua expressão é diminuída. A quantidade de TAX observada em pacientes que desenvolveram PET/MAH apresenta-se baixa, sugerindo que sua atuação na cronologia da manifestação clínica do HTLV-1 está relacionada à interação com outros fatores ligados ao próprio vírus e a resposta imunológica do hospedeiro (BARROS *et al.*, 2013; QUARESMA *et al.*, 2015; ENOSE-AKAHATA; VELLUCCI; JACOBSON, 2017).

Nesse sentido, a proteína HBZ possui um papel importante no surgimento de um processo inflamatório das doenças relacionadas ao HTLV-1. Acredita-se que sua expressão está intimamente relacionada à ação da TAX, de forma contrarreguladora (BARATELLA; FORLANI; ACCOLLA, 2017). O estudo de Enose-Akahata, Vellucci e Jacobson (2017) evidenciou um aumento da expressão dessa proteína no seguimento da cronificação da infecção, o oposto observado na expressão de TAX.

O perfil da resposta imune à TAX também se apresenta oposto ao perfil de resposta à HBZ.

O HTLV-1, através das interações moleculares de TAX, induz a supressão da resposta imunológica T reguladora, através da perda de expressão do fator de transcrição FOXP3. De forma concomitante, ocorre o aumento da expressão de TBET e secreção da citocina IFN- γ , induzindo uma resposta Th1 e desenvolvimento de um processo inflamatório (ARAYA *et al.*, 2014; MIYAZATO; MATSUOKA, 2014).

Na PET/MAH, foi observado um aumento de células T CD4⁺ que expressam TBET e estão associadas a diversas citocinas pró-inflamatórias, sobretudo TNF- α e IFN- γ , apesar das baixas expressões de TAX observadas (BARROS *et al.*, 2013; ARAYA *et al.*, 2014; MIYAZATO; MATSUOKA, 2014; FUTSCH; MAHIEUX; DUTARTRE, 2018). Além disso, de forma oposta a infecção inicial pelo vírus, a expressão gênica de FOXP3 se apresenta aumentada nos pacientes que desenvolvem PET/MAH, sobretudo em linfócitos T não supressivos (SATOUE *et al.*, 2012).

O HBZ se apresenta como o responsável pela instabilidade na expressão de FOXP3, embora a transcrição do seu gene seja estimulada. Isso acarreta um aumento das células T CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ com um caráter não supressivo, inerente à resposta reguladora (MIYAZATO; MATSUOKA, 2014).

As células Th2 e Treg são geralmente distinguidas umas das outras pela sua expressão do fator de transcrição e proteína GATA3 e FOXP3, respectivamente (ARAYA *et al.*, 2014; FUZII *et al.*, 2014; MIYAZATO; MATSUOKA, 2014; ENOSE-AKAHATA; VELLUCI; JACOBSON, 2017).

A resposta Th2, em geral, mostra-se com expressão inferior à resposta Th1 em pacientes PET/MAH em relação aos pacientes assintomáticos. Um estudo realizado por Dias *et al.* (2016) mostrou a maior expressão de IFN- γ em pacientes com PET/MAH em relação aos pacientes assintomáticos. Na revisão da literatura mundial, há poucos estudos a respeito da interação entre o fator de transcrição GATA-3 (Th2) e a proteína Tax.

Os resultados observados são controversos. Gilli *et al.* (2000; 2004) demonstraram que os indivíduos infectados pelo HTLV-1 apresentavam baixa expressão da GATA-3 e não observaram a expressão desse fator de transcrição nos pacientes com PET/MAH e LLTA. Em contrapartida, Nishiura *et al.* (2004) observaram expressão elevada da GATA-3 nos pacientes com PET/MAH.

Já em relação às células Treg, há a desregulação da expressão de FOXP3, pelo aumento da expressão de HBZ e com a diminuição de TAX, durante o curso da PET/MAH, o que se associa a baixas expressões de TGF- β e IL-10. Entretanto, foi observado que a expressão aumentada de Tax reduz a expressão da Foxp3 e inibe a função supressora de células Treg *in vitro*. Também foi descrito que as células Treg CD4⁺ Foxp3⁺ de camundongos transgênicos com gene *hbz* apresentavam função comprometida com a maior expressão deste gene. Esses achados indicam que o HTLV-1 altera as células Treg, podendo

ser um dos mecanismos de indução da ativação imunológica das células T infectadas (SANTOS *et. al.*, 2009; SAITO, 2010; ARAYA *et. al.*, 2011; RAFATPANAHA *et. al.*, 2013).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Tipo de estudo

O projeto proposto é um estudo observacional, analítico e transversal que busca uma possível associação das expressões gênicas de TBET, GATA3 e FOXP3 com os diferentes graus de manifestação de Mielopatia em indivíduos portadores do HTLV-1, estabelecendo esta associação com os indivíduos que desenvolveram a doença e com os que não manifestaram sintomas.

3.2 Ambiente da pesquisa

Os pacientes portadores do HTLV-1 foram atendidos e acompanhados no Laboratório de Clínica e Epidemiologia de Doenças Endêmicas, do Núcleo de Medicina Tropical (NMT), da Universidade Federal do Pará (UFPA). As amostras sanguíneas e os dados clínicos foram processados e analisados no Laboratório de Imunopatologia do Núcleo de Medicina Tropical, setor de ensino (pós-graduação), pesquisa e extensão em doenças tropicais e demais temas regionais.

3.3 População e Amostra

A população foi constituída de pacientes, maiores de dezoito anos, diagnosticados com HTLV-1, que concordaram em participar da pesquisa. Foram excluídos pacientes que apresentarem déficit cognitivo, coinfeção com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) ou outras doenças inflamatórias e/ou infecciosas que cursem com lesões neurológicas em seu decorrer clínico/cronológico.

3.4 Coleta de dados

- População estudada:

Após a aprovação no comitê de ética em pesquisa (Anexo B) e aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A), foram coletados dados clínicos e amostras sanguíneas de pacientes HTLV-1 que foram atendidos no Laboratório de Clínica e Epidemiologia de Doenças Endêmicas, do Núcleo de Medicina Tropical (NMT). A classificação de Mielopatia completa (PET/MAH) ou incompleta, nesses indivíduos, foi determinada, de acordo com os critérios de Koyama *et al.* (2019), durante o atendimento,

mediante avaliação clínica e exames complementares que constaram em prontuário de atendimento, classificando os pacientes em Assintomáticos, Monossintomáticos/Oligossintomáticos (MOS) e portadores de PET/MAH. O diagnóstico de PET/MAH foi estabelecido segundo os critérios da OMS (1989) (Anexo A), observando achados clínicos e laboratoriais relacionados à doença e à infecção pelo HTLV-1.

- Coleta de sangue, separação e contagem das células linfomononucleares:

Após a avaliação clínica de cada paciente selecionado, foi coletada amostra de 5mL de sangue em tubo com EDTA (Ácido Etilenodiamino Tetra-acético). Em seguida, todo o sangue foi transferido para um tubo tipo Falcon (Labcon) de 50mL, para ser diluído em 5mL de PBS (Tampão Fosfato-salino), com volume final de 10mL. Em outro tubo tipo falcon de mesma proporção, foi adicionado 5mL de Ficoll-paqueTM Plus (GE Healthcare), transferindo-se cuidadosamente para este tubo todo o sangue diluído anteriormente. Após este procedimento, o conteúdo foi centrifugado para a separação das células linfomononucleares a 2000 rpm por 30 minutos e a 15°C, utilizando a centrífuga Heltich Zentrifugen Universal 320 R. Após esta primeira centrifugação, as células linfomononucleares foram retiradas e transferidas para outro tubo tipo falcon. Em seguida, foram lavadas em 5 mL de PBS e centrifugadas a 4000 rpm por 20 minutos e a 15°C. Ao término desta centrifugação, foi desprezado o sobrenadante, restando apenas um *pellet* de células no fundo do tubo. A estas células restantes, foi acrescido 1 mL de PBS e em seguida, serão transferidas para o microtubo (Labcon) de 1,5mL. Deste microtubo, foi retirada amostra de 10µL para a contagem de células linfomononucleares. O restante da amostra será congelado em refrigerador (Ultra Low Sanyo) a -80°C.

Para a contagem celular, foi utilizada a câmara de Neubauer. Este procedimento utilizou 10µL de células (retirados anteriormente) que foram diluídas em 90µL de PBS (diluição de 1:10). A contagem foi realizada utilizando os quatro quadrantes maiores laterais e após este procedimento, o número total de células foi dividido por quatro (número de quadrantes existentes), multiplicados por dez (fator de diluição) e seguido da multiplicação por 10.000, obtendo-se assim o número de células/mL de cada paciente.

- Isolamento e quantificação do RNA:

De cada paciente, o RNA total foi extraído de 10⁶ células linfomononucleares, previamente calculadas. A extração de RNA foi realizada pelo método do Trizol, de acordo com o protocolo do fabricante. Em microtubo de 1,5mL, foi acrescentado às células

linfomonucleares 1000µL de Trizol (Trizol[®] Reagent – Invitrogen) e 200µL de clorofórmio (Merck) a cada tubo. Após homogeneização por 2 minutos em Agitador Vortex Quimis, o conteúdo foi centrifugado na centrífuga Eppendorf Centrifuge 5415R a 12.000 rpm por 10 minutos a 6^oC. Após este período, o sobrenadante de cada tubo foi transferido para outro microtubo de 1,5mL, contendo 500µL de isopropanol (Merk) e em seguida homogeneizado manualmente. Este microtubo foi armazenado em refrigerador a -20°C para precipitação por um período mínimo de 24 horas. Decorrido este período, uma nova centrifugação a 12.000 rpm, por 20 minutos a 4^oC, ocorreu. Após centrifugação, foi retirado o sobrenadante, restando o *pellet* de RNA no lado e no fundo do tubo, e a este RNA precipitado foi acrescentado 1000µL de etanol 70% (Merk) em água DEPC (dietil pirocarbonato), e assim centrifugado a 12.000 rpm, por 20 minutos a 4^oC, para ser realizada a lavagem do RNA. Após esta lavagem, o *pellet* de RNA foi desidratado por evaporação a 37^oC, e diluído em 30µL de água DEPC.

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

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

- Síntese de cDNA:

Inicialmente, após a extração e quantificação do RNA total, foi realizado a transcrição reversa a partir de 1 µg de RNA total. A transcrição reversa, das amostras, será realizada para a obtenção do cDNA, a ser utilizado na reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR). Deste modo, este procedimento foi realizado utilizando o *kit Superscript III (Superscript[®] III Reverse Transcriptase – Invitrogen)* de acordo com o protocolo do fabricante. Na reação, foram acrescentados 1µg da amostra de RNA de cada paciente (previamente quantificadas), oligo dT 500 pmol/mL e dNTP a 10mM, com volume final de 13mL. A reação foi incubada a 65°C por 5 minutos no termociclador (Eppendorf Mastercycler) e transferida imediatamente para o gelo. Foram adicionados, então, 5 µL de tampão 5x (*first strand buffer*), 1µL de DTT (ditiotreitól) 10 mM, 1µL de MgCl₂ a 50mM e

1 μ L de *Super script III* 10.000U – 200U/mL, com volume final de 20 μ L, levando-se a reação a 50°C por 50 minutos. Depois a enzima foi inativada, aquecendo-se a solução a 85°C por 5 minutos. Após o término da reação, em cada amostra, foi acrescentado 10 μ L de água destilada ultrapura Gibco (Invitrogen), totalizando um volume final de 30 μ L.

- Quantificação da expressão gênica de β -Actina, GAPDH, TBET, GATA3 e FOXP3:

No presente estudo, foi realizada a quantificação relativa. Para a detecção dos amplicons, foi utilizado o agente fluorescente CxR. As amostras foram feitas em duplicata. Os oligonucleotídeos iniciadores (primers), utilizados para as reações de q-PCR em tempo real, foram os primers para β -Actina, GAPDH e para os fatores de transcrição moduladores da resposta imunológica celular Th1 (TBET), Th2 (GATA3) e Treg (FOXP3).

A reação de qPCR foi realizada no StepOnePlus (Real Time PCR Systems – Applied Biosystems) com o GoTaq qPCR (Promega). Foram utilizados 1 μ L do cDNA, GoTaq qPCR master mix (2x), primers (18 μ M) (*Foward and Reverse*), e água Milli Q autoclavada qsp 20 μ L. Após um período de 10 minutos, a 50°C, para ativação da enzimas e um de 5 minutos, a 95°C, para desnaturação de proteínas, foram executados 45 ciclos de 95°C por 30 segundos e 60°C por 1 minuto. Ao final, foi realizado o protocolo de dissociação térmica, para controle da especificidade da reação.

Os resultados serão analisados pelo StepOne TM Software v2.0. Para a quantificação relativa, será realizado o seguinte cálculo: inicialmente determinará o cycle threshold (CT), dado pelo número do ciclo em que o sinal de fluorescência atingirá a linha limiar (threshold line), ou seja, a linha em que a emissão de fluorescência está acima do ruído de fundo (background). O CT encontra-se invariavelmente na região correspondente à fase exponencial da amplificação, o que torna mais acurada a estimativa de quantificação dos transcritos na amostra original. Os valores de CT dos genes de interesse serão normalizados em relação ao CT dos genes constitutivos, o GAPDH (do inglês Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) e a β -actina, resultando o Δ CT, que é o CTgene - CTconstitutivo. Por fim, será calculado o $2^{-\Delta$ CT}, sendo este o valor a ser trabalhado como representante da expressão relativa para cada gene.

3.5 Análise dos dados

O *software* Excel 2010 foi utilizado para entrada dos dados, bem como para a confecção das tabelas. A análise estatística foi realizada por meio dos *softwares* BioEstat 5.0 e o *GraphPad Prism 5.0*. Na confecção dos gráficos foi utilizado o *software GraphPad Prism 5.0*.

Foi utilizado o teste de Mann-Whitney para a comparação entre as diferenças de expressão gênica das citocinas e dos fatores de transcrição para os perfis imunológicos entre os grupos estudados. Para a correlação entre os achados dos perfis de resposta imunológica periférica e os achados clínicos, foi utilizado o Teste de Correlação de Pearson. Foi adotado um valor de $p \leq 0,05$ como nível de significância.

3.6 Aspectos éticos

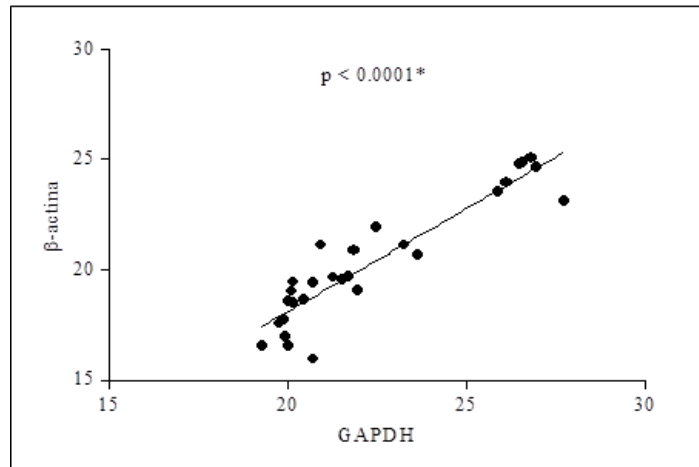
O projeto visou seguir todos os padrões bioéticos estabelecidos na Resolução nº 466/12, do Conselho Nacional de Saúde, sobre pesquisa envolvendo seres humanos. O trabalho está incluído no projeto de pesquisa “**CORRELAÇÃO ENTRE A AVALIAÇÃO CLÍNICA, PADRÃO DE RESPOSTA IMUNOLÓGICA PERIFÉRICA E A FUNÇÃO TÍMICA DE PACIENTES ACOMETIDOS POR PARAPARESIA ESPÁSTICA TROPICAL/MIELOPATIA ASSOCIADA AO HTLV-1**”, submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em seres humanos do Núcleo de Medicina Tropical/UFPA, sob o parecer N° 038/2010 (ANEXO A), seguindo todos os padrões éticos desse tipo de pesquisa. Os dados deste trabalho foram retirados do projeto mencionado, mediante o seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, e o orçamento está incluído no valor total da pesquisa matriz, utilizando a infraestrutura do Laboratório de Imunopatologia do Núcleo de Medicina Tropical/UFPA.

4 RESULTADOS

Foram incluídos no estudo 76 pacientes e, de acordo com os critérios diagnósticos proposto por Koyama *et al.* (2019), 30 pacientes (39,47%) apresentaram PET/MAH, 27 eram assintomáticos (35,53%) e 19 MOS (25%).

Para a quantificação relativa, utilizou-se os genes constitutivos GAPDH e β -actina. O primeiro gráfico mostra a correlação entre os CTs dos dois genes constitutivos, mostrando forte correlação entre eles (Figura 1).

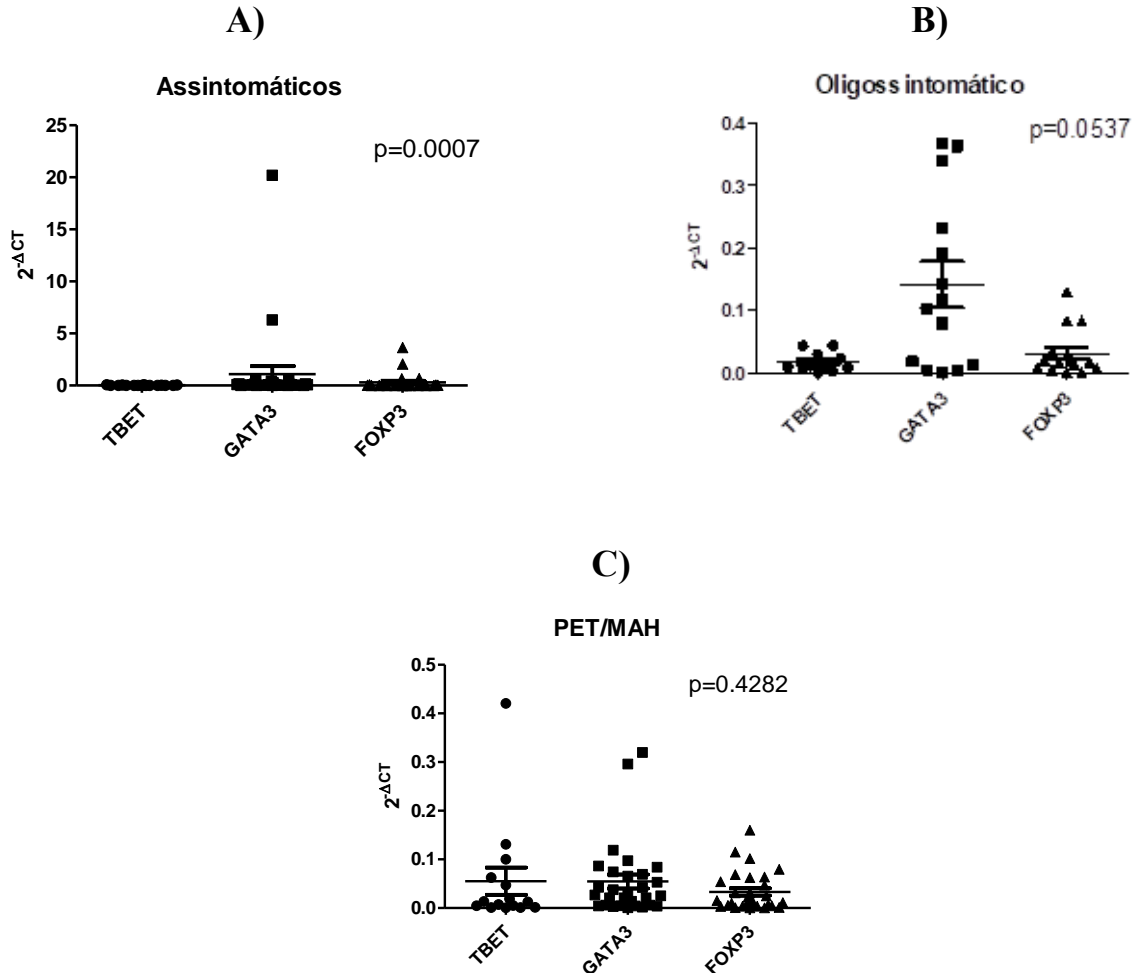
FIGURA 1 – Correlação da expressão dos genes constitutivos dos pacientes infectados pelo HTLV-1, de acordo com o CT em escala linear, $r = 0,9223$, $p < 0,0001$. Correlação de Pearson, $p < 0,05$.



Fonte: Próprios autores.

Os dados deste estudo foram descritos com os resultados obtidos com GAPDH. As expressões de TBET, GATA3 e FOXP3 para os pacientes assintomáticos, MOS e PET/MAH estão representados nos gráficos das figuras 2 e 3. A análise estatística mostrou que a expressão do fator de transcrição GATA3 foi maior em relação às expressões de TBET e FOXP3 nos pacientes assintomático e MOS, com significância estatística nos pacientes assintomáticos ($p < 0,0007$) (Fig.2A) e sem significância estatística nos pacientes MOS ($p=0,0537$) (Fig.2B). Nos pacientes com PET/MAH, houve menor expressão do fator de transcrição FOXP3. Os fatores TBET e GATA3 se apresentaram semelhantes, porém sem significância estatística $p=0,4282$ (Fig.2C).

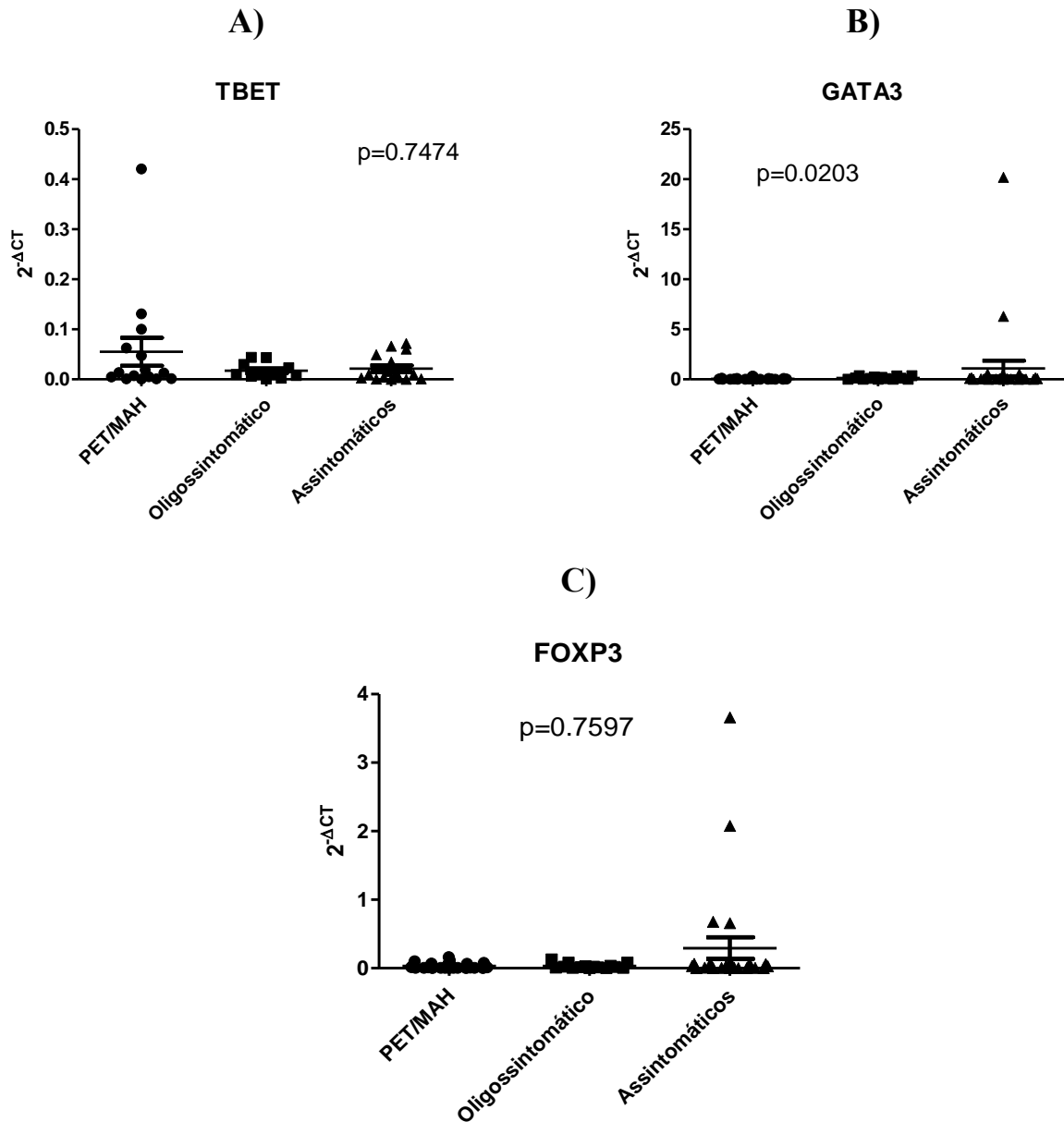
FIGURA 2 – Expressão gênica dos fatores de transcrição TBET, GATA3 E FOXP3 segundo os CTs de GAPDH em escala Log^2 . **(A)** Expressão gênica dos fatores transcrição TBET, GATA3 E FOXP3 nos pacientes assintomáticos ($p < 0.0007$). **(B)** Expressão gênica dos fatores transcrição TBET, GATA3 E FOXP3 nos pacientes monossintomáticos ($p = 0.0537$). **(C)** Expressão gênica dos fatores transcrição TBET, GATA3 E FOXP3 nos pacientes com PET/MAH ($p < 0.4282$). Teste de Mann-Whitney, $p \leq 0.05$.



Fonte: Próprios autores.

Ao comparar os níveis de expressão do fator de transcrição TBET nos grupos estudados, nota-se que houve maior expressão gênica no grupo com PET/MAH, porém sem significância estatística ($p= 0.7474$) (Fig.3A). Em relação à expressão do fator de transcrição GATA3, houve maior expressão no grupo assintomático, e foi estatisticamente significativa ($p=0,0203$) (Fig.3B). Na análise da expressão de FOXP3, houve maior expressão no grupo de assintomáticos, mas, sem significância estatística ($p=0.7597$) (Fig.3C).

FIGURA 3 – Expressão gênica dos fatores de transcrição TBET, GATA3 E FOXP3 segundo os CTs de GAPDH em escala Log^2 . **(A)** Expressão gênica do fator TBET nos grupos de pacientes estudados ($p < 0.7474$). **(B)** Expressão gênica do fator GATA3 nos grupos de pacientes estudados ($p < 0.0203^*$). **(C)** Expressão gênica do fator FOXP3 nos grupos de pacientes estudados ($p < 0.7597$). Teste de Mann-Whitney, $p \leq 0.05$.



Fonte: Próprios autores.

Em seguida, foram analisadas as correlações entre os genes em cada grupo. Nos pacientes assintomáticos, foi visto que TBET e GATA3 se correlacionaram positivamente com FOXP3 de forma significativa ($p=0,0010$ e $p=0,0019$, respectivamente). Já a correlação entre TBET x GATA3 foi fraca e não significativa ($p=0.1612$) (Tabela 1).

TABELA 1 – Correlação entre os fatores de transcrição TBET, GATA3 E FOXP3 nos pacientes assintomáticos. Correlação de Pearson, $p \leq 0.05$.

CORRELAÇÃO	r	valor de p
Tbet x GATA3	0.3676	0.1612
Tbet x FOXP3	0.7607	0.0010*
GATA3 x FOXP3	0.7321	0.0019*

Fonte: Próprios autores.

Nos pacientes MOS, apenas GATA3 x FOXP3 apresentou correlação positiva significativa ($p=0.0209$). Em relação às análises entre TBET x GATA3 e TBET x FOXP3, não houve correlação ($p=0.8287$ e $p=0.6307$, respectivamente) (Tabela 2).

TABELA 2 – Correlação entre os fatores de transcrição TBET, GATA3 E FOXP3 nos pacientes oligossintomáticos. Correlação de Pearson, $p \leq 0.05$.

CORRELAÇÃO	r	valor de p
Tbet x GATA3	-0.07879	0.8287
Tbet x FOXP3	0.1636	0.6307
GATA3 x FOXP3	0.6088	0.0209*

Fonte: Próprios autores.

Nos pacientes com PET/MAH, os resultados foram semelhantes ao encontrado nos pacientes MOS. GATA3 e FOXP3 apresentaram correlação positiva significativa ($p=0.0103$). Já para TBET x GATA3 e TBET x FOXP3, não houve correlação significativa ($p=0.7039$ e $p=0.2834$, respectivamente) (Tabela 3).

TABELA 3 – Correlação entre os fatores de transcrição TBET, GATA3 E FOXP3 nos pacientes com PET/MAH. Correlação de Pearson, $p \leq 0.05$.

CORRELAÇÃO	r	valor de p
Tbet x GATA3	-0.1071	0.7039
Tbet x FOXP3	0.2964	0.2834
GATA3 x FOXP3	0.6393	0.0103*

Fonte: Próprios autores.

5 DISCUSSÃO

Os mecanismos imunológicos envolvidos no desenvolvimento da PET/MAH ainda não estão bem esclarecidos. As alterações imunológicas, com destaque à tendência a uma resposta Th1, são características importantes que indicam um caminho fisiopatológico para a doença (NISHIURA *et al.*, 2004; ARAYA *et al.*, 2014). O aumento da expressão de IFN- γ , com diminuição de IL-4 e IL-10, já foi descrito em outros trabalhos (YAMANO *et al.*, 2005; FUZII *et al.*, 2014). Por infectar células CD4, o HTLV-1 pode interferir nos fatores de transcrição associados às respostas imunológicas. Com isso, este estudo visou a análise da expressão dos fatores de transcrição associados às respostas Th1, Th2 e Treg (TBET, GATA3 e FOXP3, respectivamente) para verificar se há diferenças nos padrões de expressão em cada grupo de pacientes infectados por HTLV-1

Os resultados demonstraram que cada grupo estudado apresentou uma peculiaridade nas expressões dos fatores. Nos pacientes PET/MAH, o que se notou foi uma expressão semelhante entre os 3 fatores, sendo que a expressão de FOXP3 foi ligeiramente menor em comparação aos fatores TBET e GATA3, mas não foi estatisticamente significante ($p=0,4282$). Os pacientes assintomáticos e MOS apresentaram maior expressão de GATA3 em relação aos outros fatores, sendo que, para os assintomáticos, esta maior expressão foi significante ($p=0,0007$). Não há trabalhos que analisem as expressões destes fatores nos três grupos estudados, já que esta classificação foi recentemente descrita por este grupo (KOYAMA *et al.*, 2019). Os trabalhos publicados separam em pacientes PET/MAH e assintomáticos. Outro ponto é que os trabalhos não mostram o perfil dos fatores de transcrição nos grupos estudados, mas sim comparando a expressão dos fatores entre os grupos. Com isso, houve dificuldade para comparar com os resultados obtidos. Estes resultados são inéditos e pode-se verificar que os grupos descritos por Koyama *et al.* (2019) se apresentaram com perfis diferentes em relação à expressão dos fatores. Nota-se que os pacientes PET/MAH apresentaram um perfil diferente em relação aos outros grupos, com tendência a Th1. Já os outros grupos apresentaram a expressão maior de GATA3, sendo que este fato foi intrigante em relação aos pacientes MOS, os quais apresentam uma mielopatia incompleta. Estes se assemelharam aos pacientes assintomáticos, e não aos pacientes PET/MAH, o que era esperado. Talvez isso possa indicar um novo caminho de patogênese, já que não se pode afirmar se os pacientes evoluirão ou não para a PET/MAH.

Ao avaliar a expressão dos fatores entre os grupos, verificou-se que TBET apresentou uma tendência de maior expressão nos pacientes PET/MAH, mas não significativa ($p=0,7474$). Em relação ao GATA3, a maior expressão foi nos pacientes assintomáticos ($p=0,0203$). Já o fator FOXP3 apresentou tendência de maior expressão nos pacientes assintomáticos, porém não significativa ($p=0,7597$). Nishiura *et al.* (2004) também encontrou que a expressão de TBET foi semelhante entre pacientes com PET/MAH e assintomáticos, porém, em relação ao GATA3, os resultados foram inversos ao deste trabalho. A expressão de GATA3 foi maior em pacientes com PET/MAH, porém sem significância estatística. Em relação ao FOXP3, estudos mostram que a infecção por HTLV-1 pode diminuir a expressão de FOXP3, IL-10 e TGF- β , causando desbalanço na inflamação que permanece na doença (SANTOS *et al.*, 2006; YAMANO *et al.*, 2009; OHKURA; SAKAGUCHI, 2010; RAMIREZ *et al.*, 2010; SATOU; MATSUOKA, 2010; YASUNAGA; MATSUOKA, 2011; ARAYA *et al.*, 2011). Ghezeldasht *et al.* (2017) mostraram que em pacientes com PET/MAH, a expressão de FOXP3 foi inferior em relação aos pacientes assintomáticos. Em contrapartida, Oh *et al.* (2006) expuseram que os pacientes com PET/MAH apresentaram menor quantidade de células FOXP3+ em relação aos pacientes assintomáticos e indivíduos não infectados por HTLV-1. Novamente, não há estudos com a classificação de pacientes utilizada neste estudo. Chamando a atenção para os pacientes MOS, nesta análise, este grupo se assemelhou aos pacientes assintomáticos na expressão de TBET, porém, em relação às expressões de GATA3 e FOXP3, estes se assemelharam aos pacientes PET/MAH. Isso reforça o que foi visto anteriormente, indicando um novo caminho da patogênese do HTLV-1.

A avaliação do equilíbrio entre os fatores demonstrou dados interessantes. Os pacientes PET/MAH não apresentaram correlação entre TBET x GATA3 e TBET x FOXP3, o que pode indicar uma perda de equilíbrio entre as respostas ($r=-0,1071$, $p=0,7039$ e $r=0,2964$, $p=0,2834$, respectivamente). Apenas a correlação moderada entre FOXP3 e GATA3 continuou presente ($r=0,633$, $p=0,0103$). Nishiura *et al.* (2004) também mostraram que TBET x GATA3 apresentaram uma correlação fraca, porém, diferentes deste estudo, foi estatisticamente significativa.

Os pacientes MOS, igual ao que foi visto nos pacientes PET/MAH, as correlações entre e os TBET x GATA3 e TBET x FOXP3 também foram ínfimas, sem significância estatística. Não há trabalhos com esta nova classificação, mas pode-se perceber que há um desequilíbrio nas respostas semelhante ao que é visto na PET/MAH.

Os pacientes assintomáticos apenas perderam a correlação entre TBET x GATA3 ($r=0,3676$, $p=0,1612$). Diferente ao que foi encontrado por Nishiura *et al.* (2004) que mostram uma correlação moderada entre eles nos pacientes assintomáticos e significante estatisticamente.

Estes resultados obtidos indicam que há diferenças entre os grupos descritos por Koyama *et al.* (2019). Nota-se que os pacientes MOS que apresentam uma mielopatia incompleta, em relação ao perfil dos fatores de transcrição, foram semelhantes aos pacientes assintomáticos. Em contrapartida, em relação às correlações, estes pacientes foram semelhantes aos pacientes PET/MAH. Isso pode indicar que, os pacientes MOS apresentam um desequilíbrio da resposta imunológica que aparentemente pode levar a uma nova condição neurológica.

6 CONCLUSÃO

1) Os pacientes PET/MAH apresentaram expressão dos fatores TBET, GATA3 e FOXP3 semelhantes.

2) Os pacientes MOS e assintomáticos apresentaram maior expressão de GATA3 em relação aos outros fatores, porém apenas para os pacientes assintomáticos foi estatisticamente significante.

3) Os pacientes PET/MAH e os MOS apresentam correlação apenas entre GATA3 x FOXP3. As correlações entre TBET x GATA3 e TBET x FOXP3 foram perdidas.

4) Os pacientes assintomáticos apenas perderam a correlação entre TBET e GATA3.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, A. Q. C. *et al.* **HAM/TSP Brazilian study group. - HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in Brazil: a nationwide survey.** J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol; v.19: p.536-541. 1998.

ARAYA, N. *et al.* **Human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and regulatory T cells in HTLV-1-associated neuroinflammatory disease.** Viruses. v. 3, n. 9, p. 1532-1548, 2011. DOI: 10.3390/v3091532.

ARAYA, N. *et al.* **HTLV-1 induces a Th1-like state in CD4+CCR4+ T cells.** J Clin Invest. Baltimore, v.124, n. 8, p. 3431–3442. Ago. 2014.

BARATELLA, M.; FORLANI, G.; ACCOLLA, R. S. **HTLV-1 HBZ Viral Protein: A Key Player in HTLV-1 Mediated Diseases.** Frontiers in Microbiology. Switzerland, v. 8, n. 2615, 2017.

BARROS, N. *et al.* **CD4+ T cell subsets and Tax expression in HTLV-1 associated diseases.** Pathogens and Global Health. London, v. 107, n. 4, 2013.

BOXUS, M.; WILLEMS L. **Mechanisms of HTLV-1 persistence and transformation.** British Journal of Cancer. London, v. 101, p. 1497–1501, 2009. doi:10.1038/sj.bjc.6605345

BOXUS, M.; WILLEMS, L. **How the DNA damage response determines the fate of HTLV-1 Tax-expressing cells.** Retrovirology. London, v. 9, n. 2, 2012.

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

COSTA, C.M.C.; SANTOS, T.J.T. **Paraparesia espástica tropical (ou mielopatia associada ao retrovírus HTLV-I - PET/MAH).** Revista Brasileira de Medicina. São Paulo, v. 60, n 9, p. 703-708. 2003.

DIAS, G.A.S., *et al.* **Neurological manifestations in individuals with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in the Amazon.** Spinal Cord. Switzerland, v. 54, n. 2, p.154-157, 2016. doi:10.1038/sc.2015.112.

ECHEVARRIA-LIMA, J., *et al.* **Protein Profile of Blood Monocytes is Altered in HTLV-1 Infected Patients: Implications for HAM/TSP Disease.** Scientific Reports. London, v. 8, n. 1. Set. 2018.

ENOSE-AKAHATA, Y.; VELLUCCI, A.; JACOBSON S. **Role of HTLV-1 Tax and HBZ in the Pathogenesis of HAM/TSP.** Front. Microbiol. Switzerland, v. 8, p. 2563. 2017.

FUTSCH, N.; MAHIEUX, R.; DUTARTRE, H. **HTLV-1, the Other Pathogenic Yet Neglected Human Retrovirus: From Transmission to Therapeutic Treatment.** Viruses. Switzerland, v. 10, n. 1, p. 2-25. Jan. 2018.

FUZII, H. T. *et al.* **Immunopathogenesis of HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP).** Life Sciences – Elsevier. Netherlands, 2014. Acesso em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2014.03.025>> Acesso em: 21 de março de 2019.

GHEZELDASHT, S.A. *et al.* **Evaluation of T Regulatory Lymphocytes Transcription Factors in HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP) Patients.** Appl Biochem Biotechnol. New York City, v. 182, p. 1403–1414, 2017.

GILLI, S. C. O.; SALLES, T. S. I.; SAAD, S. T. O. **Decreased GATA3 mRNA Expression in Human T-cell Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1) Infection.** Scandinavian Journal of Infectious Diseases. London, v. 32, p. 161–163, 2000.

GILLI, S.C.; SALLES T.S.; SAAD, S.T. **Regulation of the GATA3 promoter by human T-cell lymphotropic virus type I Tax protein.** J Cell Biochem, v. 96, n. 6, p. 1178-87. 15 Dec 2004. Disponível em < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15486968> >. Acesso em 25 Abril de 2019. DOI: 10.1002/jcb.20290.

GLÓRIA, L. *et al.* **Perfil clínico-epidemiológico de pacientes infectados pelo HTLV-1 em Belém/Pará.** Cad. Saúde Colet. Rio de Janeiro, v. 23, n. 2, p. 157-162. Jun. 2015. Disponível em < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1414-462X2015000200157 >. Acesso em 14 março de 2018.

JACOBSON, S. **The NK cell as a new player in the pathogenesis of HTLV-I associated neurologic disease.** Virulence. London, v. 1, n. 1, p. 8-9, 2010. doi: 10.4161/viru.1.1.10327

KOYAMA, R. V. L. *et al.* **Incomplete myelopathy and human T cell lymphotropic virus type-1 (HTLV-1).** J. Neurovirol. Switzerland, v. 25, n. 1, 2019.

KUBOTA, R. **Pathogenesis of human T-lymphotropic virus type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis.** *Clinical and Experimental Neuroimmunology*. v. 8, n. 2, p. 117–128, 2017. Disponível em < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/cen3.12395> > . Acesso em 13 março de 2018.

MAHIEUX, R.; GESSAIN, A. **HTLV-3/STLV-3 and HTLV-4 Viruses: Discovery, Epidemiology, Serology and Molecular Aspects.** *Viruses*. Switzerland, v. 3, p. 1074-1090, 2011.

MARTIN, J. L. *et al.* **Molecular Studies of HTLV-1 Replication: An Update.** *Viruses*. Switzerland, v. 8, n. 31, 2016. doi:10.3390/v8020031

MOZHGANI, S. *et al.* **Interferon Lambda Family along with HTLV-1 Proviral Load, Tax, and HBZ Implicated in the Pathogenesis of Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis.** *Neurodegener Dis*. Switzerland, v. 18, n. 2, p.150-155. Aug. 2018.

MOZHGANI, S. *et al.* **Human T-lymphotropic virus 1 (HTLV-1) pathogenesis:A systems virology study.** *J Cell Biochem*. v.119, n. 5, p. 3968-3979. Jan. 2018. Disponível em < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29227540> > . Acesso em 21 março de 2018.

MS - MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de manejo clínico da infecção pelo HTLV.** Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Brasília – DF. 1ª edição. p. 7-11, 2013.

NECO, H.V.C. **Estudo de associação do polimorfismo G-197A do gene IL17 na infecção pelo Vírus Linfotrópico da Célula T Humana Tipo 1 (HTLV-1).** Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz. Recife, p. 30. 2015.

NISHIURA, Y, *et al.* **Increased mRNA expression of Th1-cytokine signaling molecules in patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis.** *Tohoku J Exp Med*. Sendai, v. 204, n.4, p.289-98. Oct. 2004.

NORRIS, P. J. *et al.* **Human T cell leukemia virus type 1 infection drives spontaneous proliferation of natural killer cells.** *Virulence*. London, v. 1, n. 1, p. 19-28, January/February, 2010.

OH, U. *et al.* **Reduced Foxp3 Protein Expression Is Associated with Inflammatory Disease during Human T Lymphotropic Virus Type 1 Infection.** JII. Arlington, v. 193, p. 1557-1566. June 2006.

OHKURA, N.; SAKAGUCHI, S. **Regulatory T cells: roles of T cell receptor for their development and function.** Semin Immunopathol. Switzerland, v. 32, p. 95–106, 2010. doi: 10.1007/s00281-010-0200-5.

PEREIRA, W. A.; MESQUITA, E. M. **Vírus Linfotrópico de células T Humana (HTLV): doenças associadas e dificuldades no diagnóstico e tratamento.** Rev. Investig. Bioméd. São Luís, v. 8, p. 92-101, 2016.

QUARESMA, J. A. S. *et al.* **HTLV-1, Immune Response and Autoimmunity.** Viruses. Switzerland, v. 8, n. 5, 2016. doi:10.3390/v8010005

RAMIREZ E. *et al.* **In vivo fluctuation of Tax, Foxp3, CTLA-4, and GITR mRNA expression in CD4(+)CD25(+) T cells of patients with human T-lymphotropic virus type 1-associated myelopathy.** Braz J Med Biol Res. Ribeirão Preto, v. 43, p. 1109–1115, 2010.

RIBEIRO, M. A. *et al.* **Geographic distribution of human T-lymphotropic virus types 1 and 2 among mothers of newborns tested during neonatal screening.** Rev. Panam. Salud. Publica. Minas Gerais, v. 27, n. 5, p. 330-7, 2010.

ROMANELLI, L. C. F.; CARAMELLI, P.; PROIETTI, A. B. F. C. **O vírus linfotrópico de células T humanos tipo 1 (HTLV-1): Quando suspeitar da infecção?** Rev. Assoc. Med. Brás., Minas Gerais, v. 56, n. 3, p. 340-7, 2010.

SAITO, M. **Immunogenetics and the Pathological Mechanisms of Human T-Cell Leukemia VirusType 1- (HTLV-1-)Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP).** Interdiscip. Perspect. Infect. Dis., Okinawa, 2010.

SAITO, M., BANGHAM, C. R. **Immunopathogenesis of Human T-Cell Leukemia Virus Type-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis: Recent Perspectives.** Leukemia research and treatment. London, v. 2012. Feb. 2012.

SANTOS S. B. *et al.* **Modulation of T cell responses in HTLV-1 carriers and in patients with myelopathy associated with HTLV 1.** Neuroimmunomodulation. Switzerland, v. 13, p. 145–151, 2006.

SANTOS, A. C. C.; SOARES D. J.; RIVEMALES, M. C. C. **(Des)conhecimento, adoecimento e limitações impostas pelo HTLV: experiências de mulheres soropositivas.** Cad. Saúde Colet. Rio de Janeiro, v. 25, n. 1, p. 45-50. Fev. 2017.

SANTOS, S. B.; MUNIZ, A. L.; CARVALHO, E. M. **Imunopatogênese da Mielopatia Associada ao HTLV-I.** Gazeta Médica da Bahia, Salvador, v. 79, n. 1, p. 11-17, 2009.

SATOU, Y.; MATSUOKA, M. **HTLV-1 and the host immune system: how the virus disrupts immune regulation, leading to HTLV-1 associated diseases.** J. Clin. Exp. Hematop., Kyoto, v. 50, n. 1, p. 1-8, 2010.

SERQUEIRA, C. G. **Descriptive study of HTLV infection in a population of pregnant women from the State of Pará, Northern Brazil.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Brasília – DF, v. 45, n. 4, p. 453-456, Jul-Aug, 2012.

SILVA, I.C. *et al.* **Moderada endemicidade da infecção pelo vírus linfotrópico-T humano na região metropolitana de Belém, Pará, Brasil.** Revista Brasileira de Epidemiologia. Rio de Janeiro, v. 21, 2018. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1415790X2018000100417&lng=en&nrm=i&tlng=pt>. Acesso em 18 março de 2018.

SLATER, C.M.S.A.; RIBEIRO L.C.P.; PUCCIONI-SOHLER, M. **Difficulties in HAM/TSP diagnosis.** Arq Neuropsiquiatr. São Paulo, v. 70, n. 9, p. 686-690. Sep. 2012.

SOUZA, A., *et al.* **Neurological diseases associated with HTLV-1 Infection.** Rev Soc Bras Med Trop. Uberaba, v. 45, n.5, p.545-552. Sep 2012. Disponível em <<http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822012000500002>> . Acesso em 18 março de 2018.

TAROKHIAN, H., *et al.* **HTLV-1-host interactions on the development of adult T cell leukemia/lymphoma: virus and host gene expressions.** BMC Cancer. London, v. 18, n. 1, p. 1287. Dec. 2018.

TAVARES, Í.R. **Lombalgia e paraparesia espástica tropical / mielopatia associada ao HTLV-I (PET/MAH).** Dissertação (mestrado) - UFRJ, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-graduação em Clínica Médica (Neurologia), 2009. Rio de Janeiro, p.5. 2009.

YAMANO, Y. *et al.* **Abnormally high levels of virus-infected INF-beta +CCR4+CD4+CD25+ T cells in a retrovirus-associated neuroinflammatory disorder.**

Plos One. Kawasaki, v. 4, n. 8, 2009. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2715877/>> . Acesso em 10 março de 2018.

YAMANO, Y. *et al.* **Virus-induced dysfunction of CD4+CD25+ T cells in patients with HTLV-I-associated neuroimmunological disease.** J Clin Invest. Michigan, v. 115, n. 5, p.1361-1368. May. 2005.

YASUNAGA J, MATSUOKA M. **Molecular mechanisms of HTLV-1 infection and pathogenesis.** Int J Hematol. Switzerland, v. 94, n. 5, p. 435–442, 2011.

YU, F. *et al.* **Dynamic expression of T-bet and GATA3 by regulatory T cells maintains immune tolerance.** Nature Immunology. London, v. 16, n. 2, p. 197–206, 2015. doi: 10.1038/ni.3053.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS

Correlação entre os sintomas clínicos e o padrão de resposta imunológica periférica de pacientes acometidos por paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-I.

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

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

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

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Correlação entre os sintomas clínicos e o padrão de resposta imunológica periférica de pacientes acometidos por paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-I”.

Eu discuti com o George Alberto da Silva Dias sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim, quais são os propósitos, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro

também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Belém __/__/20__

Participante

Belém __/__/20__

Testemunha

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

Belém __/__/20__

APÊNDICE B – ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

CORRELAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE TBET, GATA3 E FOXP3 COM O DESENVOLVIMENTO DE MIELOPATIA EM PACIENTES PORTADORES DO HTLV-1.

Allef William França de Oliveira¹; Michel Douglas Silva de Sousa¹; Hellen Thais Fuzii².

⁽¹⁾Faculdade de Medicina, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brasil

⁽²⁾Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, Brasil

RESUMO

O vírus linfotrópico de células T humano do tipo 1 (HTLV-1) é um vírus endêmico em nossa região. Está associado ao desenvolvimento de diversas doenças e sintomas incapacitantes, a exemplo da Mielopatia Associada ao HTLV-1 (PET/MAH). A expressão gênica dos fatores de transcrição TBET, GATA3 e FOXP3, no desenvolvimento da mielopatia, aparenta ser determinante ao curso da doença. Este estudo, de caráter observacional, analítico e transversal, visou quantificar a expressão gênica desses fatores de transcrição nos pacientes, portadores do HTLV-1, que manifestaram mielopatia, em seus graus de evolução clínica. Participaram, desta pesquisa, pacientes, maiores de dezoito anos, diagnosticados com HTLV-1, atendidos e acompanhados no Laboratório de Clínica e Epidemiologia de Doenças Endêmicas, do Núcleo de Medicina Tropical da UFPA. Foram coletados dados clínicos e amostras de sangue dos pacientes para posterior isolamento e quantificação do RNA para síntese de cDNA e, em seguida, quantificar a expressão gênica de β -Actina, GAPDH, TBET, GATA3 e FOXP3. Os resultados mostraram 76 pacientes, sendo 39,47 % pacientes com PET/MAH, 35,53% Assintomáticos e 25% Monossintomáticos/Oligossintomáticos (MOS). Na correlação dos fatores de transcrição com as formas clínicas, houve maior expressão de TBET nos pacientes com PET/MAH, sem significância estatística ($p=0,4282$); os fatores GATA3 e FOXP3 se expressaram mais nos assintomáticos, com predomínio de GATA3 ($P=0,0007$). O GATA3 quando relacionado com o FOXP3, apresentou predomínio significativo nos indivíduos assintomáticos ($p=0,0019$) e MOS ($p=0,0209$). Conclui-se que o fator GATA3 parece ser determinante a um curso clínico diferente na evolução da mielopatia associada ao HTLV-1 (forma incompleta).

Palavras-chave: HTLV-1; PET/MAH; Fatores de transcrição.

ABSTRACT

Human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) is an endemic virus in our region. It is associated with the development of several disabling diseases and symptoms, such as HTLV-1 Associated Myelopathy (HAM/ TSP). The gene expression of the transcription factors TBET, GATA3 and FOXP3, in the development of this myelopathy, seems to be determinant to the course of the disease. This observational, analytical and cross-sectional study aimed to quantify the gene expression of these transcription factors in the steps of myelopathy manifestation, in patients with HTLV-1. Patients older than eighteen years old, diagnosed with HTLV-1, attended and followed up at the Laboratory of Clinical and Epidemiology of Endemic Diseases of the UFPA Tropical Medicine Center, participated in this study. Clinical data and blood samples were collected from patients for further isolation and quantification of RNA for cDNA synthesis and then quantification of the gene expression of β -Actin, GAPDH, TBET, GATA3 and FOXP3. The results showed 76 patients, 39.47% with HAM/ TSP, 35.53% Asymptomatic and 25% were Monosymptomatic/Oligosymptomatic patients (MOS). In the correlation of transcription factors with clinical forms, there was a higher expression of TBET in patients with HAM/ TSP, without statistical significance ($p = 0.4282$); the GATA3 and FOXP3 factors were expressed more in the asymptomatic ones, with predominance of GATA3 ($p = 0.0007$). GATA3, when related to FOXP3, showed a significant predominance in asymptomatic individuals ($p = 0.0019$) and MOS ($p = 0.0209$). It is concluded that the GATA3 factor seems to be determinant to a different clinical course in the evolution of myelopathy (incomplete form).

Key word: HTLV-1; HAM/ TSP; Transcription Factor.

INTRODUÇÃO

O vírus linfotrópico de células T humano do tipo 1 (HTLV-1) foi descrito pela primeira vez pela equipe de Robert Gallo em 1980 antes da descoberta do Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1 (HIV-1) (FUTSCH; MAHIEUX; DUTARTRE, 2018). A infecção pelo retrovírus HTLV-1 foi inicialmente associada com a leucemia/linfoma de células T do adulto (LLcTA) no Japão em 1977, sendo depois encontrado em outras partes do mundo. (OZAWA *et al.*, 2012; KROON; PROIETTI, 2015). Em seguida foi associada à Paraparesia Espástica Tropical, também conhecida como Mielopatia Associada ao HTLV-1 (PET/MAH) (SANTOS; SOARES; RIVEMALES, 2017; MOZHGANI *et al.*, 2018).

O número de pessoas infectadas pelo HTLV-1 é de aproximadamente de 10-20 milhões no mundo (GLÓRIA *et al.*, 2015; TAROKHIAN *et al.*, 2018). A distribuição do vírus não é uniforme no mundo, apresentando áreas altamente endêmicas, como o Japão, África Subsaariana, Caribe e América do Sul, Ilhas da Melanésia e Oriente Médio. (ENOSE-AKAHATA; VELLUCCI; JACOBSON, 2017; TAROKHIAN *et al.*, 2018). No Brasil, estima-se que existam aproximadamente 2,5 milhões de infectados, com prevalência que varia de 0,04 a 1%, sendo que os estados da Bahia, Pará e Maranhão apresentam as maiores taxas de prevalência para essa infecção em doadores de sangue (ECHEVARRIA-LIMA *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2018).

A PET/MAH é uma doença neuroinflamatória crônica, relacionada à resposta imunológica do hospedeiro à infecção. Tem um início insidioso e promove alterações motoras dos membros inferiores, o que leva a um distúrbio progressivo da marcha (SANTOS; SOARES; RIVEMALES, 2017). Manifesta-se com distúrbios autonômicos dos esfíncteres, como retenção e incontinência urinária, constipação, impotência nos homens e redução da libido em ambos os sexos. Os sintomas neurológicos são paraparesia espástica simétrica ou assimétrica, com hiperreflexia, clônus e sinal de Babinski nos membros inferiores, e hiperreflexia, mas raramente paresia nos membros superiores. (COSTA; SANTOS, 2003; NECO, 2015).

A fisiopatologia da PET/MAH ainda não é totalmente esclarecida. Acredita-se em três hipóteses para explicar o desenvolvimento da mielopatia associada ao HTLV-1 (MOZHGANI *et al.*, 2017; NECO, 2015). Na primeira ocorre citotoxicidade direta, na qual células T CD8+ infectadas pelo HTLV-1 seriam capazes de cruzar a barreira hematoencefálica e destruir as células da glia infectadas. Na segunda, ocorre mimetismo molecular, no qual a ribonucleoproteína nuclear heterogênea (hnRNP-A1), uma proteína neuronal do hospedeiro, é bastante semelhante a TAX, a proteína mais importante do vírus, e desencadeia um intenso processo inflamatório autoimune com lesão dos neurônios. E a última chamada de “bystander” ou dano circundante, é a mais aceita e trata-se da capacidade que linfócitos T CD4+ infectados e linfócitos T CD8+ específicos para TAX teriam em atravessar a barreira hematoencefálica e produzir grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias e neurotóxicas, como IFN- γ e TNF- α , ocasionando inflamação e destruição tecidual (NECO, 2015; FUTSCH; MAHIEUX; DUTARTRE, 2017).

O perfil de citocinas em resposta a infecção pelo HTLV-1 mostra um padrão de resposta Th1, com produção elevada de TNF- α e IFN- γ . Contudo, células mononucleares de portadores assintomáticos produzem níveis elevados de citocinas regulatórias IL-5 e IL-10 quando comparados com controles saudáveis, denotando que o perfil de resposta imunológica em pacientes portadores do HTLV-1 é tanto do tipo Th1 como do tipo Th2, produzidas principalmente por células T CD4+ (SANTOS *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2012; ANDO *et al.*, 2013; RAFATPANAH *et al.*, 2013). Entretanto, é amplamente documentado que a resposta imunológica no curso da infecção pelo HTLV-1 é o perfil Th1 (SOUZA-MACHADO *et al.*, 2003; OZAWA *et al.*, 2012; QUARESMA *et al.*, 2016).

Também foi descrito que o HTLV-1, nos pacientes com PET/MAH, pode interferir na função das células T reguladoras (células T CD4+ CD25+ Foxp3+) (ARAYA *et al.*, 2014; ENOSE-AKAHATA; VELLUCCI; JACOBSON, 2017). O vírus infecta células T-reg e modifica seu papel na regulação imunológica. A disfunção das células T-reg é associada à menor produção de citocinas reguladoras, IL-10 e TGF- β , que pode diminuir a ação anti-inflamatória, permitindo este caráter pró-inflamatório visto nesses (SAITO; BANGHAM, 2012; SOUZA *et al.* 2012; ARAYA *et al.*, 2014).

As células CD4 de cada perfil de resposta imunológica pode ser distinguido pela presença de fatores de transcrição relacionados a cada perfil. As células Th1 podem ser identificadas por expressar o fator de transcrição (TBET; codificado por TBX21) e são responsáveis por secretar a citocina pró-inflamatória IFN- γ , principalmente. As células Th2 apresentam a expressão da proteína 3 de ligação ao GATA (GATA3), com secreção das citocinas IL-4, -5 e -10. Já as Tregs são geralmente distinguidas pela expressão de FOXP3, com a secreção de citocinas reguladores, sobretudo IL-10 e TGF- β (ARAYA *et al.*, 2014).

Sendo a resposta imunológica importante no desenvolvimento da PET/MAH, o estudo das expressões dos fatores TBET, GATA3 e FOXP3 podem ajudar a entender melhor os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da doença. Com isso, foi avaliada a expressão de cada um destes fatores nos pacientes infectados por HTLV-1 que desenvolveram ou não PET/MAH.

MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto proposto é um estudo observacional, analítico e transversal que busca uma possível associação das expressões gênicas de TBET, GATA3 e FOXP3 com os diferentes graus de manifestação de Mielopatia em indivíduos, maiores de 18 anos, portadores do HTLV-1, estabelecendo esta associação com os indivíduos que desenvolveram a doença e com os que não manifestaram sintomas. Os pacientes foram atendidos e acompanhados no Laboratório de Clínica e Epidemiologia de Doenças Endêmicas, do Núcleo de Medicina Tropical (NMT), da Universidade Federal do Pará (UFPA). As amostras sanguíneas e os dados clínicos foram processados e analisados no Laboratório de Imunopatologia do Núcleo de Medicina Tropical, setor de ensino (pós-graduação), pesquisa e extensão em doenças tropicais e demais temas regionais. Foram excluídos pacientes que apresentem déficit cognitivo, coinfeção com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) ou outras doenças inflamatórias e/ou infecciosas que cursam com lesões neurológicas em seu decorrer clínico/cronológico.

- População estudada:

Foram coletados dados clínicos e amostras sanguíneas de pacientes HTLV-1 que foram atendidos no Laboratório de Clínica e Epidemiologia de Doenças Endêmicas, do Núcleo de Medicina Tropical (NMT). A classificação de Mielopatia completa (PET/MAH) ou incompleta, nesses indivíduos, foi determinada, de acordo com os critérios de Koyama *et al.* (2019), durante o atendimento, mediante avaliação clínica e exames complementares que constaram em prontuário de atendimento, classificando os pacientes em Assintomáticos, Monossintomáticos/Oligossintomáticos (MOS) e portadores de PET/MAH. O diagnóstico de PET/MAH foi estabelecido segundo os critérios da OMS (1989) (Anexo A), observando achados clínicos e laboratoriais relacionados à doença e à infecção pelo HTLV-1.

- Coleta de sangue, separação e contagem das células linfomononucleares:

Após a avaliação clínica de cada paciente selecionado, foi coletada amostra de 5mL de sangue em tubo com EDTA (Ácido Etilenodiamino Tetra-acético). Em seguida, todo o sangue foi transferido para um tubo tipo Falcon (Labcon) de 50mL, para ser diluído em 5mL de PBS (Tampão Fosfato-salino), com volume final de 10mL. Em outro tubo tipo falcon de mesma proporção, foi adicionado 5mL de Ficoll-paque™ Plus (GE Healthcare), transferindo-se cuidadosamente para este tubo todo o sangue diluído anteriormente. Após este procedimento, o conteúdo foi centrifugado para a separação das células linfomononucleares a 2000 rpm por 30 minutos e a 15°C, utilizando a centrífuga Heltich Zentrifugen Universal 320 R. Após esta primeira centrifugação, as células linfomononucleares foram retiradas e transferidas para outro tubo tipo falcon. Em seguida, foram lavadas em 5 mL de PBS e centrifugadas a 4000 rpm por 20 minutos e a 15°C. Ao término desta centrifugação, foi desprezado o sobrenadante, restando apenas um *pellet* de células no fundo do tubo. A estas células restantes, foi acrescentado 1 mL de PBS e em seguida, serão transferidas para o microtubo (Labcon) de 1,5mL. Deste microtubo, foi retirada amostra de 10µL para a contagem de células linfomononucleares. O restante da amostra será congelado em refrigerador (Ultra Low Sanyo) a -80°C.

Para a contagem celular, foi utilizada a câmara de Neubauer. Este procedimento utilizou 10µL de células (retirados anteriormente) que foram diluídas em 90µL de PBS (diluição de 1:10). A contagem foi realizada utilizando os quatro quadrantes maiores laterais e após este procedimento, o número total de células foi dividido por quatro (número de quadrantes existentes), multiplicados por dez (fator de diluição) e seguido da multiplicação por 10.000, obtendo-se assim o número de células/mL de cada paciente.

- Isolamento e quantificação do RNA:

De cada paciente, o RNA total foi extraído de 10⁶ células linfomononucleares, previamente calculadas. A extração de RNA foi realizada pelo método do Trizol, de acordo com o protocolo do fabricante. Em microtubo de 1,5mL, foi acrescentado às células linfomonucleares 1000µL de Trizol (Trizol® Reagent – Invitrogen) e 200µL de clorofórmio (Merck) a cada tubo. Após homogeneização por 2 minutos em Agitador Vortex Quimis, o conteúdo foi centrifugado na centrífuga Eppendorf Centrifuge 5415R a 12.000 rpm por 10 minutos a 6^oC. Após este período, o sobrenadante de cada tubo foi transferido para outro microtubo de 1,5mL, contendo 500µL de isopropanol (Merk) e em seguida homogeneizado manualmente. Este microtubo foi armazenado em refrigerador

a -20°C para precipitação por um período mínimo de 24 horas. Decorrido este período, uma nova centrifugação a 12.000 rpm, por 20 minutos a 4°C, ocorreu. Após centrifugação, foi retirado o sobrenadante, restando o *pellet* de RNA no lado e no fundo do tubo, e a este RNA precipitado foi acrescentado 1000µL de etanol 70% (Merk) em água DEPC (dietil pirocarbonato), e assim centrifugado a 12.000 rpm, por 20 minutos a 4°C, para ser realizada a lavagem do RNA. Após esta lavagem, o *pellet* de RNA foi desidratado por evaporação a 37°C, e diluído em 30µL de água DEPC.

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

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

- Síntese de cDNA:

Inicialmente, após a extração e quantificação do RNA total, foi realizada a transcrição reversa a partir de 1 µg de RNA total. A transcrição reversa, das amostras, será realizada para a obtenção do cDNA, a ser utilizado na reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR). Deste modo, este procedimento foi realizado utilizando o *kit Superscript III (Superscript® III Reverse Transcriptase – Invitrogen)* de acordo com o protocolo do fabricante. Na reação, foram acrescentados 1µg da amostra de RNA de cada paciente (previamente quantificadas), oligo dT 500 pmol/mL e dNTP a 10mM, com volume final de 13mL. A reação foi incubada a 65°C por 5 minutos no termociclador (Eppendorf Mastercycler) e transferida imediatamente para o gelo. Foram adicionados, então, 5 µL de tampão 5x (*first strand buffer*), 1µL de DTT (ditiotretitol) 10 mM, 1µL de MgCl₂ a 50mM e 1µL de *Super script III* 10.000U – 200U/mL, com volume final de 20 µL, levando-se a reação a 50°C por 50 minutos. Depois a enzima foi inativada, aquecendo-se a solução a 85°C por 5 minutos. Após o término da reação, em cada amostra, foi acrescentado 10µL de água destilada ultrapura Gibco (Invitrogen), totalizando um volume final de 30µL.

- Quantificação da expressão gênica de β-Actina, GAPDH, TBET, GATA3 e FOXP3:

No presente estudo, foi realizada a quantificação relativa. Para a detecção dos amplicons, foi utilizado o agente fluorescente CxR. As amostras foram feitas em duplicata. Os oligonucleotídeos iniciadores (primers), utilizados para as reações de q-PCR em tempo real, foram os primers para β-Actina, GAPDH e para os fatores de transcrição moduladores da resposta imunológica celular Th1 (TBET), Th2 (GATA3) e Treg (FOXP3).

A reação de qPCR foi realizada no StepOnePlus (Real Time PCR Systems – Applied Biosystems) com o GoTaq qPCR (Promega). Foram utilizados 1µL do cDNA, GoTaq qPCR master mix (2x), primers (18uM) (*Foward and Reverse*), e água Milli Q autoclavada qsp 20µL. Após um período de 10 minutos, a 50°C, para ativação da enzimas e um de 5 minutos, a 95°C, para desnaturação de proteínas, foram executados 45 ciclos de 95°C por 30 segundos e 60°C por 1 minuto. Ao final, foi realizado o protocolo de dissociação térmica, para controle da especificidade da reação.

Os resultados serão analisados pelo StepOne TM Software v2.0. Para a quantificação relativa, será realizado o seguinte cálculo: inicialmente determinará o cycle threshold (CT), dado pelo número do ciclo em que o sinal de fluorescência atingirá a linha limiar (threshold line), ou seja, a linha em que a emissão de fluorescência está acima do ruído de fundo (background). O CT encontra-se invariavelmente na região correspondente à fase exponencial da amplificação, o que torna mais acurada a estimativa de quantificação dos transcritos na amostra original. Os valores de CT dos genes de interesse serão normalizados em relação ao CT dos genes constitutivos, o GAPDH (do inglês Gylceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) e a β-actina, resultando o ΔCT, que é o CTgene - CTconstitutivo. Por fim, será calculado o 2^{-ΔCT}, sendo este o valor a ser trabalhado como representante da expressão relativa para cada gene.

- Análise dos dados:

O *software* Excel 2010 foi utilizado para entrada dos dados, bem como para a confecção das tabelas. A análise estatística foi realizada por meio dos *softwares* BioEstat 5.0 e o *GraphPad Prism 5.0*. Na confecção dos gráficos foi utilizado o *software GraphPad Prism 5.0*.

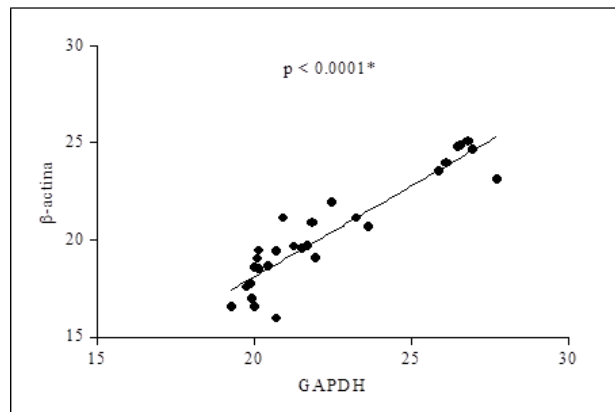
Foi utilizado o teste de Mann-Whitney para a comparação entre as diferenças de expressão gênica das citocinas e dos fatores de transcrição para os perfis imunológicos entre os grupos estudados. Para a correlação entre os

achados dos perfis de resposta imunológica periférica e os achados clínicos, foi utilizado o Teste de Correlação de Pearson. Foi adotado um valor de $p \leq 0,05$ como nível de significância.

RESULTADOS

Foram incluídos no estudo 76 pacientes, sendo 30 pacientes (39,47%) apresentaram PET/MAH, 27 eram assintomáticos (35,53%) e 19 MOS (25%). Para a quantificação relativa, utilizou-se os genes constitutivos GAPDH e β -actina. O primeiro gráfico mostra a correlação entre os CTs dos dois genes constitutivos, mostrando forte correlação entre eles (Figura 1).

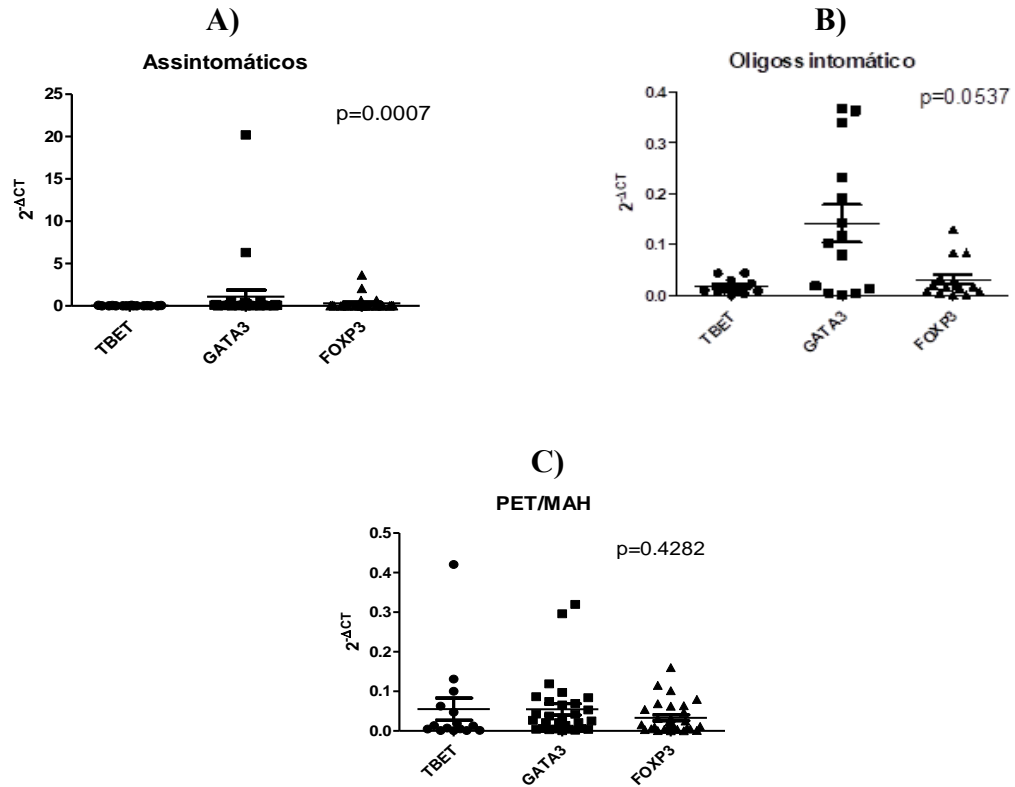
FIGURA 1 – Correlação da expressão dos genes constitutivos dos pacientes infectados pelo HTLV-1, de acordo com o CT em escala linear, $r = 0,9223$, $p < 0,0001$. Correlação de Pearson, $p < 0,05$.



Fonte: Próprios autores.

Os dados deste estudo foram descritos com os resultados obtidos com GAPDH. As expressões de TBET, GATA3 e FOXP3 para os pacientes assintomáticos, MOS e PET/MAH estão representados nos gráficos das figuras 2 e 3. A análise estatística mostrou que a expressão do fator de transcrição GATA3 foi maior em relação às expressões de TBET e FOXP3 nos pacientes assintomático e MOS, com significância estatística nos pacientes assintomáticos ($p < 0,0007$) (Fig.2A) e sem significância estatística nos pacientes MOS ($p=0,0537$) (Fig.2B). Nos pacientes com PET/MAH, houve menor expressão do fator de transcrição FOXP3. Os fatores TBET e GATA3 se apresentaram semelhantes, porém sem significância estatística $p=0,4282$ (Fig.2C).

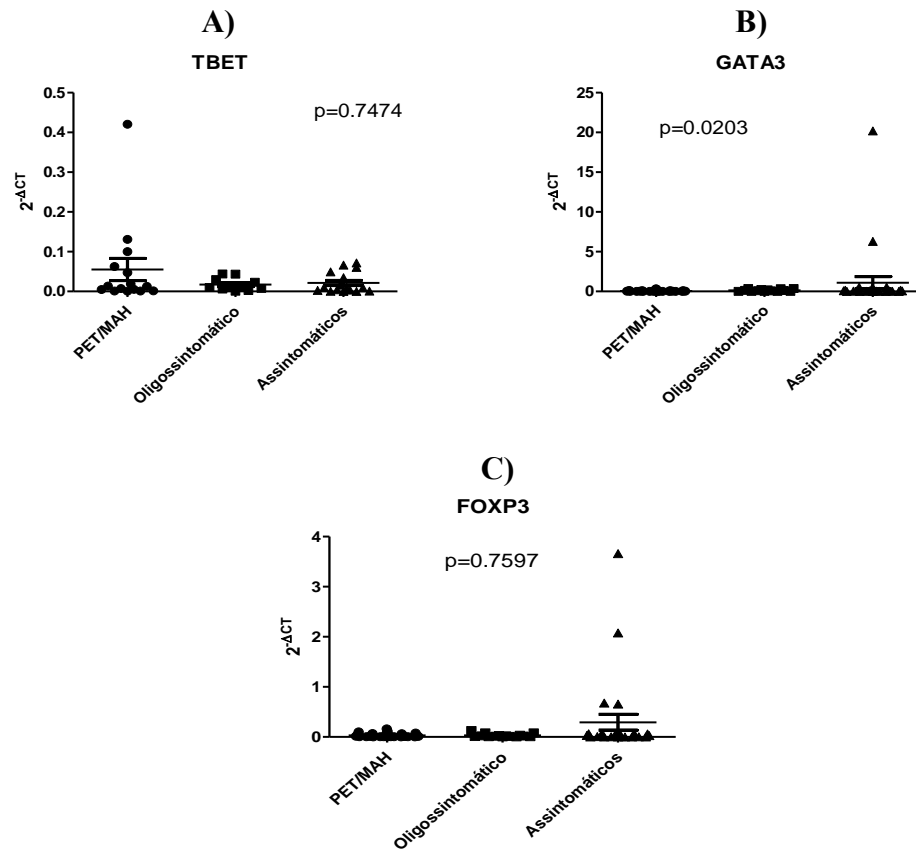
FIGURA 2 – Expressão gênica dos fatores de transcrição TBET, GATA3 E FOXP3 segundo os CTs de GAPDH em escala Log^2 . **(A)** Expressão gênica dos fatores transcrição TBET, GATA3 E FOXP3 nos pacientes assintomáticos ($p < 0.0007$). **(B)** Expressão gênica dos fatores transcrição TBET, GATA3 E FOXP3 nos pacientes monossintomáticos ($p = 0.0537$). **(C)** Expressão gênica dos fatores transcrição TBET, GATA3 E FOXP3 nos pacientes com PET/MAH ($p < 0.4282$). Teste de Mann-Whitney, $p \leq 0.05$.



Fonte: Próprios autores.

Ao comparar os níveis de expressão do fator de transcrição TBET nos grupos estudados, nota-se que houve maior expressão gênica no grupo com PET/MAH, porém sem significância estatística ($p= 0.7474$) (Fig.3A). Em relação à expressão do fator de transcrição GATA3, houve maior expressão no grupo assintomático, e foi estatisticamente significativa ($p=0,0203$) (Fig.3B). Na análise da expressão de FOXP3, houve maior expressão no grupo de assintomáticos, mas, sem significância estatística ($p=0.7597$) (Fig.3C).

FIGURA 3 – Expressão gênica dos fatores de transcrição TBET, GATA3 E FOXP3 segundo os CTs de GAPDH em escala Log^2 . **(A)** Expressão gênica do fator TBET nos grupos de pacientes estudados ($p < 0.7474$). **(B)** Expressão gênica do fator GATA3 nos grupos de pacientes estudados ($p < 0.0203^*$). **(C)** Expressão gênica do fator FOXP3 nos grupos de pacientes estudados ($p < 0.7597$). Teste de Mann-Whitney, $p \leq 0.05$.



Fonte: Próprios autores.

Em seguida, foram analisadas as correlações entre os genes em cada grupo. Nos pacientes assintomáticos, foi visto que TBET e GATA3 se correlacionaram positivamente com FOXP3 de forma significativa ($p=0,0010$ e $p=0,0019$, respectivamente). Já a correlação entre TBET x GATA3 foi fraca e não significativa ($p=0.1612$) (Tabela 1).

TABELA 1 – Correlação entre os fatores de transcrição TBET, GATA3 E FOXP3 nos pacientes assintomáticos. Correlação de Pearson, $p \leq 0.05$.

CORRELAÇÃO	r	valor de p
Tbet x GATA3	0.3676	0.1612
Tbet x FOXP3	0.7607	0.0010*
GATA3 x FOXP3	0.7321	0.0019*

Fonte: Próprios autores.

Nos pacientes MOS, apenas GATA3 x FOXP3 apresentou correlação positiva significativa ($p=0.0209$). Em relação às análises entre TBET x GATA3 e TBET x FOXP3, não houve correlação ($p=0.8287$ e $p=0.6307$, respectivamente) (Tabela 2).

TABELA 2 – Correlação entre os fatores de transcrição TBET, GATA3 E FOXP3 nos pacientes oligossintomáticos. Correlação de Pearson, $p \leq 0.05$.

CORRELAÇÃO	r	valor de p
Tbet x GATA3	-0.07879	0.8287
Tbet x FOXP3	0.1636	0.6307
GATA3 x FOXP3	0.6088	0.0209*

Fonte: Próprios autores.

Nos pacientes com PET/MAH, os resultados foram semelhantes ao encontrado nos pacientes MOS. GATA3 e FOXP3 apresentaram correlação positiva significativa ($p=0.0103$). Já para TBET x GATA3 e TBET x FOXP3, não houve correlação significativa ($p=0.7039$) e $p=0.2834$, respectivamente) (Tabela 3).

TABELA 3 – Correlação entre os fatores de transcrição TBET, GATA3 E FOXP3 nos pacientes com PET/MAH. Correlação de Pearson, $p \leq 0.05$.

CORRELAÇÃO	r	valor de p
Tbet x GATA3	-0.1071	0.7039
Tbet x FOXP3	0.2964	0.2834
GATA3 x FOXP3	0.6393	0.0103*

Fonte: Próprios autores.

DISCUSSÃO

Os mecanismos imunológicos envolvidos no desenvolvimento da PET/MAH ainda não estão bem esclarecidos. As alterações imunológicas, com destaque à tendência a uma resposta Th1, são características importantes que indicam um caminho fisiopatológico para a doença (NISHIURA *et al.*, 2004; ARAYA *et al.*, 2014). O aumento da expressão de IFN- γ , com diminuição de IL-4 e IL-10, já foi descrito em outros trabalhos (YAMANO *et al.*, 2005; FUZII *et al.*, 2014). Com isso, este estudo visou a análise da expressão dos fatores de transcrição associados às respostas Th1, Th2 e Treg (TBET, GATA3 e FOXP3, respectivamente) para verificar se há diferenças nos padrões de expressão em cada grupo de pacientes infectados por HTLV-1.

Os resultados demonstraram que cada grupo estudado apresentou uma peculiaridade nas expressões dos fatores. Nos pacientes PET/MAH, o que se notou foi uma expressão semelhante entre os 3 fatores, sendo que a expressão de FOXP3 foi ligeiramente menor em comparação aos fatores TBET e GATA3, mas não foi estatisticamente significativa ($p=0,4282$). Os pacientes assintomáticos e MOS apresentaram maior expressão de GATA3 em relação aos outros fatores, sendo que, para os assintomáticos, esta maior expressão foi significativa ($p=0,0007$). Não há trabalhos que analisem as expressões destes fatores nos três grupos estudados, já que esta classificação foi recentemente descrita por este grupo (KOYAMA *et al.*, 2019). Os trabalhos publicados separam em pacientes PET/MAH e assintomáticos. Outro ponto é que os trabalhos não mostram o perfil dos fatores de transcrição nos grupos estudados, mas sim comparando a expressão dos fatores entre os grupos. Com isso, houve dificuldade para comparar com os resultados obtidos. Estes resultados são inéditos e pode-se verificar que os grupos descritos por Koyama *et al.* (2019) se apresentaram com perfis diferentes em relação à expressão dos fatores. Nota-se que os pacientes PET/MAH apresentaram um perfil diferente em relação aos outros grupos, e, os pacientes MOS, que apresentam uma mielopatia incompleta, mostraram um perfil dos fatores mais semelhante aos pacientes assintomático. Isto é intrigante pois, o esperado seria uma semelhança maior com os pacientes PET/MAH. Talvez isso possa indicar um novo caminho de patogênese, já que não se pode afirmar se os pacientes evoluirão ou não para a PET/MAH.

Ao avaliar a expressão dos fatores entre os grupos, verificou-se que TBET apresentou uma tendência de maior expressão nos pacientes PET/MAH, mas não significativa ($p=0,7474$). Em relação ao GATA3, a maior expressão foi nos pacientes assintomáticos ($p=0,0203$). Já o fator FOXP3 apresentou tendência de maior expressão nos pacientes assintomáticos, porém não significativa ($p=0,7597$). Nishiura *et al.* (2004) também encontrou que a expressão de TBET foi semelhante entre pacientes com PET/MAH e assintomáticos, porém, em relação ao GATA3, os resultados foram inversos ao deste trabalho. A expressão de GATA3 foi maior em pacientes com PET/MAH, porém sem significância estatística. Em relação ao FOXP3, estudos mostram que a infecção por HTLV-1 pode diminuir a expressão de FOXP3, IL-10 e TGF- β , causando desbalanço na inflamação que permanece na doença (SANTOS *et al.*, 2006; YAMANO *et al.*, 2009; OHKURA; SAKAGUCHI, 2010;

RAMIREZ *et al.*, 2010; SATOU; MATSUOKA, 2010; YASUNAGA; MATSUOKA, 2011; ARAYA *et al.*, 2011). Ghezeldasht *et al.* (2017) mostraram que em pacientes com PET/MAH, a expressão de FOXP3 foi inferior em relação aos pacientes assintomáticos. Em contrapartida, Oh *et al.* (2006) expuseram que os pacientes com PET/MAH apresentaram menor quantidade de células FOXP3+ em relação aos pacientes assintomáticos e indivíduos não infectados por HTLV-1.

A avaliação do equilíbrio entre os fatores demonstrou dados interessantes. Os pacientes PET/MAH não apresentaram correlação entre TBET x GATA3 e TBET x FOXP3, o que pode indicar uma perda de equilíbrio entre as respostas ($r=-0,1071$, $p=0,7039$ e $r=0,2964$, $p=0,2834$, respectivamente). Apenas a correlação moderada entre FOXP3 e GATA3 continuou presente ($r=0,633$, $p=0,0103$). Nishiura *et al.* (2004) também mostraram que TBET x GATA3 apresentaram uma correlação fraca, porém, diferentes deste estudo, foi estatisticamente significante.

Os pacientes MOS, igual ao que foi visto nos pacientes PET/MAH, as correlações entre e os TBET x GATA3 e TBET x FOXP3 também foram ínfimas, sem significância estatística. Não há trabalhos com esta nova classificação, mas pode-se perceber que há um desequilíbrio nas respostas semelhante ao que é visto na PET/MAH.

Os pacientes assintomáticos apenas perderam a correlação entre TBET x GATA3 ($r=0,3676$, $p=0,1612$). Diferente ao que foi encontrado por Nishiura *et al.* (2004) que mostram uma correlação moderada entre eles nos pacientes assintomáticos e significante estatisticamente.

Estes resultados obtidos indicam que há diferenças entre os grupos descritos por Koyama *et al.* (2019). Nota-se que os pacientes MOS que apresentam uma mielopatia incompleta, em relação ao perfil dos fatores de transcrição, foram semelhantes aos pacientes assintomáticos. Em contrapartida, em relação às correlações, estes pacientes foram semelhantes aos pacientes PET/MAH. Isso pode indicar que, os pacientes MOS apresentam um desequilíbrio da resposta imunológica que aparentemente pode levar a uma nova condição neurológica.

CONCLUSÃO

Evidenciou-se uma forte correlação entre a expressão de GATA3 e FOXP3 em todos os grupos clínicos estudados. Este achado indica uma forte interação entre as respostas imunológicas Th2 e Treg, antagonizando a resposta Th1 e sendo, possivelmente, determinante ao acometimento de uma mielopatia clinicamente distinta da PET/MAH (incompleta), nos indivíduos infectados pelo HTLV-1.

A considerável expressão de GATA3, observada, sobretudo, em pacientes assintomáticos e MOS, com sua forte correlação com o fator FOXP3, indica um padrão Th2 predominante nesses indivíduos, correlacionado com uma forte resposta T reguladora do processo inflamatório;

O desequilíbrio entre TBET e FOXP3 apresentado pelos grupos de pacientes MOS e PET/MAH (pacientes com mielopatia) pode indicar uma perda do balanço entre a resposta Th1 e T reguladora, sendo, possivelmente, determinante ao desenvolvimento de mielopatia em indivíduos com HTLV-1.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho observou algumas peculiaridades na quantificação, comparação e correlação dos fatores de transcrição TBET, GATA3 E FOXP3 nos pacientes infectados pelo HTLV-1; Assintomáticos, MOS e PET/MAH. Também apresenta outros achados em relação ao desencadeamento de mielopatia pelos indivíduos portadores do HTLV-1, bem como expõe parte dos processos imunológicos envolvidos nessa doença. Outros estudos são necessários para elucidar as totais interações moleculares do vírus com a manifestação dessas respostas imunológicas, sendo essenciais ao esclarecimento da imunopatologia do HTLV-1 e do desenvolvimento de doenças relacionadas a este vírus.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, A. Q. C. *et al.* **HAM/TSP Brazilian study group. - HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in Brazil: a nationwide survey.** J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol; v.19: p.536-541. 1998.

ARAYA, N. *et al.* **Human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and regulatory T cells in HTLV-1-associated neuroinflammatory disease.** Viruses. v. 3, n. 9, p. 1532-1548, 2011. DOI: 10.3390/v3091532.

- ARAYA, N. *et al.* **HTLV-1 induces a Th1-like state in CD4+CCR4+ T cells.** J Clin Invest. Baltimore, v.124, n. 8, p. 3431–3442. Ago. 2014.
- BARATELLA, M.; FORLANI, G.; ACCOLLA, R. S. **HTLV-1 HBZ Viral Protein: A Key Player in HTLV-1 Mediated Diseases.** Frontiers in Microbiology. Switzerland, v. 8, n. 2615, 2017.
- BARROS, N. *et al.* **CD4+ T cell subsets and Tax expression in HTLV-1 associated diseases.** Pathogens and Global Health. London, v. 107, n. 4, 2013.
- BOXUS, M.; WILLEMS L. **Mechanisms of HTLV-1 persistence and transformation.** British Journal of Cancer. London, v. 101, p. 1497–1501, 2009. doi:10.1038/sj.bjc.6605345
- BOXUS, M.; WILLEMS, L. **How the DNA damage response determines the fate of HTLV-1 Tax-expressing cells.** Retrovirology. London, v. 9, n. 2, 2012.
- CHAMPS, A.P.S.; *et al.* **Mielopatia associada ao HTLV-1: análise clínico-epidemiológica em uma série de casos de 10 anos.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Rio de Janeiro, v. 43, p. 668-672, 2010.
- COSTA, C.M.C.; SANTOS, T.J.T. **Paraparesia espástica tropical (ou mielopatia associada ao retrovírus HTLV-I - PET/MAH).** Revista Brasileira de Medicina. São Paulo, v. 60, n. 9, p. 703-708. 2003.
- DIAS, G.A.S., *et al.* **Neurological manifestations in individuals with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in the Amazon.** Spinal Cord. Switzerland, v. 54, n. 2, p.154-157, 2016. doi:10.1038/sc.2015.112.
- ECHEVARRIA-LIMA, J., *et al.* **Protein Profile of Blood Monocytes is Altered in HTLV-1 Infected Patients: Implications for HAM/TSP Disease.** Scientific Reports. London, v. 8, n. 1. Set. 2018.
- ENOSE-AKAHATA, Y.; VELLUCCI, A.; JACOBSON S. **Role of HTLV-1 Tax and HBZ in the Pathogenesis of HAM/TSP.** Front. Microbiol. Switzerland, v. 8, p. 2563. 2017.
- FUTSCH, N.; MAHIEUX, R.; DUTARTRE, H. **HTLV-1, the Other Pathogenic Yet Neglected Human Retrovirus: From Transmission to Therapeutic Treatment.** Viruses. Switzerland, v. 10, n. 1, p. 2-25. Jan. 2018.
- FUZII, H. T. *et al.* **Immunopathogenesis of HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP).** Life Sciences – Elsevier. Netherlands, 2014. Acesso em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2014.03.025>> Acesso em: 21 de março de 2019.
- GHEZELDASHT, S.A. *et al.* **Evaluation of T Regulatory Lymphocytes Transcription Factors in HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP) Patients.** Appl Biochem Biotechnol. New York City, v. 182, p. 1403–1414, 2017.
- GILLI, S. C. O.; SALLES, T. S. I.; SAAD, S. T. O. **Decreased GATA3 mRNA Expression in Human T-cell Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1) Infection.** Scandinavian Journal of Infectious Diseases. London, v. 32, p. 161–163, 2000.
- GILLI, S.C.; SALLES T.S.; SAAD, S.T. **Regulation of the GATA3 promoter by human T-cell lymphotropic virus type I Tax protein.** J Cell Biochem, v. 96, n. 6, p. 1178-87. 15 Dec 2004. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15486968>>. Acesso em 25 Abril de 2019. DOI: 10.1002/jcb.20290.
- GLÓRIA, L. *et al.* **Perfil clínico-epidemiológico de pacientes infectados pelo HTLV-1 em Belém/Pará.** Cad. Saúde Colet. Rio de Janeiro, v. 23, n. 2, p. 157-162. Jun. 2015. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1414-462X2015000200157>. Acesso em 14 março de 2018.
- JACOBSON, S. **The NK cell as a new player in the pathogenesis of HTLV-I associated neurologic disease.** Virulence. London, v. 1, n. 1, p. 8-9, 2010. doi: 10.4161/viru.1.1.10327
- KOYAMA, R. V. L. *et al.* **Incomplete myelopathy and human T cell lymphotropic virus type-1 (HTLV-1).** J. Neurovirol. Switzerland, v. 25, n. 1, 2019.

KUBOTA, R. **Pathogenesis of human T-lymphotropic virus type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis**. *Clinical and Experimental Neuroimmunology*. v. 8, n. 2, p. 117–128, 2017. Disponível em < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/cen3.12395> > . Acesso em 13 março de 2018.

MAHIEUX, R.; GESSAIN, A. **HTLV-3/STLV-3 and HTLV-4 Viruses: Discovery, Epidemiology, Serology and Molecular Aspects**. *Viruses*. Switzerland, v. 3, p. 1074-1090, 2011.

MARTIN, J. L. *et al.* **Molecular Studies of HTLV-1 Replication: An Update**. *Viruses*. Switzerland, v. 8, n. 31, 2016. doi:10.3390/v8020031

MOZHGANI, S. *et al.* **Interferon Lambda Family along with HTLV-1 Proviral Load, Tax, and HBZ Implicated in the Pathogenesis of Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis**. *Neurodegener Dis*. Switzerland, v. 18, n. 2, p.150-155. Aug. 2018.

MOZHGANI, S. *et al.* **Human T-lymphotropic virus 1 (HTLV-1) pathogenesis:A systems virology study**. *J Cell Biochem*. v.119, n. 5, p. 3968-3979. Jan. 2018. Disponível em < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29227540> > . Acesso em 21 março de 2018.

MS - MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de manejo clínico da infecção pelo HTLV**. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Brasília – DF. 1ª edição. p. 7-11, 2013.

NECO, H.V.C. **Estudo de associação do polimorfismo G-197A do gene IL17 na infecção pelo Vírus Linfotrópico da Célula T Humana Tipo 1 (HTLV-1)**. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz. Recife, p. 30. 2015.

NISHIURA, Y, *et al.* **Increased mRNA expression of Th1-cytokine signaling molecules in patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis**. *Tohoku J Exp Med*. Sendai, v. 204, n.4, p.289-98. Oct. 2004.

NORRIS, P. J. *et al.* **Human T cell leukemia virus type 1 infection drives spontaneous proliferation of natural killer cells**. *Virulence*. London, v. 1, n. 1, p. 19-28, January/February, 2010.

OH, U. *et al.* **Reduced Foxp3 Protein Expression Is Associated with Inflammatory Disease during Human T Lymphotropic Virus Type 1 Infection**. *JII*. Arlington, v. 193, p. 1557-1566. June 2006.

OHKURA, N.; SAKAGUCHI, S. **Regulatory T cells: roles of T cell receptor for their development and function**. *Semin Immunopathol*. Switzerland, v. 32, p. 95–106, 2010. doi: 10.1007/s00281-010-0200-5.

PEREIRA, W. A.; MESQUITA, E. M. **Vírus Linfotrópico de células T Humana (HTLV): doenças associadas e dificuldades no diagnóstico e tratamento**. *Rev. Investig. Bioméd. São Luís*, v. 8, p. 92-101, 2016.

QUARESMA, J. A. S. *et al.* **HTLV-1, Immune Response and Autoimmunity**. *Viruses*. Switzerland, v. 8, n. 5, 2016. doi:10.3390/v8010005

RAMIREZ E. *et al.* **In vivo fluctuation of Tax, Foxp3, CTLA-4, and GITR mRNA expression in CD4(+)CD25(+) T cells of patients with human T-lymphotropic virus type 1-associated myelopathy**. *Braz J Med Biol Res*. Ribeirão Preto, v. 43, p. 1109–1115, 2010.

RIBEIRO, M. A. *et al.* **Geographic distribution of human T-lymphotropic virus types 1 and 2 among mothers of newborns tested during neonatal screening**. *Rev. Panam. Salud. Publica*. Minas Gerais, v. 27, n. 5, p. 330-7, 2010.

ROMANELLI, L. C. F.; CARAMELLI, P.; PROIETTI, A. B. F. C. **O vírus linfotrópico de células T humanos tipo 1 (HTLV-1): Quando suspeitar da infecção?** *Rev. Assoc. Med. Brás., Minas Gerais*, v. 56, n. 3, p. 340-7, 2010.

SAITO, M. **Immunogenetics and the Pathological Mechanisms of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1-(HTLV-1)-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP)**. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis., Okinawa*, 2010.

SAITO, M., BANGHAM, C. R. **Immunopathogenesis of Human T-Cell Leukemia Virus Type-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis: Recent Perspectives.** Leukemia research and treatment. London, v. 2012. Feb. 2012.

SANTOS S. B. *et al.* **Modulation of T cell responses in HTLV-1 carriers and in patients with myelopathy associated with HTLV 1.** Neuroimmunomodulation. Switzerland, v. 13, p. 145–151, 2006.

SANTOS, A. C. C.; SOARES D. J.; RIVEMALES, M. C. C. **(Des)conhecimento, adoecimento e limitações impostas pelo HTLV: experiências de mulheres soropositivas.** Cad. Saúde Colet. Rio de Janeiro, v. 25, n. 1, p. 45-50. Fev. 2017.

SANTOS, S. B.; MUNIZ, A. L.; CARVALHO, E. M. **Imunopatogênese da Mielopatia Associada ao HTLV-I.** Gazeta Médica da Bahia, Salvador, v. 79, n. 1, p. 11-17, 2009.

SATOU, Y.; MATSUOKA, M. **HTLV-1 and the host immune system: how the virus disrupts immune regulation, leading to HTLV-1 associated diseases.** J. Clin. Exp. Hematop., Kyoto, v. 50, n. 1, p. 1-8, 2010.

SERQUEIRA, C. G. **Descriptive study of HTLV infection in a population of pregnant women from the State of Pará, Northern Brazil.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Brasília – DF, v. 45, n. 4, p. 453-456, Jul-Aug, 2012.

SILVA, I.C. *et al.* **Moderada endemicidade da infecção pelo vírus linfotrófico-T humano na região metropolitana de Belém, Pará, Brasil.** Revista Brasileira de Epidemiologia. Rio de Janeiro, v. 21, 2018. Disponível em < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1415790X2018000100417&lng=en&nrm=i&tlng=pt >. Acesso em 18 março de 2018.

SLATER, C.M.S.A.; RIBEIRO L.C.P.; PUCCIONI-SOHLER, M. **Difficulties in HAM/TSP diagnosis.** Arq Neuropsiquiatr. São Paulo, v. 70, n. 9, p. 686-690. Sep. 2012.

SOUZA, A., *et al.* **Neurological diseases associated with HTLV-1 Infection.** Rev Soc Bras Med Trop. Uberaba, v. 45, n.5, p.545-552. Sep 2012. Disponível em < <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822012000500002> > . Acesso em 18 março de 2018.

TAROKHIAN, H., *et al.* **HTLV-1-host interactions on the development of adult T cell leukemia/lymphoma: virus and host gene expressions.** BMC Cancer. London, v. 18, n. 1, p. 1287. Dec. 2018.

TAVARES, Í.R. **Lombalgia e paraparesia espástica tropical / mielopatia associada ao HTLV-I (PET/MAH).** Dissertação (mestrado) - UFRJ, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-graduação em Clínica Médica (Neurologia), 2009. Rio de Janeiro, p.5. 2009.

YAMANO, Y. *et al.* **Abnormally high levels of virus-infected INF-beta +CCR4+CD4+CD25+ T cells in a retrovirus-associated neuroinflammatory disorder.** Plos One. Kawasaki, v. 4. n. 8, 2009. Disponível em < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2715877/> > . Acesso em 10 março de 2018.

YAMANO, Y. *et al.* **Virus-induced dysfunction of CD4+CD25+ T cells in patients with HTLV-I-associated neuroimmunological disease.** J Clin Invest. Michigan, v. 115, n. 5, p.1361-1368. May. 2005.

YASUNAGA J, MATSUOKA M. **Molecular mechanisms of HTLV-1 infection and pathogenesis.** Int J Hematol. Switzerland, v. 94, n. 5, p. 435–442, 2011.

YU, F. *et al.* **Dynamic expression of T-bet and GATA3 by regulatory T cells maintains immune tolerance.** Nature Immunology. London, v. 16, n. 2, p. 197–206, 2015. doi: 10.1038/ni.3053.

ANEXO A – CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS DE PET/MAH

CRITÉRIOS CLÍNICOS	
<i>O quadro clínico típico da paraparesia espástica crônica nem sempre está presente quando o paciente se apresenta pela primeira vez ao examinador. Um único sinal clínico (ou sintoma) pode ser uma evidência precoce de PET/MAH.</i>	
<i>Sexo e idade</i>	Na maioria das vezes é esporádica e ocorre em adultos; ocasionalmente pode ser observada na infância ou adolescência; predominância no sexo feminino.
<i>Início</i>	Normalmente insidioso, mas pode ser súbito.
<i>Principais manifestações clínicas</i>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Paraparesia espástica crônica de lenta progressão, às vezes com estabilização após progressão inicial. 2. Paresia dos membros inferiores mais acentuada em grupamentos musculares proximais. 3. Distúrbio vesical precoce; constipação geralmente tardia; impotência ou diminuição da libido são comuns. 4. Sintomas sensitivos tais como parestesias ou queimações são mais proeminentes do que os sinais físicos objetivos. 5. Lombalgia com irradiação para os membros inferiores é comum. 6. Hipopalestesia ou apalestesias, com a noção da posição segmentar geralmente preservada. 7. Hiperreflexia dos membros inferiores, frequentemente com <i>clonus</i> e Sinal de Babinski. 8. Hiperreflexia dos membros superiores; sinais de Hoffmann e Tromner positivos; paresia geralmente ausente. 9. Reflexo mandibular exaltado em alguns pacientes.
<i>Achados neurológicos menos frequentes</i>	Sinais cerebelares, atrofia óptica, surdez neural, nistagmo, outros déficits de nervos cranianos, tremor distal dos membros superiores, hipo ou arreflexia dos reflexos aquileus. Convulsões, déficits cognitivos, demência ou alterações do nível de consciência são raros.
<i>Outras manifestações neurológicas associadas à PET/MAH</i>	Atrofia muscular, fasciculações (raras), polimiosite, neuropatia periférica, polirradiculopatia, neuropatias cranianas, meningites e encefalopatia.
<i>Manifestações sistêmicas associadas ou não à PET/MAH</i>	Alveolite pulmonar, uveíte, síndrome de Sjögren, artropatia, vasculite, ictiose, crioglobulinemia, gamopatia monoclonal, LLcTA.
CRITÉRIOS LABORATORIAIS	
<ul style="list-style-type: none"> • Presença de antígenos ou anticorpos contra o HTLV-1 no sangue e no LCR. • Possível ocorrência de pleocitose linfocítica leve no LCR. • Possível presença de linfócitos lobulados no sangue e/ou LCR. • Possível ocorrência de aumento leve a moderado de proteína no LCR. • Quando disponível, isolamento viral realizado a partir do LCR ou sangue. 	

Fonte: MS – Ministério da Saúde (2013).

ANEXO B – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA

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

PARECER DE ÉTICA DE PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS


1. **Protocolo:** Nº038/2010-CEP/NMT
2. **Projeto de Pesquisa:** CORRELAÇÃO ENTRE A AVALIAÇÃO CLÍNICA, PADRÃO DE RESPOSTA PERIFÉRICA E A FUNÇÃO TÍMICA DE PACIENTES ACOMETIDOS POR PARAPARESIA ESPÁSTICA TROPICAL/MIELOPATIA ASSOCIADA AO HTLV.
3. **Pesquisador Responsável:** George Alberto da Silva Dias.
4. **Instituição / Unidade:** NMT/UFPA.
5. **Data de Entrada:** 11/06/2010.
6. **Data do Parecer:** 30/06/2010.

PARECER

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

Parecer: **APROVADO.**

Belém, 09 de agosto de 2010.


Profº Teiichi Oikawa
Coordenador do CEP-NMT/UFPA.